



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

**EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE FLORFENICOL
Y SU METABOLITO ACTIVO FLORFENICOL AMINA EN
TEJIDOS COMESTIBLES Y PLUMAS DE POLLO BROILER
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC MS/MS)**

EKATERINA VALERIEVNA POKRANT HUERTA

Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias

Santiago, Chile
2017



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

**EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE FLORFENICOL
Y SU METABOLITO ACTIVO FLORFENICOL AMINA EN
TEJIDOS COMESTIBLES Y PLUMAS DE POLLO BROILER
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC MS/MS)**

EKATERINA VALERIEVNA POKRANT HUERTA

Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias

Director de Tesis: Dra. JAVIERA CORNEJO KELLY

Santiago, Chile
2017

Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (Farmavet) y en el Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y contó con financiamiento

Proyecto Fondecyt de Iniciación a la Investigación 11140530

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Formulación farmacéutica	10
Animales experimentales	11
Procesamiento de las muestras	12
Estándares	13
Metodología de extracción de los analitos a partir de las matrices biológicas	13
Análisis instrumental	14
Validación de metodologías analíticas	14
Cuantificación de los analitos en muestras experimentales	16
Estudio de depleción	16
RESULTADOS	18
Objetivo específico 1. Implementar y validar metodologías analíticas por LC-MS/MS para la detección y cuantificación de florfenicol y florfenicol amina en las matrices plumas, músculo e hígado de aves de engorda.....	18
Implementación de las metodologías analíticas.....	19
Validación de metodologías analíticas.	19
Objetivo específico 2. Detectar y cuantificar concentraciones de los analitos florfenicol y florfenicol amina en plumas, músculo e hígado de aves tratadas con una	

formulación farmacéutica comercial de florfenicol autorizada para su uso en aves de engorda en dosis terapéutica	29
Cuantificación de FF Y FFA en músculo de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial..	29
Cuantificación de FF Y FFA en hígado de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial..	30
Cuantificación de FF Y FFA en pluma de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial..	30
Objetivo específico 3. Evaluar la depleción de las concentraciones cuantificadas de florfenicol y florfenicol amina en plumas de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial y comparar estas concentraciones con las cuantificadas en los tejidos comestibles (músculo e hígado), en los mismos tiempos de muestreo	32
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXOS	44

RESUMEN

Los antibióticos son la principal herramienta terapéutica en el tratamiento de enfermedades de origen bacteriano en los sistemas de producción avícola. Sin embargo, si residuos de estos fármacos permanecen en productos destinados a consumo humano, por sobre los límites máximos residuales (LMR), se pueden producir diferentes efectos adversos sobre la población humana. En el caso de los subproductos como las plumas y a pesar de su uso para la alimentación de otras especies productivas, actualmente no existen estudios del comportamiento de varios antibióticos, como en el caso del florfenicol. De esta manera, en la presente tesis se evaluaron las concentraciones y depleción de florfenicol (FF) y su metabolito activo, florfenicol amina (FFA), en plumas y tejidos comestibles.

Para evaluar la depleción de FF y FFA, se utilizó un grupo de 80 pollos broiler criados bajo condiciones controladas, a los que se les administró un tratamiento con una formulación comercial de florfenicol al 10%, vía oral por cinco días. Dos metodologías analíticas por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), fueron implementadas y validadas, para asegurar que las concentraciones detectadas y cuantificadas de los analitos de interés fueran confiables y precisas. Las concentraciones detectadas a partir de las muestras experimentales fueron cuantificadas a través de la ecuación del análisis de regresión lineal de las curvas de calibración construidas en matriz fortificada con estándares certificados. En el estudio de depleción se estableció un tiempo de depleción de 99 días con un 95% para plumas, considerando el LD ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) como punto de corte.

Palabras clave: Depleción, Residuos antimicrobianos, Florfenicol, Plumav, Tejidos comestibles, LC-MS/MS.

ABSTRACT

Antibiotics are the main therapeutic tool in the treatment of diseases of bacterial origin in poultry production systems. However, if residues of these drugs remain in products intended for human consumption, above the Residual Maximum Limits (MRLs), different adverse effects can occur on the human population. In the case of by-product as feathers and despite their use for feeding other productive species, there are currently no studies of the behavior of several antibiotics, like florfenicol. In this thesis work, concentrations and depletion of florfenicol (FF) and its active metabolite, florfenicol amine (FFA), in feathers and edible tissues were evaluated.

To evaluate FF and FFA depletion, a group of 80 broiler chickens raised under controlled conditions were used. They are treated with a commercial formulation of 10% florfenicol orally for five days. Two analytical methodologies by liquid chromatography associated to mass spectrometry (LC-MS / MS), were implemented and validated, to ensure that the detected and quantified concentrations of the analytes were reliable and accurate. The detected concentrations from experimental samples were quantified through the equation of the linear regression analysis of calibration curves constructed in matrix fortified with certified standards. In the depletion study established a 99-day depletion time with a 95% of confidence for feathers, considering LD ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) as a cutoff point.

Key words: Depletion, Antimicrobial residues, Florfenicol, Feathers, Edible tissues, LC-MS/MS.

INTRODUCCIÓN

En la industria avícola los antimicrobianos han sido empleados en las aves de corral desde los años 50, con el objetivo de tratar enfermedades bacterianas y así mejorar la eficiencia de los sistemas productivos. Sin embargo su uso puede ser un riesgo para la salud pública, cuando residuos de estos fármacos persisten en los alimentos de origen animal por sobre los Límites Máximos Residuales (LMR) permitidos. Dentro de los efectos adversos producidos por la presencia de residuos de antibióticos se encuentran los efectos tóxicos directos, inmunológicos, mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos y efectos sobre la microflora intestinal, este último a causa de que bajas concentraciones de estas drogas contribuyen a una persistente presión para la selección de bacterias resistentes que colonizan tejidos animales y producen disturbios en la flora normal (Martínez y Baquero, 2002; Anadón y Martínez-Larrañaga, 2012). Siendo la resistencia a los antimicrobianos un problema importante para la salud pública, fundamentalmente cuando se origina frente a antimicrobianos de primera línea de elección, dado que a corto plazo no existirán antimicrobianos para tratar este tipo de bacterias resistentes en la medicina humana (OMS, 2014).

Para evitar estos efectos adversos sobre la población, es necesario el uso correcto de los antibióticos, respetando el periodo de resguardo (PR) y la dosis del producto farmacéutico empleado en los animales de producción, lo que asegura que no existan residuos de fármacos y/o sus metabolitos en concentraciones que superen a los LMR establecidos para los diferentes tejidos. Sin embargo, para los subproductos provenientes de las aves, como las plumas, no existe ninguna regulación respecto a los residuos antimicrobianos, ya que no son destinados al consumo directo. No obstante, existe evidencia a partir de estudios publicados en la literatura que demuestran que algunos antimicrobianos, como las fluoroquinolonas,

pueden permanecer en estas estructuras por largos periodos y en altas concentraciones una vez finalizada la terapia y al mismo tiempo que residuos de esta droga no son detectables en los tejidos comestibles (San Martin *et al.*, 2007; Cornejo *et al.*, 2010; Cornejo *et al.*, 2012). Este aspecto cobra relevancia, al considerar que las plumas son utilizadas en la elaboración de harina de plumas para la alimentación de otros animales destinados a consumo humano, tales como porcinos, bovinos y peces, incorporando y traspasando estos residuos de fármacos a la cadena alimenticia.

Por este motivo, el objetivo de la presente Tesis para optar al Grado de Magister, es evaluar las concentraciones y estudiar la depleción de florfenicol (FF) y florfenicol amina (FFA), antibiótico no estudiado anteriormente, en plumas, músculo e hígado de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial autorizada para su uso en aves de engorda y así relacionar las concentraciones presentes en las plumas con las concentraciones presentes en los tejidos comestibles.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La industria avícola actualmente lidera la producción de carne a nivel nacional, se estima que de la producción de carne total, la producción de aves es del 46% y dentro de esta la de mayor producción es la carne de pollo, la que corresponde a un 85% (ODEPA, 2015).

Al ser una producción altamente intensificada, el rendimiento de esta se puede ver afectado por la incidencia de enfermedades de origen bacteriano, produciendo pérdidas económicas para el productor. Por este motivo es inevitable el empleo de antibióticos, ya que estos son una herramienta terapéutica eficaz para el control de estas patologías infecciosas. Sin embargo, su uso no se encuentra exento de riesgos, ya que si las concentraciones de residuos permanecen por sobre los límites máximos aceptables en los alimentos, se pueden producir diferentes efectos adversos sobre la población, dentro de los cuales se encuentran efectos adversos de tipo toxicológico, farmacológico, inmunológico y microbiológico (Anadón y Martínez-Larrañaga, 2012).

Para evitar estos efectos nocivos para la población humana, se han establecido en los alimentos de origen animal LMR. Estos se definen como el contenido máximo de residuos (principio activo y metabolitos activos) permitidos, resultantes de la utilización de un medicamento veterinario en un determinado producto alimenticio (Anadón y Martínez-Larrañaga, 2012). Con lo anterior, al respetar las dosis y periodos de resguardo establecidos para la formulación farmacéutica, en conjunto con el monitoreo de los tejidos comestibles que son destinados a la población, se asegura que las concentraciones de residuos de los fármacos utilizados presentes en los alimentos de origen animal sean iguales o inferiores a los LMR, disminuyendo así el riesgo de que estos puedan producir efectos adversos.

La resistencia a los antimicrobianos, principalmente la selección, propagación y persistencia de bacterias resistentes que pueden afectar a la población humana, se ve propiciada por la utilización de antimicrobianos, especialmente por el uso indebido de estos. Es por este motivo que las buenas prácticas en la utilización de estos fármacos juegan un rol importante en la selección y persistencia de estas cepas resistentes (OMS, 2015).

En el caso de las plumas, al ser subproductos provenientes de la industria avícola, no existe regulación de las concentraciones de antibióticos. Sin embargo, existen diferentes estudios, como los publicados por San Martín *et al.*, (2007), Cornejo *et al.*, (2010) y Cornejo *et al.*, (2012), que indican que estas estructuras son capaces de bioacumular antibióticos y, al ser incorporados en los piensos de aves, rumiantes, cerdos y peces, se han señalado como una potencial fuente de reincorporación de residuos de antibióticos a la cadena productiva.

Diferentes investigaciones evidencian que concentraciones de antibióticos pueden acumularse en las plumas de aves en niveles mayores y por periodos más prolongados que en los tejidos comestibles, ya finalizada la terapia y respetados los periodos de resguardo establecidos para la formulación farmacéutica utilizada. San Martín *et al.*, (2007), en sus resultados, encontraron altas concentraciones de enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino en plumas de aves tratadas con este fármaco, en comparación a los tejidos comestibles (músculo, hígado y riñón). En concordancia, Cornejo *et al.*, (2010), encontraron altas concentraciones del antimicrobiano flumequina presente en la matriz plumas, comparado con las muestras de hígado y músculo, una vez finalizado el periodo de resguardo calculado para la formulación. Además, la eliminación de este antimicrobiano desde las plumas fue más lenta que en los otros tejidos. Sumado a esto, los resultados de Cornejo *et al.*, (2012) demuestran que enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino fueron transferidos

a las plumas de aves tratadas, y las concentraciones de estos antibioticos permanecieron por mayor tiempo y en niveles mayores, que aquellos encontrados en los tejidos comestibles. Estos autores detectaron una concentración de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ a los 9 días post-tratamiento, momento en que en los tejidos comestibles las concentraciones de residuos ya no fueron detectadas, con un límite de detección (LD) del método analítico de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Considerando los antecedentes expuestos por San Martin *et al.*, (2007) y Cornejo *et al.*, (2010), Love *et al.*, (2012) realizaron un estudio en donde se muestrearon harinas de plumas proveniente de China y de diferentes estados de Estados Unidos (Arkansas, Carolina del Norte, Oregon, California, Idaho, Tennessee) (n=12). En este estudio, utilizaron una versión modificada del método EPA 1694 para tejidos, y las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas (LC-MS/MS). Estos investigadores detectaron presencia de antibióticos en todas las muestras analizadas, encontrando de 2 a 10 antibióticos en cada una de ellas. Se analizaron 6 familias, con un total de 26 antibióticos distintos, encontrándose 17 de éstos; los de mayor frecuencia fueron de la de: sulfonamidas, macrólidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, antagonistas del ácido fólico y streptograminas.

Por su parte, otros autores como Heinrich *et al.*, (2013) y Berendsen *et al.*, (2013) realizaron estudios, con los antibioticos ceftiofur y oxitetraciclina respectivamente, y evidenciaron que estos fármacos se bioacumulan en las plumas de pollos tratados, permaneciendo las concentraciones detectadas por periodos más prolongados a los periodos de resguardo establecidos para los tejidos comestible (músculo e hígado), momento en el que en estas matrices los residuos de ceftiofur y oxitetraciclina eran menores a los LMR, o en

concentraciones no detectables según las metodologías analíticas utilizadas en dichos estudios.

Sin embargo, a pesar de toda la evidencia científica, a la fecha solo han sido estudiadas las familias de las fluoroquinolonas y tetraciclinas, pero es importante saber cómo se comportan las otras familias de antimicrobianos en esta matriz, como es en el caso de los derivados del cloranfenicol, como los fenicoles en donde no existe evidencia del comportamiento de estos antimicrobianos en las plumas. Debido a que estos se encuentran dentro de los antibióticos autorizados en nuestro país por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para su uso en aves de engorda, además de las cefalosporinas, tetraciclinas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, macrólidos y lincosamidas (SAG, 2015).

Los fenicoles correspondientes a los derivados del cloranfenicol, son una familia de interés, por ser un grupo de antimicrobianos ampliamente usados en la producción avícola. Se encuentra descrito que el cloranfenicol causa, tanto en el hombre como en los animales, depresión reversible de la médula ósea, a dosis dependiente, por un mecanismo relacionado con la inhibición de la síntesis proteica. Además se ha reportado que en el humano produce anemia aplásica irreversible, a dosis independiente. Este efecto es la principal causa por la cual la *Food and Drug Administration* (FDA) prohibió su uso en los animales productivos, destinados a consumo humano (Mestorino *et al.*, 2011). De este modo se desarrolló el florfenicol antibiótico de amplio espectro por su acción sobre diferentes bacterias como *Enterobacter cloacae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Proteus vulgaris* y *Escherichia coli* (Park *et al.*, 2007), siendo una herramienta eficaz en el tratamiento de patologías causadas por estos agentes sensibles, especialmente en enfermedades respiratorias, en las diferentes especies

productivas. El florfenicol es el principal representante de la familia, presenta tres formulaciones farmacéuticas autorizadas por el SAG para su uso en aves de engorda, con periodos de resguardo en esta especie que fluctúan entre los 10 y 30 días. Este antibiótico presenta baja toxicidad, comparada con el cloranfenicol y en cuanto a las características farmacocinéticas, presenta alta biodisponibilidad, alto volumen de distribución y buena penetración tisular, reabsorción a nivel tubular y una vida media de eliminación corta a moderada (Park *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2010).

El florfenicol (FF) se transforma parcialmente en florfenicol amina (FFA), florfenicol ácido oxámico, monocloroflorfenicol y florfenicol alcohol, en el organismo posterior a su administración, siendo la proporción entre ellos diferente en las diferentes especies. Sin embargo esta descrito que la florfenicol amina es el metabolito que presenta mayor vida media en el hígado de bovinos y siempre es el mayor metabolito en la mayoría de las especies. Por este motivo, florfenicol amina se definió como uno de los residuos marcadores de florfenicol de muchos países y organizaciones (Xie *et al.*, 2011).

En cuanto a la situación actual sobre los LMR para florfenicol y su principal metabolito activo, florfenicol amina en tejidos comestibles, la Unión Europea establece concentraciones máximas de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en músculo, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en piel y grasa, 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en riñón y de 2500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en hígado de aves destinadas a consumo (CE, 2009a). En Chile, los LMR se encuentran establecidos en la Resolución Exenta N° 551 del 2014, en donde se fijan las concentraciones máximas, las cuales a la fecha son equivalentes a los de la Unión Europea para los mismos tejidos comestibles (Chile, Ministerio de Salud, 2014).

Por su parte las plumas, al ser un subproducto de la industria avícola, no tiene LMR establecidos. Sin embargo, según los diferentes estudios publicados, serían una ruta

importante en el traspaso de residuos de antibióticos a través de la cadena productiva, ya que además de sus usos como fertilizante, materia prima para diesel, ingrediente de bioplásticos, es además reincorporado en la cadena alimenticia a través de las dietas de otros animales, como es el caso de los peces (Arunlertaree y Moolthongnoi, 2008; Love *et al.*, 2012), por ser una fuente de aminoácidos de bajo costo para la elaboración de dietas destinadas a animales de producción (Divakala *et al.*, 2009), representando un riesgo para la salud pública.

De esta forma, los antecedentes expuestos demuestran la importancia de estudiar la transferencia de residuos de antimicrobianos hacia las plumas y su posible rol en el traspaso de residuos químicos a través de la cadena alimenticia. Esto hace necesario conocer el comportamiento de estos antimicrobianos en las plumas de aves tratadas de forma terapéutica y además comparar estas concentraciones con las detectadas en los tejidos comestibles.

HIPOTESIS

“Los residuos de florfenicol y su metabolito activo florfenicol amina se mantienen en plumas de pollos broiler tratados con este antimicrobiano, en concentraciones mayores y por tiempos más prolongados que en los tejidos comestibles (músculo e hígado)”.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las concentraciones de florfenicol y florfenicol amina durante la fase de depleción, en plumas, músculo e hígado de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial de florfenicol autorizada para su uso en aves de engorda.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Implementar y validar metodologías analíticas por LC MS/MS para la detección y cuantificación de florfenicol y florfenicol amina en las matrices plumas, músculo e hígado de aves de engorda.
- 2.** Detectar y cuantificar concentraciones de los analitos florfenicol y florfenicol amina en plumas, músculo e hígado de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de florfenicol autorizada para su uso en aves de engorda en dosis terapéutica.
- 3.** Evaluar la depleción de las concentraciones cuantificadas de florfenicol y florfenicol amina en plumas de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial y comparar estas concentraciones con las cuantificadas en los tejidos comestibles (músculo e hígado), en los mismos tiempos de muestreo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta tesis se encuentra inserta en el marco del proyecto FONDECYT de Iniciación en Investigación N° 11140530 “Evaluación de la bioacumulación de residuos antimicrobianos en plumas de pollos broiler tratados con formulaciones farmacéuticas comerciales y su relación con la concentración de estos residuos en tejidos comestibles”.

Tanto la implementación y validación de las metodologías analíticas, como el estudio de depleción en las tres matrices se realizó en el laboratorio de farmacología veterinaria (FARMAVET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Acreditado bajo las normas ISO 17025.Of2005. El trabajo en terreno y de laboratorio fue realizado bajo las normas de bioseguridad aprobadas por el Comité de bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo N° 1). Conjuntamente, se consideraron las medidas de bioseguridad sugeridas por el Manual de Normas de Bioseguridad (CONICYT, 2008).

Para el correcto manejo de las muestras se realizó una capacitación en el laboratorio FARMAVET, asegurando de esta manera las competencias necesarias para realizar la extracción de los analitos de las diferentes matrices.

Formulación farmacéutica

Para el tratamiento de las aves, se utilizó una formulación farmacéutica comercial de Florfenicol al 10% de administración oral con un periodo de resguardo de 30 días para carne de ave. Esta formulación farmacéutica se encuentra registrada y autorizada para su uso en aves de engorda por el SAG.

Animales experimentales

Fueron utilizados 80 pollos broiler machos de genética Ross 308. Las aves fueron escogidas de esta genética debido a que son una raza precoz, de buena conversión alimenticia, gran rusticidad y adaptabilidad, además de que presentan una tasa de crecimiento inferior a pollos de engorde de genética Cobb 500 (Marcu *et al.*, 2013). Estas características favorecen su uso experimental en las condiciones establecidas ya que evitan una condición de engorde excesivo, lo que colabora al bienestar animal.

Los animales experimentales fueron mantenidos desde el día 1 de vida en baterías de crianza, las cuales poseen un piso de alambre elevado, con el fin de evitar la contaminación de las plumas con las deyecciones. En conjunto se controlaron las condiciones ambientales ($25 \pm 5^\circ\text{C}$ de temperatura, 50-60% de humedad relativa) y los animales tuvieron acceso *ad libitum* al agua y alimento no medicado, el cual fue formulado de acuerdo a los requerimientos de la raza.

Para el estudio de depleción las aves se dividieron aleatoriamente al día 6 de vida en 2 grupos experimentales, en donde el grupo de 64 pollos (grupo A) fue tratado con una formulación farmacéutica comercial de Florfenicol al 10% con una dosis terapéutica de 30 mg kg^{-1} una vez al día, durante cinco días consecutivos, cada animal experimental fue tratado individualmente mediante sonda esofágica. El segundo grupo de 16 pollos correspondió al grupo control (grupo B). Para definir los tamaños de los grupos experimentales se consideró el criterio establecido por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), a través del documento “*Guideline on approach towards harmonisation of withdrawal periods*” (EMA, 2016). De esta forma se estableció un número de 8 animales del grupo A y 2 animales del grupo B por cada tiempo de muestreo. En donde para cada punto de un total de 8, los que se

realizaron los días 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, y 40 post-tratamiento, fueron obtenidas muestras de plumas, músculo e hígado. Las muestras se almacenaron a -20°C, en bolsas plásticas rotuladas para su posterior procesamiento en una picadora de alimentos.

Las aves fueron criadas y monitoreadas por un médico veterinario especialista en avicultura y patología aviar, durante todo el periodo del estudio en las dependencias del laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Tanto para la mantención como el sacrificio de los animales experimentales se respetaron las condiciones de bienestar animal aprobadas por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile (Anexo N° 2). En donde el protocolo de manejo y supervisión se basó en la Ley N°20.380 “Sobre Protección de Animales” (Chile, Ministerio de Salud, 2009) y en la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (CE, 2010). En lo que respecta al sacrificio de la aves, se respetó el Reglamento (CE) N° 1099/2009 relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza (CE, 2009b).

Procesamiento de la muestras

Tanto para la implementación y validación de metodologías analíticas, como para el análisis de las muestras, los tejidos comestibles (músculo e hígado) fueron procesados en una picadora de alimento, previa eliminación de la piel y grasa. Por otro lado las plumas después del procesamiento en la picadora de alimentos recibieron un tratamiento criogénico con nitrógeno líquido, y fueron procesadas en una picadora industrial (Robot Coupe R4). Para evitar la contaminación cruzada entre las matrices, se utilizaron procesadoras distintas, una para cada experimento.

Estándares

Para el análisis y cuantificación de FF y FFA en plumas, músculo e hígado se utilizaron estándares de pureza certificada Sigma Aldrich. Todos los solventes utilizados fueron grado High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Como estándar interno (EI) se utilizó Cloranfenicol d-5 (CAF-d5) de pureza certificada que fue obtenido de Sigma Aldrich. 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 patrón interno para el análisis es una versión marcada isotópicamente de la molécula que se está cuantificando. Por lo cual, en este estudio se utilizó un EI deuterado, que corresponde a Cloranfenicol d5, en este compuesto los hidrógenos en las posiciones 2, 3, 5 y 6 de su núcleo de nitrobenzeno son reemplazados por deuterio, al igual que el hidrogeno del grupo hidroxilo de la posición 3.

Metodología de extracción de los analitos a partir de las matrices biológicas

Para la extracción de los analitos FF y FFA a partir de las matrices biológicas se utilizó como referencia una metodología analítica para detección de estos analitos por HPLC con detección de arreglo de diodos (DAD), la cual se basa en estudios publicados por Hormazabal *et al.* (1993), Li *et al.* (2006), Zhang *et al.* (2008) y una metodología descrita por la *United States Department of Agriculture* (USDA, 2010).

Para el análisis de las muestras se pesaron $2 \pm 0,02$ g de matriz (plumas, músculo e hígado) en un tubo de polipropileno de 50 mL, todas las muestras fueron fortificadas con el EI CAF-d5. Como solventes de extracción se utilizaron agua grado HPLC (Milipore) y acetona grado HPLC (J.T. Baker). Para la extracción de los analitos y homogeneización de las muestras, estas fueron agitadas, sonicadas y centrifugadas. El sobrenadante obtenido posterior a la

centrifugación fue traspasado a otro tubo de polipropileno en donde se le adicionó diclorometano para el *clean up*. Las muestras fueron agitadas y centrifugadas nuevamente, para la obtención de dos fases, en donde la fase inferior fue rescatada y evaporada bajo flujo de nitrógeno suave entre 40-50°C. Finalmente la reconstitución se realizó con 700 µL de una solución metanol/agua en relación 7/3.

Análisis Instrumental

Para el análisis de las muestras se utilizó un cromatógrafo líquido, constituido por una bomba cuaternaria, un autosampler y un horno de columna, (Agilent serie 1290 infinity) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (API 5500, ABSCIEX). La columna analítica utilizada fue una Synergi 4u fusión RP 30^a 50 x 2,0 mm. (Repuesto Agilent eclipse plus C18 RRHD 1,8 µm, 2,1 x 50 mm.), el software para el manejo del equipo correspondió a un Analyst 1.6.3. Para la integración de las muestras se utilizó el programa Multiquant 3.0.

La separación cromatográfica fue mediante un gradiente de fase móvil A: ácido acético al 0,1% en agua y fase móvil B: ácido acético al 0,1% en agua/metanol 1:9, el gradiente de flujo será de 300 µL min⁻¹ de un 25% fase A y 75% fase B, el volumen de inyección de 2 µL y la temperatura del horno de columna de 37°C.

Validación de metodologías analíticas

La validación de los métodos analíticos se realizó de acuerdo a un protocolo interno que se basó en las recomendaciones de La Unión Europea: decisión de la comisión 2002/657/CE (EC, 2002) y la FDA: VICH GL49 *validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011). Basándose en estos documentos se generó un protocolo interno, el cual contempla la evaluación de diferentes parámetros con el fin de que las metodologías sean

válidas para su uso propuesto; detección y cuantificación de FF y FFA en plumas, músculo e hígado de pollo, en el laboratorio FARMAVET de la Facultad de Ciencias Veterinarias y pecuarias de la Universidad de Chile. Los parámetros evaluados correspondieron a:

1. Tiempo de retención del analito, en donde se analizaron seis repeticiones de droga pura, para analizar su Coeficiente de Variación (CV).
2. Especificidad, para lo cual se analizaron 20 muestras blanco de cada matriz, para determinar que en el tiempo específico en que aparece cada analito en la corrida cromatográfica, no existan interferencias.
3. Límite de detección (LD), en donde se fortificaron muestras a distintas concentraciones y se seleccionó la concentración a la cual la relación señal ruido fuera a lo menos 2 ó 3:1. Esta concentración se repitió 20 veces.
4. Límite de cuantificación (LC), correspondió a la suma del LD y 1,64 veces la desviación estándar (DS) de las 20 repeticiones, realizadas previamente. Se cumplió con el criterio de que la relación señal ruido debe ser como mínimo 10:1.
5. Linealidad de la curva de calibración (CC), se realizaron 3 CC de cinco concentraciones cada una, siendo la concentración más baja igual al LD, las pendientes presentaron un Coeficiente de Determinación (R^2) ≥ 0.95 y un CV $< 25\%$.
6. Recuperación, para su determinación se seleccionaron 18 muestras de material en blanco, los cuales se fortificaron en tres niveles (seis muestras por cada nivel). Mediante el siguiente cálculo se determinó la recuperación para cada nivel de concentración:

$$R (\%) = \frac{\text{Concentración Cuantificada}}{\text{Nivel de Fortificación}} \times 100$$

Los niveles de recuperación se aceptaron dentro de un rango de 80-110%, para las concentraciones de trabajo.

7. Precisión, se obtuvo mediante la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio.

7.1. Repetibilidad, corresponde a que tan preciso es el método bajo las mismas condiciones de trabajo, para ello se eligieron 18 muestras blancos de diferentes fuentes y se fortificaron al nivel de tres puntos de la CC (seis muestras fortificadas a cada nivel).

7.2. Reproducibilidad intralaboratorio, corresponde a que tan preciso es el método bajo la variación de las condiciones de trabajo, para determinar este parámetro, se realizaron seis curvas fortificadas de diferentes fuentes, a los mismos tres niveles que en el caso de la repetibilidad, pero en días diferentes y por otro analista.

Cuantificación de los analitos en muestras experimentales

Las concentraciones detectadas de FF y FFA en las diferentes matrices de estudio, plumas, músculo e hígado de aves, fueron cuantificadas mediante la ecuación de la recta ($y = a+bx$, en donde y = área, a = intercepto en el eje y , x = concentración, b = pendiente) a partir del análisis de regresión lineal, obtenidas según las curvas de calibración en matriz fortificada a concentraciones conocidas extraídas y analizadas. Estas curvas de calibración fueron analizadas junto a las muestras experimentales, y consideradas válidas para efectos de la cuantificación cuando el R^2 fue mayor o igual a 0,95.

Estudio de depleción

Para realizar el análisis de los datos y establecer el periodo (días), en que demora la depleción de los analitos FF y FFA en las matrices de estudio, se siguieron las indicaciones de la

European Medicines Agency EMA (2016). Se cuantificaron las concentraciones de FF y FFA en pluma, músculo e hígado de aves tratadas, en diferentes días escogidos para el muestreo en relación a los días de tratamiento.

Con los resultados de las muestras, se determinaron rangos inter-cuartiles para cada analito y en cada matriz, eliminando así los valores *outliers*, los cuales podrían interferir con la correcta interpretación y análisis de los resultados. Los resultados se llevaron a una gráfica en escala semilogarítmica de concentración v/s tiempo. Se realizó un análisis de regresión lineal en la fase final de eliminación considerado 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 establecido para la técnica para la matriz plumas. El tiempo de depleción se determinó cuando la pendiente al 95% de confianza intersectó el LD establecido para metodología.

RESULTADOS

Objetivo específico 1. Implementar y validar metodologías analíticas por LC MS/MS para la detección y cuantificación de florfenicol y florfenicol amina en las matrices plumas, músculo e hígado de aves de engorda.

Implementación de las metodologías analíticas

Para la detección y cuantificación de los analitos Florfenicol y Florfenicol amina a partir de las matrices biológicas (plumas, músculo e hígado), se utilizaron como referencia cuatro metodologías analíticas descritas en la literatura:

1. *Simultaneous determination of residues of florfenicol and florfenicol amine in fish by high-performance liquid chromatography* (Hormazabal *et al.*, 1993).
2. *Determination of florfenicol amine residues in aquaculture species by HPLC with UV detection* (V.I. o Draft #3) *Drugs safety and metabolism-animals health shering ploug research institute Lafayette NI 27853* (USDA, 2010).
3. *Residue depletion of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in swine tissues after intramuscular administration* (Li *et al.*, 2006).
4. *Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (Zhang *et al.*, 2008).

A partir de estas referencias se formularon dos cartas de trabajo con las metodologías analíticas para la extracción de los analitos; una carta para plumas y otra para los tejidos comestibles (músculo e hígado) (Anexos 3 y 4), debido a las diferencias de composición que presentan las plumas con respecto a los tejidos comestibles.

Posteriormente, para determinar si el método analítico implementado extrae los analitos de interés a partir de las matrices biológicas a analizar, estos fueron detectados cromatográficamente, mediante las masas y tiempos de retención específicos para FF y FFA (Tabla 1). Conjuntamente se determinó la linealidad ($R^2 > 0,95$), mediante curvas de calibración fortificadas en cinco concentraciones diferentes y equidistantes de: 20, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabla 1. Masas de iones parental, producto y tiempos de retención promedios de FF, FFA y CAF-D5

Analito	Masas Ion Parental	Masas Ion Producto	Tiempos de retención
FF	356,0	336,0	1,4 min
		185,0	
FFA	248,0	230,0	1,07 min
		130,0	
CAF-D5	326,0	157,0	1,47 min

Validación de metodologías analíticas

Para la validación de los tres métodos analíticos se trabajó con un protocolo interno, el cual se basó en las guías de validación de La Unión Europea: decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE (EC, 2002) y la FDA: VICH GL49 *validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011). Establecido este protocolo se determinaron los parámetros de:

1. Tiempo de retención del analito

En la determinación del tiempo de retención se analizó el CV (%) de las seis inyecciones de estándar puro realizadas, y se observó cual variable se mantuvo el tiempo de retención de los analitos en los seis análisis, el criterio para aceptar el parámetro valido fue respecto al CV (%) el cual debía ser menor al 5% de variación para los dos analitos de interés, Florfenicol y Florfenicol amina. Los promedios de los tiempos de retención y los respectivos CV (%) se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Promedio y CV (%) de los tiempos de retención de las seis inyecciones de droga pura de FF y FFA.

Analito	Promedio de los tiempos de retención	CV%
FF (356,0/336,0)	1,40 min	2,76%
FFA (248,0/230,0)	1,07 min	0,70%

2. Especificidad

Para comprobar la especificidad del método analítico se determinó si existían interferencias en el tiempo de retención de FF y FFA mediante el análisis de las 20 muestras libres de antimicrobianos provenientes de distintas fuentes, para cada matriz (pluma, músculo e hígado). Dentro del grupo de muestras analizadas, los resultados demostraron que no hay presencia de interferentes en el tiempo de retención específico para estos analitos, en las tres matrices biológicas. En la Figuras 1, 2 y 3 se muestran los cromatogramas a partir de la inyección de una droga pura y a partir de muestras de pluma, músculo e hígado libres de residuos de FF y FFA, en donde no se observan interferentes en los tiempos de retención respectivos para cada analito.

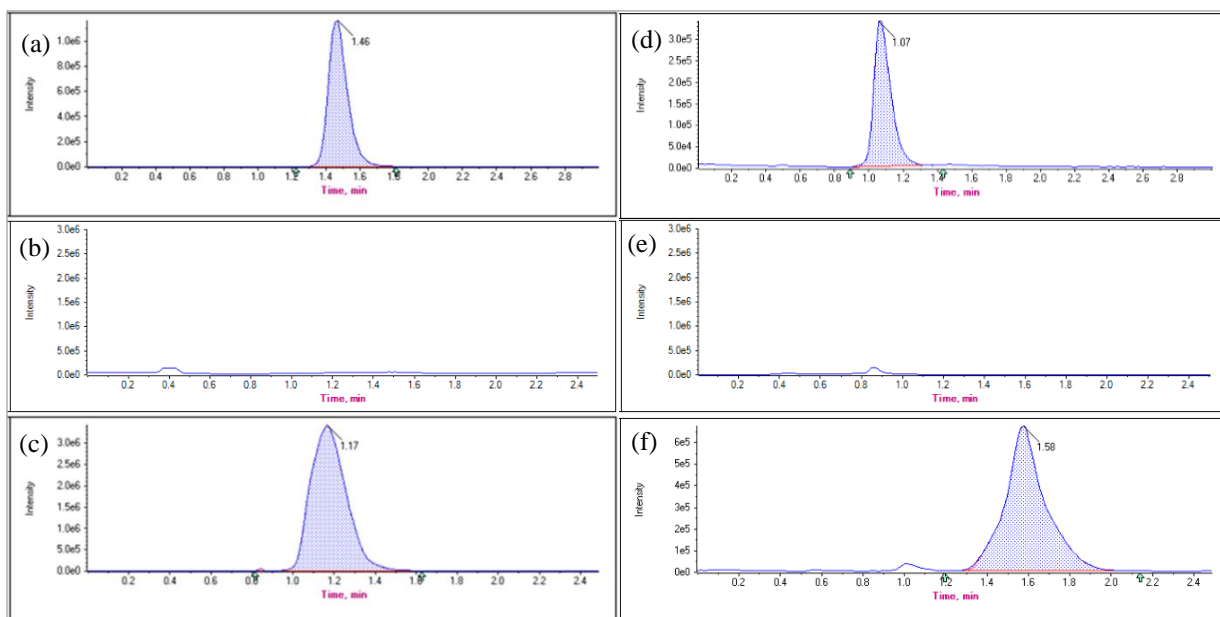


Figura 1. Cromatogramas a partir de muestras de plumas (a) inyección de estándar puro de FF, (b) muestra blanco (c) muestra fortificada con estándar de FF al LD ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$), (d) inyección de estándar puro de FFA, (e) muestra blanco, (f) muestra fortificada con estándar de FFA al LD ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$).

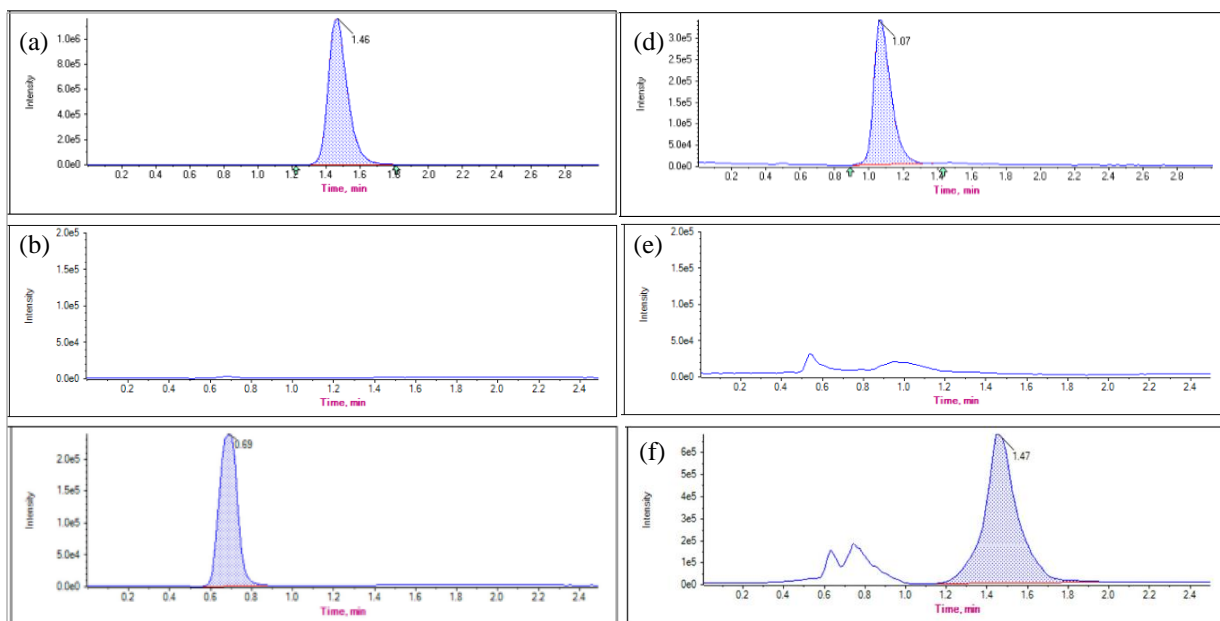


Figura 2. Cromatogramas a partir de muestras de músculo (a) inyección de estándar puro de FF, (b) muestra blanco (c) muestra fortificada con estándar de FF al LD ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$), (d) inyección de estándar puro de FFA, (e) muestra blanco, (f) muestra fortificada con estándar de FFA al LD ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$).

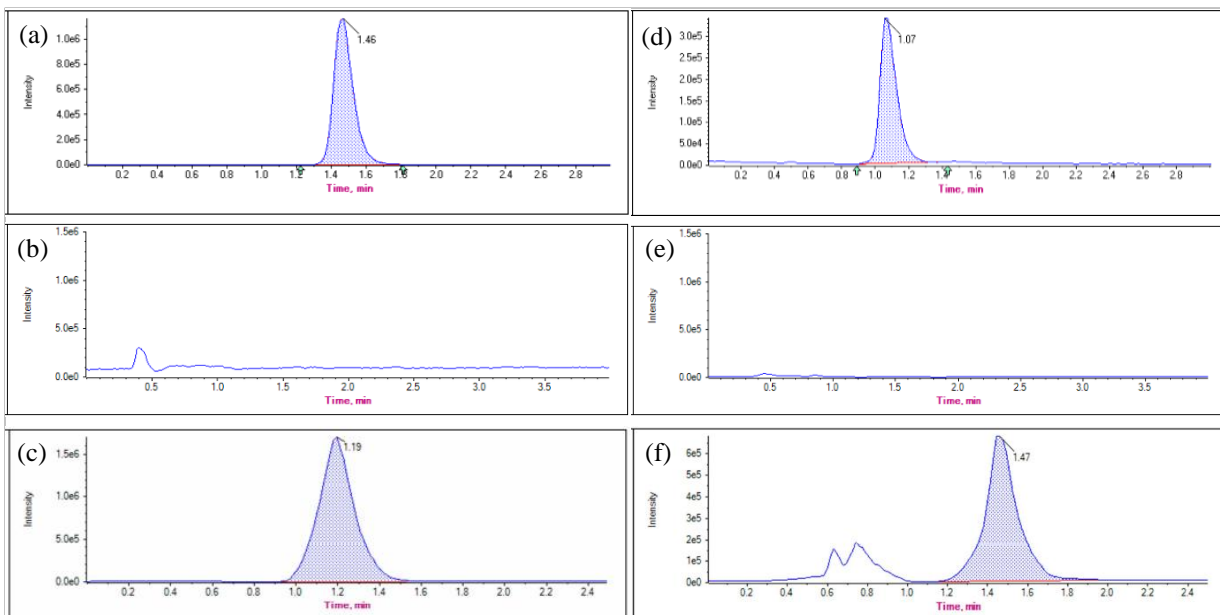


Figura 3. Cromatogramas a partir de muestras de hígado (a) inyección de estándar puro de FF, (b) muestra blanco (c) muestra fortificada con estándar de FF al LD ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$), (d) inyección de estándar puro de FFA, (e) muestra blanco, (f) muestra fortificada con estándar de FFA al LD ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$).

3. Límite de detección (LD)

Para la definición del límite de detección, la concentración seleccionada cumplió con el criterio en donde la relación señal ruido fuera mayor a 3:1, determinándose un nivel para el límite de detección de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en la matriz plumas, músculo e hígado.

Para la validación del parámetro se realizaron 20 repeticiones de la concentración seleccionada en matriz fortificada. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el CV (%) de las 20 repeticiones, con una variación menor al 25%. Los resultados obtenidos del análisis de las 20 repeticiones en las tres matrices se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Promedio, desviación estándar y CV de las concentraciones detectadas de FF y FFA en las 20 repeticiones fortificadas al LD en las matrices biológicas plumas, músculo e hígado.

20 repeticiones de LD en matriz					
Matriz biológica	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Analito	Promedio	Desviación estándar	CV (%)
Pluma	20	FF	17,601	2,685	15,25
		FFA	19,722	2,719	13,79
Músculo	20	FF	18,498	1,046	5,66
		FFA	21,045	2,589	12,30
Hígado	20	FF	21,567	0,171	3,32
		FFA	20,604	1,690	8,20

4. Límite de cuantificación (LC)

Para la definición del LC, a la concentración definida para el LD se le sumo 1,64 veces la desviación estándar de las concentraciones cuantificadas a partir de las 20 repeticiones de los análisis en matriz fortificada al LD. El parámetro se aceptó debido a que la relación señal ruido fue mayor a 10:1. Se definió un LC de 24,4; 21,7 y 21,2 para FF y de 24,5; 24,2 y 22,8 para FFA en pluma, músculo e hígado, respectivamente (Tabla 4). Estas concentraciones corresponden a la mínima concentración que puede ser cuantificada de forma precisa por el método analítico para las diferentes matrices.

5. Linealidad de la curva de calibración (CC)

Para la validación del parámetro se realizaron tres curvas de calibración de cinco niveles, las concentraciones correspondieron a: 20, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para cada una de las tres matrices, con el fin de determinar la linealidad del método (Figura 4). Estas concentraciones fueron definidas teniendo en cuenta el LD y LMR establecido para la matriz músculo por la decisión de la Comisión Europea (CE, 2009a). La linealidad de las curvas de calibración fue aceptada debido a que el coeficiente de determinación (R^2) fue mayor a 0,96 en las tres matrices, cumpliendo con el criterio de aceptación, en donde el R^2 debía ser mayor o igual a 0,95. Además el CV de las curvas de calibración fue menor a un 25% de variación por lo cual el parámetro es aceptable (Tabla 4).

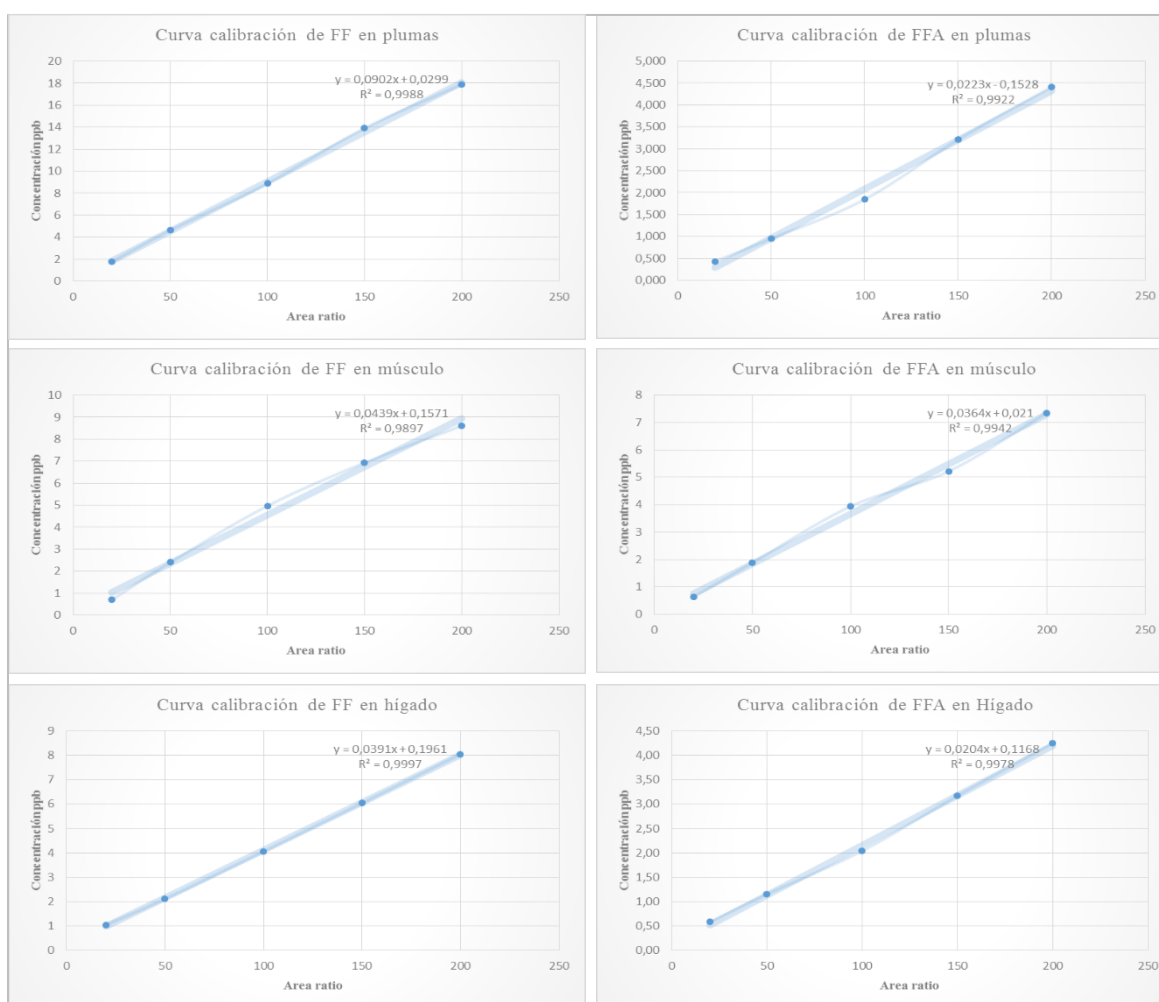


Figura 4. Curvas de calibración de cinco niveles de concentración (20, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$), en las matrices pluma, músculo e hígado.

Tabla 4. Linealidad, recuperación, repetibilidad, reproducibilidad, LD y LC de los analitos FF y FFA en las matrices biológicas: pluma, músculo e hígado.

Matriz	Analito	Linealidad	Recuperación	Repetibilidad	Reproducibilidad	LD	LC
		$R^2 \geq 0,95$ CV < 25%	(%) al LD 70-110%	(%) al LD CV > Repro.	(%) al LD CV < 35%	($\mu\text{g kg}^{-1}$)	($\mu\text{g kg}^{-1}$)
P L U	FF	$R^2 > 0,99$	100,0%	10,1%	19,4%	20	24,4
		CV = 0,04%					
M A S	FFA	$R^2 > 0,99$	102,0%	15,6%	20,8%	20	24,5
		CV = 0,14%					
M Ú S	FF	$R^2 > 0,98$	85,0%	18,6%	23,6%	20	21,7
		CV = 0,29%					
C U L O	FFA	$R^2 > 0,96$	100,2%	10,6%	17,7%	20	24,2
		CV = 1,49%					
H I G	FF	$R^2 > 0,96$	106,7%	3,8%	13,1%	20	21,2
		CV = 1,71%					
A D O	FFA	$R^2 > 0,97$	110,6%	7,2%	24,4%	20	22,8
		CV = 1,15%					

6. Recuperación

La recuperación fue calculada con muestras blanco fortificadas en tres niveles de concentraciones 20, 100 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Los analitos FF y FFA presentaron una recuperación para el LD de un 100% y 102% con un CV de un 10% y 16%, respectivamente en matriz plumas. En el caso de las muestras de músculo la recuperación que se obtuvo fue de un 85% y 100% con un CV de un 39% y 23%, respectivamente. En las muestras de hígado se obtuvo una recuperación de un 106% y 110% con un CV de un 4% y 7% para los analitos FF y FFA respectivamente. En la Tabla 5 se muestran los promedios, desviación estándar (DS) y CV (%) para los dos analitos y para todas las concentraciones de trabajo (20, 100 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$), según las matrices biológicas.

De acuerdo a los valores determinados por la FDA: VICH GL49. Se consideró un rango aceptable de recuperación para las concentraciones de trabajo entre un 80 a 110%. Por lo tanto, las recuperaciones obtenidas se aceptan ya que se cumple con el parámetro de recuperación.

Tabla 5. Promedios, desviación estándar y CV (%) de las recuperaciones de los analitos FF y FFA a partir de las matrices biológicas, según las concentraciones de trabajo 20, 100 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Matriz	Analito	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperación (%) (promedio)	Desviación estándar (DS)	CV (%)
P	FF	20	100	0,10	10
L		100	99	0,04	4
U		200	100	0,01	1
M	FFA	20	102	0,16	16
A		100	99	0,06	6
S		200	100	0,01	1
M	FF	20	85	0,33	39
Ú		100	105	0,12	11
S		200	98	0,03	3
C	FFA	20	100	0,23	23
U		100	99	0,08	8
L		200	100	0,02	2
O					
H	FF	20	106	0,04	4
I		100	97	0,02	2
G		200	100	0,004	0,4
A	FFA	20	110	0,08	7
D		100	96	0,03	3
O		200	100	0,01	1

7. Precisión

La precisión se evaluó mediante el análisis de la repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio. Para la repetibilidad se realizaron seis curvas para cada matriz, en un día, por un analista, con el mismo lote de reactivos/solventes y analizadas el mismo día. Las curvas fueron fortificadas a tres niveles de concentración: 20, 100 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Se calculó el promedio, la DS y el CV (%) para cada nivel de fortificación (Tabla 6), los resultados se

compararon con los resultados de las seis curvas realizadas para la reproducibilidad intralaboratorio (Tabla 7), a los mismos niveles de fortificación pero realizadas por dos analistas, en dos días diferentes y con lotes de reactivos/solventes distintos.

Los CV de la reproducibilidad intralaboratorio fueron menores a un 35% de variación para las concentraciones de fortificación de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y de un 23% de variación para la concentración de 100 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para los dos analitos detectados, como se especifica en los criterios de validación establecidos en el protocolo de validación. A su vez los CV (%) de la repetibilidad fueron menores a los CV (%) de la reproducibilidad intralaboratorio, como señala el criterio de aceptación de la Decisión 657/2002 de la unión europea (EC, 2002) (Tabla 4). Según los resultados obtenidos los parámetros se aceptan, por lo cual el método descrito es preciso.

Tabla 6. Repetibilidad, muestra el promedio, DS y CV de las concentraciones cuantificadas para cada nivel de fortificación de 20, 100 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Precision: Repetibilidad					
Matriz	Analito	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentración cuantificada ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (promedio)	Desviación estandar (DS)	CV (%)
P	FF	20	20,0	2,02	10,11
L		100	100,0	3,64	3,64
U		200	200,0	1,63	0,82
M	FFA	20	20,5	3,19	15,58
A		100	99,1	5,75	5,80
S		200	200,4	2,57	1,28
M	FF	20	14,7	2,73	18,63
Ú		100	109,4	5,01	4,58
S		200	195,9	2,27	1,16
C	FFA	20	17,1	1,82	10,64
U		100	105,2	3,28	3,12
L		200	197,7	1,45	0,73
O					
H	FF	20	21,3	21,3	3,83
I		100	97,8	97,8	1,60
G		200	201,0	201,0	0,35
A	FFA	20	22,1	1,60	7,25
D		100	96,2	2,89	3,00
O		200	201,7	1,28	0,63

Tabla 7. Reproducibilidad intralaboratorio, muestra el promedio, DS y CV de las concentraciones cuantificadas para cada nivel de fortificación de 20, 100 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Precision: Reproducibilidad intralaboratorio					
Matriz	Analito	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentración cuantificada ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (promedio)	Desviación estandar (DS)	CV (%)
P	FF	20	17,5	3,38	19,36
L		100	104,6	6,08	5,82
U		200	198,0	2,69	1,36
M	FFA	20	23,3	4,85	20,84
A		100	94,1	8,72	9,27
S		200	202,6	3,87	1,91
M	FF	20	17,3	4,09	23,59
Ú		100	104,8	7,69	7,34
S		200	197,9	3,42	1,73
C	FFA	20	19,4	3,43	17,66
U		100	101,0	6,18	6,11
L		200	199,6	2,73	1,37
O					
H	FF	20	19,7	2,58	13,13
I		100	100,4	4,61	4,59
G		200	199,8	2,07	1,03
A	FFA	20	23,8	5,80	24,42
D		100	93,2	10,44	11,20
O		200	203,0	4,65	2,29

Objetivo específico 2. Detectar y cuantificar concentraciones de los analitos florfenicol y florfenicol amina en plumas, músculo e hígado de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de florfenicol autorizada para su uso en aves de engorda en dosis terapéutica.

Las concentraciones de FF y FFA en músculo, hígado y plumas de pollos broiler fueron cuantificadas mediante un análisis de regresión lineal de las curvas de calibración en matriz fortificada, considerando un coeficiente de determinación (R^2) $\geq 0,95$.

Cuantificación de FF Y FFA en músculo de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial.

En la cuantificación de los analitos en la matriz músculo las concentraciones determinadas al día 5 post-tratamiento cuantificaron bajo el Límite Máximo Residual (LMR) para la matriz músculo, establecido en Chile y por la Unión Europea. En el caso específico del metabolito FFA no se detectaron concentraciones en ningún punto de muestreo. En la Tabla 8 se muestran las concentraciones promedio determinadas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de FF y FFA, para los diferentes días post-tratamiento en esta matriz.

Tabla 8. Concentración de FF y FFA en músculo de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial para aves de engorda (florfenicol al 10%)

Número de muestreo	Días Post-tratamiento	Edad pollos (días)	Concentración promedio FF ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentración promedio FFA ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentración promedio FF + FFA ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	5	15	65,4	<LD*	65,4
2	10	20	<LD*	<LD*	<LD*
3	15	25	<LD*	<LD*	<LD*
4	20	30	<LD*	<LD*	<LD*

LD* (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$)

Cuantificación de FF Y FFA en hígado de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial.

Los resultados para la matriz hígado, muestran que las concentraciones determinadas a partir del día 5 post-tratamiento cuantificaron bajo el LD de la metodología analítica, condición que se observó en los siguientes cuatro puntos de muestreo. En la Tabla 9 se muestran las concentraciones promedio determinadas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de FF y FFA, para los diferentes días post-tratamiento en esta matriz.

Tabla 9. Concentración de FF y FFA en plumas de pollos broiler tratados con na formulación farmacéuticas comercial para aves de engorda (florfenicol al 10%)

Número de muestreo	Días Post-tratamiento	Edad pollos (días)	Concentración promedio FF ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentración promedio FFA ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentración promedio FF + FFA ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	5	15	<LD*	<LD*	<LD*
2	10	20	<LD*	<LD*	<LD*
3	15	25	<LD*	<LD*	<LD*
4	20	30	<LD*	<LD*	<LD*

LD* ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$)

Cuantificación de FF Y FFA en pluma de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial.

Los resultados del estudio muestran que en las plumas al día 5 post-tratamiento, se detectaron altas concentraciones de FF y FFA, en donde el promedio de las concentraciones detectadas fue de $4164,32 \mu\text{g kg}^{-1}$. Al día 10 post-tratamiento, las concentraciones de los analitos en esta matriz, disminuyeron aproximadamente en un 47%, llegando a una concentración promedio de $1976,91 \mu\text{g kg}^{-1}$. Sin embargo, y a pesar de esta declinación en las concentraciones detectadas, al día 30 post-tratamiento, correspondiente al periodo de resguardo establecido en músculo, para la formulación farmacéutica utilizada (florfenicol al 10%), las concentraciones detectadas y cuantificadas en plumas, sobrepasaban al LMR establecido por Chile y la Unión Europea para músculo ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$), estas se cuantificaron en un nivel promedio de $228,98 \mu\text{g kg}^{-1}$, para el principio activo y residuo marcador. Esta condición se

mantuvo hasta el día 40 post-tratamiento donde las concentraciones detectadas seguían cuantificando por sobre los LMR establecidos en músculo. En la Tabla 10 se muestran las concentraciones promedio de FF y FFA, según los días post-tratamiento.

Tabla 10. Concentración de FF y FFA en plumas de pollos broiler tratados con na formulación farmacéuticas comercial para aves de engorda (florfenicol al 10%)

Número de muestreo	Días Post-tratamiento	Edad pollos (días)	Concentración promedio FF ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentración promedio FFA ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentración promedio FF + FFA ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	5	15	3701,86	459,46	4161,32
2	10	20	1922,28	72,84	1976,91
3	15	25	1872,95	26,96	1876,80
4	20	30	588,79	<LD*	588,79
5	25	35	432,19	36,42	459,50
6	30	40	221,79	28,78	228,98
7	35	45	172,80	<LD*	172,80
8	40	50	116,23	<LD*	116,23

LD* (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$)

Objetivo específico 3. Evaluar la depleción de las concentraciones cuantificadas de florfenicol y florfenicol amina en plumas de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial y comparar estas concentraciones con las cuantificadas en los tejidos comestibles (músculo e hígado), en los mismos tiempos de muestreo.

El tiempo de depleción para plumas se determinó siguiendo las indicaciones de EMA (2016) *Note for guidance: approach towards harmonization of withdrawal periods.*

Los resultados obtenidos de las cuantificaciones se llevaron a una gráfica en escala semi-logarítmica de concentración versus tiempo (Figura 5) y se realizó un análisis de regresión lineal, considerando un nivel de confianza del 95%. A partir de esta gráfica, se determinó el día en que las concentraciones fueron iguales o menores al LD establecido para la metodología analítica. En esta matriz, el LD se alcanzó al día 98,93, debido a que este valor coincide con una fracción de un día, el tiempo de depleción se considera adicionando otro día, por lo cual se consideran 99 días para que con un 95% de confianza las concentraciones de FF y FFA se encuentren iguales o menores al LD ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) determinado.

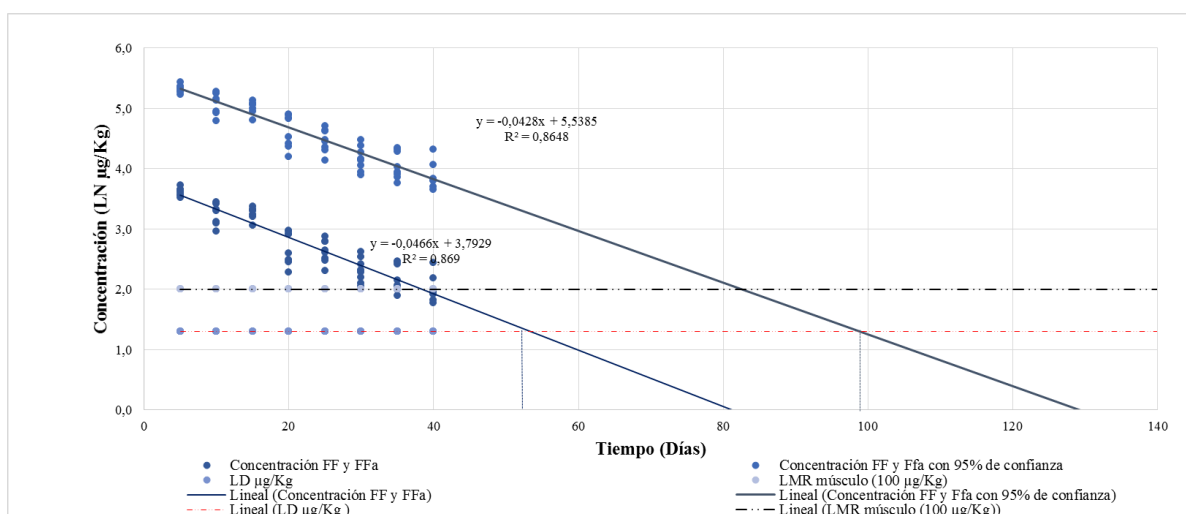


Figura 5. Depleción de florfenicol y florfenicol amina en plumas de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica de Florfenicol al 10%.

DISCUSIÓN

La validación de las metodologías analíticas se realizó bajo un protocolo de validación interno que se estableció en base a las guías de validación de la Comunidad Europea y de la FDA, con el fin de demostrar que el método era apto para su uso, es decir para el propósito determinado, que es detectar y cuantificar florfenicol y florfenicol amina en pluma, músculo e hígado.

Previamente a la validación se realizó la implementación de las metodologías, paso fundamental, en donde se establecieron las cartas de trabajo que contienen los pasos para la extracción química de los analitos a partir de las matrices biológicas. Fueron establecidas dos cartas de trabajo a partir de trabajo previamente publicado (Hormazabal *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; USDA, 2010), estas cartas diferían en algunos aspectos, debido a que las matrices son muy diferentes en cuanto a estructura y presencia de interferentes como grasa y proteínas. En conjunto a esto, se establecieron las condiciones analíticas para las tres matrices.

Durante la validación y a partir de las pruebas realizadas en matriz fortificada de pluma, músculo e hígado se definió un límite de detección de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ con una relación señal ruido mayor a 3:1, para las tres matrices (FDA, 2011). El CV (%) de las 20 repeticiones al LD para las tres matrices fue menor a un 25%, cumpliendo con el criterio de aceptación del parámetro establecido en la decisión 657/2002 de la Unión Europea (EC, 2002), de esta forma se considera que los datos son estadísticamente homogéneos, por lo tanto se acepta el LD. Esta concentración se interpreta como la cantidad mínima de florfenicol y florfenicol amina que puede ser detectada por el método analítico en plumas, músculo e hígado de pollo. El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito que debe presentar una muestra para poder ser cuantificada certeramente. De este modo, se puede determinar que el método es capaz de cuantificar confiablemente cantidades mínimas de FF y FFA en plumas, músculo e hígado a concentraciones iguales o mayores a $24,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para los dos analitos en las tres matrices. Si la muestra presenta una concentración menor al LC pero mayor al LD, se puede decir que existe la presencia de los analitos pero no pueden ser cuantificados de forma precisa. Por otra parte si las concentraciones se encuentran por debajo del LD, las concentraciones de los analitos son no detectadas.

Respecto al tiempo de retención de los analitos en las diferentes matrices, se observaron algunas diferencias, las cuales se encontraban dentro del 5% de variación. Esto se atribuye a la presencia de interferentes como grasa y proteínas, lo que produce un retraso en el tiempo al cual aparece la expresión cromatográfica del analito. Las curvas de calibración se realizaron en intervalos de trabajo de 20, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, y presentaron una linealidad con un R^2 mayor a 0,96, cumpliendo el requisito establecido en la decisión 657/2002/EC para las tres matrices. La regresión lineal obtenida es el diseño del modelo matemático, representado en la ecuación que permite simular el comportamiento de la variable dependiente respecto de la variable independiente. La ecuación de la recta es $y = a+bx$, en donde $y = \text{área}$, $a = \text{intercepto en el eje y}$, $x = \text{concentración}$, $b = \text{pendiente}$. Los métodos implementados para las tres matrices demostraron ser lineales, lo que significa que la respuesta otorgada por el espectrómetro de masas expresada como área ratio (relación del área cuantificada del analito de interés y del estándar interno), es proporcional a la concentración de analito presente en la muestra y por lo tanto, se puede concluir que los métodos son cuantitativos.

Para la recuperación de las metodologías, la cual refleja la extracción del analito a partir de la matriz biológica. Las recuperaciones de todos los analitos en las tres matrices se encuentran dentro de los rangos de aceptación según la decisión 657/2002 de la UE que fija un rango entre 80 y 110% para las concentraciones de trabajo. Siendo un 85% y un 110% la menor y mayor porcentaje de recuperación respectivamente para los cuatro analitos en las tres matrices. Esto indica que los métodos poseen una buena capacidad de extracción del analito a partir de las matrices biológicas estudiadas.

La precisión se evaluó por medio de la reproducibilidad intralaboratorio y la repetibilidad. Para el caso de la reproducibilidad, que corresponde a la precisión bajo condiciones de trabajo diferente, se realizaron seis curvas a concentraciones de 20, 100 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ realizadas en dos días diferentes, por dos analistas diferentes y con distintos lotes de reactivos y solventes. En cambio para la reproducibilidad que corresponde a la precisión bajo las mismas condiciones de trabajo, se realizaron las mismas seis curvas en las mismas concentraciones, pero el mismo día, por el mismo analista y el mismo lote de reactivos y solventes. Los resultados para todos los analitos en las tres matrices cumplen con el criterio de aceptación,

el cual determina un CV (%) para la reproducibilidad menor a un 35% para las concentraciones de trabajo y la repetibilidad menor o igual a la reproducibilidad.

Con los resultados obtenidos se puede afirmar que el método es reproducible y repetitivo y por lo tanto preciso, ya que no existen variaciones importantes en la recuperación de los métodos al ser realizados en diferentes días, por diferentes analistas y distintos lotes de solventes/reactivos.

Las concentraciones de trabajo escogidas para esta validación, se determinaron según los LMR establecidos por la Unión Europea para músculo de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (CE, 2009a). Estos LMR son los mismos establecidos para Chile en el reglamento sanitario de los alimentos en la resolución exenta N°551/2014 que fija los límites máximos residuales (Chile. Ministerio de Salud, 2014).

La importancia de este estudio es que mediante la implementación y validación de las metodologías analíticas es posible detectar estos antimicrobianos en pluma, músculo e hígado de forma confiable y precisa, constituyendo la base del estudio de depleción en las tres matrices. En los Anexos 5, 6 y 7 se muestran los resúmenes de validación para cada matriz de trabajo, junto con las especificaciones analíticas.

En cuanto a los estudios de depleción, en la actualidad existen diferentes estudios de estas drogas en diferentes productos de la industria avícola, como el estudio realizado por Zhang et al., 2008 en donde ese grupo de investigadores determinaron FF y FFA en músculo de pollo, y el estudio realizado por Filazi *et al.* (2014) en donde detectaron estos mismos analitos en huevo. Sin embargo a la fecha no existe ningún estudio realizado en plumas de aves de engorda que relacione además las concentraciones detectables en los tejidos comestibles.

Por lo tanto este es el primer estudio que evalúa el comportamiento de este antibiótico en la matriz plumas, y su comparación con las concentraciones detectadas en los tejidos comestibles. Estos resultados son importante y contribuyen a otras publicaciones sobre este tema realizados por San Martin et al., (2007), Cornejo et al., (2010) y Cornejo et al., (2012) en donde realizaron estudios de depleción de fluoroquinolonas en tejidos de pollos y bioacumulación en plumas, demuestran que la concentraciones de antimicrobianos de esta familia se acumulan en concentraciones mayores que las presentes en los tejidos, por periodos de tiempo más prolongados, una vez finaliza la terapia y respetados los periodos de

resguardo establecidos para las formulaciones empleadas. Es por esto que es importante no solo determinar la concentración y acumulación de residuos en plumas, si no relacionarla con concentraciones cuantificadas en tejidos comestibles.

La importancia de estudiar las concentraciones de antimicrobianos presentes en las plumas es que estos subproductos son incorporados como harinas en la alimentación de otros animales. De esta forma se describe que son parte de la alimentación de otros animales destinados a consumo humano. Se calcula que del peso vivo de los pollos producidos, aproximadamente el 37% no se consume directamente por los seres humanos convirtiéndose en fuente de materia prima utilizada para piensos (Meeker y Hamilton, 2006; Divakala et al., 2009). Considerando que en Chile se produjeron 567.004,20 toneladas de carne de pollo en el año 2014 (APA, 2015), la cantidad de subproductos producidos es importante. Como ejemplo en EEUU se produjo 604 millones de kg de harina de plumas de los que se exportó un 12% aproximadamente y el 84% restante se utilizó en el país (Swisher, 2008). Este aspecto cobra relevancia ya que existe evidencia de que concentraciones de antibióticos permanecen en las harinas de plumas, es decir después del procesamiento de hidrólisis de las plumas. En un estudio realizado por un grupo de investigadores (Love et al., 2012) en donde se muestrearon directamente las harinas de plumas se detectaron en todas las muestras al menos 2 familias de antimicrobianos.

De esta forma, las plumas son una fuente importante en la ruta de reingreso de residuos de antimicrobianos a la cadena alimenticia, convirtiéndose en un riesgo para la salud pública, principalmente por el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos.

En este estudio se observa que la depleción de FF y FFA, en plumas de pollos broiler, fue lenta, observándose una declinación de las concentraciones de florfenicol y florfenicol amina de acuerdo a los puntos de muestreo que correspondieron a los días 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 post-tratamiento. De esta forma se evidenciaron concentraciones detectables durante todo el estudio, permaneciendo sobre los $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (LMR establecido para músculo). Comparando estos resultados con los obtenidos en los tejidos comestibles, se puede afirmar que en el momento en el cual las concentraciones de florfenicol y florfenicol amina en los tejidos comestibles (músculo e hígado) se encuentran por debajo de los LMR permisibles o incluso en concentraciones no detectables por la metodología analítica, en las plumas es

posible detectar y cuantificar estos analitos. Inclusive estas concentraciones sobrepasan a los LMR establecidos para músculo.

Por su parte estas altas concentraciones detectadas en plumas no pueden ser atribuidas a contaminación externa, ya que las aves fueron criadas en jaulas de piso elevado, evitando contaminación fecal, el alimento no fue medicado y analizado previamente ante la presencia de residuos de antibióticos. Es por este motivo que estas altas concentraciones podrían explicarse por las características farmacocinéticas del antibiótico, ya que es rápida y eficientemente absorbido en el tracto gastrointestinal, es ampliamente distribuido a tejidos extravasculares, y presenta buena penetración tisular, con reabsorción a nivel tubular (Anadón *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2010). En conjunto a esto las concentraciones a nivel de tejidos no fueron detectadas y solo se observó en la matriz plumas, lo que se atribuye a que el fármaco fue detectado directamente de esta matriz, y no se atribuye una contaminación externa a través de la glándula uropigial de las aves, la cual corresponde al órgano responsable de la producción de una mezcla de ácidos grasos y ésteres que se distribuye en el plumaje durante el acicalamiento (Sandilands *et al.*, 2004). En conjunto a esto Cornejo *et al.* (2010), sugieren que la generación y cambio de plumaje determinarían la cinética de los fármacos en plumas, ya que durante la madurez, los pollitos experimentan un cierto número de cambios de plumaje.

Considerando la evidencia científica y los resultados obtenidos en este estudio se puede afirmar que existe traspaso de concentraciones del antibiótico florfenicol a las plumas. Es por este motivo y teniendo en cuenta la importancia para la Salud Pública, estos residuos podrían ser un riesgo ante la posibilidad de generar efectos adversos sobre la población, ya que son una fuente potencial de reingreso de antibióticos a la cadena alimenticia, al ser utilizadas en la alimentación de otras especies productivas como harina de plumas. Además de esto es importante considerar la posible contaminación medioambiental, al ser utilizadas como fertilizante.

Es por este motivo que se debe seguir investigando la ruta de reingreso de residuos de otras familias de antimicrobianos a través de la cadena alimentaria y su relación con las concentraciones presentes en los tejidos.

CONCLUSIONES

La cromatografía líquida de alta resolución asociada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS), es una herramienta altamente selectiva, específica, y confirmatoria, que permite la detección y cuantificación de estos analitos en las tres matrices de estudio.

El estudio de depleción muestra que el antimicrobiano Florfenicol y su metabolito activo florfenicol amina podrían perdurar en las plumas por un periodo prolongado, permaneciendo en concentraciones iguales o mayores al LD ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) hasta los 99 días post-tratamiento con un 95% de confianza. Este aspecto es de gran relevancia, debido a que las plumas son utilizadas para la alimentación de otras especies productivas, es por este motivo que es necesario que se monitoree y fiscalice el uso de piensos que contengan derivados de plumas, para así evitar el reingreso de residuos farmacológicos en la cadena alimenticia.

Los resultados obtenidos a partir este estudio de investigación sustentan la suposición de un posible traspaso de residuos antimicrobianos a la cadena alimenticia, mediante la matriz plumas y se confirma la hipótesis planteada de que residuos de florfenicol y su metabolito activo florfenicol amina se mantienen en plumas de pollos broiler tratados con este antimicrobiano, en concentraciones mayores y por tiempos más prolongados que en los tejidos comestibles (músculo e hígado)

Considerando los datos obtenidos en el presente estudio, un futuro estudio sobre la harina de plumas ya procesadas podría mostrar y determinar el comportamiento de estos antimicrobianos una vez procesada esta matriz. De esta misma forma la matriz pluma podría contribuir a la detección de otros residuos de forma no invasiva, ya que se puede inferir que estas estructuras por sus características, podrían bioacumular tanto diferentes medicamentos de uso veterinario como sustancias prohibidas.

BIBLIOGRAFÍA

- **ANADÓN, A.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ, M.; RÍOS, A.; CABALLERO, V.; ARES, I.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.** 2008. Plasma and tissue depletion of florfenicol and florfenicol-amine in chickens. *J. Agric. Food Chem.* 56: 11049-11056.
- **ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.** 2012. Capítulo 21 Residuos de medicamentos de uso veterinario. **In:** *Toxicología alimentaria*. 5ª ed. Díaz de Santos. pág. 394-412.
- **ARUNLERTAREE, C.; MOOLTHONGNOI, C.** 2008. The use of fermented feather meal for replacement of fish meal in the diet of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Nat. Resour. J.* 6:13-24.
- **BERENDSEN, B.; BOR, G.; GERRITSEN, H.; JANSEN, L.; ZUIDEMA, T.** 2013. The disposition of oxytetracycline to feathers after poultry treatment. *Food Addit. Contam.* 30 (12): 2102–2107.
- **CE. COMISIÓN EUROPEA.** 2009a. Regulación N° 37/2010 de 22 de diciembre de 2009 sobre sustancias farmacológicamente activas y su clasificación respecto de los límites máximos residuales en productos alimenticios de origen animal. *Diario oficial de la Unión Europea*. L 15: 1-72.
- **CE. COMISIÓN EUROPEA.** 2009b. Reglamento (CE) N° 1099/2009 del Consejo de 24 de septiembre de 2009 relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza. *Diario oficial de la Unión Europea*. L 303: 1-30.
- **CE. COMISIÓN EUROPEA.** 2010. Directiva 2010/63/UE. *Diario oficial de la Unión Europea*. L 276: 33-79.

- **CHANG S., DAVIS J., CHENG C., SHIEN R., HSIEH M., KOH B., CHOU C.** 2010. Pharmacokinetics and tissue depletion of florfenicol in Leghorn and Taiwan Native chickens. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 33: 471-479.
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 2009. Ley 20.380 sobre protección de animales. 03 octubre 2009.
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 2014. Resolución exenta N°551, fija límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos para consumo humano.
- **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 MARTIN, B.** 2010. Depletion study of three formulations of flumequine in edible tissues and drug transfer into chicken feathers. *J. vet. Pharmacol. Therp.* 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, 14-16 May, 2012. Volume 1, 2 and 3 2012 pp. 683-688
- **DIVAKALA, K.; CHIBA, L; KAMALAKAR, R; RODNING, S; WELLES, E; CUMMINS, K; SWANN, J; CESPEDES F; PAYNE, R.** 2009. Amino acid supplementation of hydrolyzed feather meal diets for finisher pigs. *J. Anim. Sci.* 87:1270-1281.

- **EC. EUROPEAN COMMISSION.** 2002. Comisión 2002/657/EC of Journal Europ. Comm. 221: 8-36.
- **EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY.** 2016. Guideline on approach towards harmonisation of withdrawal periods. EMA/CVMP/SWP/735325/2012.
- **FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2011. VICH GL49 validation of analytical methods used in residue depletion studies. 22 p.
- **FILAZI A., SIRELI U.T., YURDAKOK B., AYDIN F.G., KUCUKOSMANOGLU AG.** 2014. Depletion of florfenicol and florfenicol amine residues in chicken eggs. Br Poult Sci. 55(4): 460-465.
- **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.
- **HOMAZABAL V., STEFFENAK I., YNDESTAD M.** 1993. Simultaneous determination of residues of florfenicol and florfenicol amine in fish by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr. 616(1):161-5.
- **LI J., DING S., ZHANG S., LI C., LI X., LIU Z., LIU J., SHEN J.** 2006. Residue Depletion of Florfenicol and Its Metabolite Florfenicol Amine in Swine Tissues after Intramuscular Administration. J. Agric. Food Chem. 54: 9614–9619.
- **LOVE, D. C.; HALDEN, R. U.; DAVIS, M. F.; NACHMAN, K.E.** 2012. Feather meal: a previously unrecognized route for reentry into the food supply pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). Environ. Sci. Technol. 46: 3795-3802.

- **MARCU, A.; VACARU-OPRIȘ, I.; DUMITRESCU, G.; PETCULESCU, L.; MARCU, A.; NICULA, M.; PEȚI, I.; DRONCA, D.; KELCIOV, B.; MARIȘ, C.** 2013. The influence of genetics on economic efficiency of broiler chickens growth. *Anim. Sci. Biotechnol.* 46 (2): 330-346.
- **MARTÍNEZ, J.; BAQUERO, F.** 2002. Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(4):647-679.
- **MESTORINO, N.; DANIELE, M.; ERRECALDE, J.** 2011. Residuos tisulares de florfenicol tras su administración oral en pollos parrilleros. *VC.* 6: 27-33.
- **ODEPA. Oficina de estudios y Políticas Agrarias.** 2015. Actualización del mercado avícola. [En línea] <http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1428415820Aves201503.pdf> [consulta: 20-05-15].
- **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2014. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. In: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 232 pág.
- **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/> [citado en octubre del 2015]. Nota descriptiva N°194.
- **PARK B., LIM J., KIM M., HWANG Y., YUN H.** 2007. Pharmacokinetics of florfenicol and its major metabolite, florfenicol amine, in rabbits. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 30: 32-36.
- **SANDILANDS, V.; SAVORY, J.; POWELL, K.** 2004. Preen gland function in layer fowls: factors affecting morphology and feather lipid levels. *Comp. Biochem. and Physiol. Part A* (137): 217–225.

- **SAG. SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO.** 2015. Sistema en línea de búsqueda de medicamentos veterinarios autorizados por el SAG. Disponible en http://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos_1.asp [citado en octubre del 2015].

- **SAN MARTIN, 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 couple with tandem mass spectrometry. *J food protect.* 70 (8): 1952-1957.

- **USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.** 2010. Determination and Confirmation of Florfenicol. CLG-FLOR1.03. 27 pag.

- **XIE, K.; JIA, L.; YAO, Y.; XU, D.; CHEN, S.; XIE, X.; PEI, Y.; BAO, W.; DAI, G.; WANG, J.; LIU, Z.** 2011. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs, by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 879: 2351-2354.

- **ZHANG S., LIU Z., GUO X., CHENG L., WANG Z., SHEN J.** 2008. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 875 (2008) 399–404.

ANEXOS

Anexo N° 1. Certificado del Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinaria y Pecuarias de la Universidad de Chile, que estipula las medidas de bioseguridad para el trabajo en terreno y el laboratorio.



CERTIFICADO N° 40

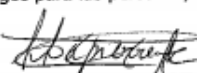
Santiago 21 de Noviembre 2014

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto titulado: "Evaluation of the bioaccumulation of antimicrobial residues in feathers of broiler chickens treated with commercial pharmaceutical formulations and their relation with the concentration of these residues in edible tissues." cuya Investigadora Responsable es la Dra. Javiera Cornejo K., y que fue presentado al concurso FONDECYT de Iniciación 2014.

En el proyecto se estipulan entre otras las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- Uso de vestimenta y mascarilla adecuada para realizar el trabajo en terreno y para el trabajo en laboratorio. Se le realizará inducción al personal sobre medidas de bioseguridad.
- 2.- Los animales serán manejados por médicos veterinarios o memoristas supervisados con la vestimenta y medidas de manejo adecuadas.
- 3.- La eliminación de residuos tóxicos se hará siguiendo las normas de bioseguridad y mediante los protocolos que realiza el Laboratorio FARMAVET.
- 4.- Se realizará desinfección con desinfectantes adecuados y en las concentraciones adecuadas.
- 5.- Se utilizarán campanas de extracción y protección adecuada para el trabajo con solventes y reactivos tóxicos.
- 6.- Las carcasas y órganos de los animales serán incineradas.

El proyecto fue revisado en base a las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas de Bioseguridad" editado por CONICYT versión 2008 y que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.


LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

Coordinadora
Comité de Bioseguridad



Anexo N° 2. Certificado del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, para el uso de animales experimentales.



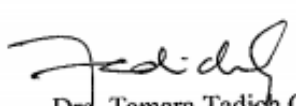
UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Comité de Bioética Animal

Santiago, 20 de noviembre de 2014

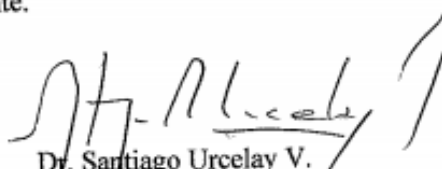
CERTIFICADO N° 23-2014

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto: **“Evaluation of the bioaccumulation of antimicrobial residues in feathers of broiler chickens treated with commercial pharmaceutical formulations and their relation with the concentration of these residues in edible tissues”**. Dicho proyecto será financiado por el Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile, donde el Investigador Responsable será la **Dra. Javiera Cornejo K.**, 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 utilizará aves Ross 308 (total de 224) que serán mantenidos en la Unidad de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Al término del estudio las aves serán eutanasiadas de acuerdo a lo especificado en el formulario y según las recomendaciones de AVMA (2013) por personal competente.


Dra. Tamara Tadić G.
Director
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Urcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal

Anexo 3. Metodología analítica para extracción de FF y FFA a partir de la matriz pluma.

Detección de FF y FFA en plumas mediante HPLC-MS/MS
Metodología de extracción:
<ol style="list-style-type: none">1. Pesar $2 \pm 0,02$ gr. de muestra en tubo tipo Falcon de 50 ml.2. Agregar estándar interno (CAF d-5) a todas las muestras y fortificados.3. Agregar 20 ml de Acetona.4. Agregar 20 ml de agua HPLC.5. Agitar por 10 min en vórtex.6. Sonicar 5 min y dejar reposar por 5 min.7. Agitar por 10 min en vórtex.8. Centrifugar por 5 min a 4000 rpm.9. Utilizando lana de vidrio y filtros millex en jeringas de 50 ml, filtrar el contenido a otro tubo tipo Falcon de 50 ml.10. Agregar 15 ml de Diclorometano.11. Agitar por 5 min en vórtex.12. Centrifugar por 5 min a 4000 rpm.13. Descartar la fase superior.14. Evaporar la fase inferior bajo flujo suave de nitrógeno en baño de agua a 40 - 50°C.15. Reconstituir con 700 μl de solución metanol/agua en relación 7:3.16. Agregar 1 ml de hexano.17. Agitar por 5 min en vórtex.18. Sonicar por 5 min.19. Centrifugar por 10 min a 3000 rpm.20. Pasar 700 μl de la fase inferior a un microtubo Eppendorf de 1,5 ml.21. Centrifugar por 10 min a 13500 rpm.22. Utilizando una jeringa de 1 ml con filtro millex, traspasar a un vial rotulado.

Anexo 4. Metodología analítica para extracción de FF y FFA a partir de tejidos comestibles.

Detección de FF y FFA en tejidos comestibles (músculo e hígado) mediante HPLC-MS/MS
Metodología de extracción:
<ol style="list-style-type: none">1. Pesar $2 \pm 0,02$ gr. de muestra en tubo tipo Falcon de 50 ml.2. Agregar estándar interno (CAF d-5) a todas las muestras y fortificados.3. Agregar 10 ml de agua HPLC y agitar manualmente (suave). (5 ml en el caso de musculo)4. Agregar 10 ml de Acetona.5. Agitar por 10 min en vórtex.6. Sonicar 5 min y dejar reposar por 5 min.7. Agitar por 2 min en vórtex.8. Centrifugar por 5 min a 4000 rpm.9. Sacar todo el sobrenadante y traspasar a otro tubo de 50 ml.10. Agregar 5 ml de Diclorometano.11. Agitar por 5 min en vórtex.12. Centrifugar por 5 min a 3000 rpm*.13. Descartar la fase superior.14. Evaporar la fase inferior bajo flujo suave de nitrógeno en baño de agua a 40 - 50°C.15. Reconstituir con 700 μl de solución metanol/agua en relación 7:3.16. Agregar 1 ml de hexano.17. Agitar por 5 min en vórtex.18. Sonicar por 5 min.19. Centrifugar por 5 min a 2000 rpm.20. Pasar 700 μl de la fase inferior a un microtubo Eppendorf de 1,5 ml.21. Centrifugar por 10 min a 13500 rpm.22. Traspasar a vial de vidrio rotulado usando filtro millex. <p>*La centrifugación se debe hacer inmediatamente después de la agitación, sin dejar pasar mucho tiempo entre los dos pasos, para evitar que la muestra emulsione.</p>

Anexo 5. Tabla resumen validación método analítico para detección de florfenicol y florfenicol amina en plumas de pollo broiler.

<u>Resumen Validación Florfenicol y Flornicol Amina</u>	
<u>Especificaciones analíticas</u>	
Método analítico	Florfenicol en plumas
Analito	Florfenicol y Florfenicol amina
Matriz/especie	Plumas/pollo broiler
Equipo	HPLC
Detector	MS/MS
Columna	Synergi 4u fusión RP 30 ^a 50 x 2.0 mm.
Fase móvil	Fase A: ácido acético al 0,1% en agua. Fase B: ácido acético al 0,1% en agua/metanol 1:9
<u>VALIDACIÓN</u>	
Parámetros	Resultados
1. Tiempo de retención (TR)	FF (356,0/336,0): 1.4 min (promedio)/ CV: 2.76% FFA (248,0/230,0): 1.07min / CV: 0.70%
2. Especificidad	No hay interferentes en el TR de los analitos
3. Límite de detección (LD)	FF: 20 ng/gr. FFA: 20 ng/gr.
4. Límite de cuantificación (LC)	FF: 24.4 ng/gr. FFA: 24.5 ng/gr.
5. Linealidad de la curva de calibración	FF: $R^2 > 0,99$ / CV de las pendientes: 0.04% FFA: $R^2 > 0,99$ / CV de las pendientes: 0.14%
6. Recuperación (promedio)	FF: 20 ng/gr: 100%; 100 ng/gr: 99%; 200 ng/gr: 100% FFA: 20 ng/gr: 102%; 100 ng/gr: 99%; 200 ng/gr: 100%
7. Precisión :	
7.1. Repetibilidad (CV %)	FF: 20 ng/gr: 10.1%; 100 ng/gr: 3.6%; 200 ng/gr: 0.8% FFA: 20 ng/gr: 15.6%; 100 ng/gr: 5.8%; 200 ng/gr: 1.3%
7.2. Reproducibilidad (CV %)	FF: 20 ng/gr: 19.4%; 100 ng/gr: 5.8%; 200 ng/gr: 1.4% FFA: 20 ng/gr: 20.8%; 100 ng/gr: 9.3%; 200 ng/gr: 1.9%

Anexo 6. Tabla resumen validación método analítico para detección de florfenicol y florfenicol amina en músculo de pollo broiler.

<u>Resumen Validación Florfenicol y Flornicol Amina</u>	
<u>Especificaciones analíticas</u>	
Método analítico	Florfenicol en musculo
Analito	Florfenicol y Florfenicol amina
Matriz/especie	musculo/pollo broiler
Equipo	HPLC
Detector	MS/MS
Columna	Synergi 4u fusión RP 30 ^a 50 x 2.0 mm.
Fase móvil	Fase A: ácido acético al 0,1% en agua. Fase B: ácido acético al 0,1% en agua/metanol 1:9
<u>VALIDACIÓN</u>	
Parámetros	Resultados
1. Tiempo de retención (TR)	FF (356,0/336,0): 1.4 min (promedio)/ CV: 2.76% FFA (248,0/230,0): 1.07min / CV: 0.70%
2. Especificidad	No hay interferentes en el TR de los analitos
3. Límite de detección (LD)	FF: 20 ng/gr. FFA: 20 ng/gr.
4. Límite de cuantificación (LC)	FF: 21.7 ng/gr. FFA: 24.2 ng/gr.
5. Linealidad de la curva de calibración	FF: $R^2 > 0.98$ / CV de las pendientes: 0.29% FFA: $R^2 > 0.96$ / CV de las pendientes: 1.49%
6. Recuperación (promedio)	FF: 20 ng/gr: 85%; 100 ng/gr: 105%; 200 ng/gr: 98% FFA: 20 ng/gr: 100%; 100 ng/gr: 99%; 200 ng/gr: 100%
7. Precisión :	
7.1. Repetibilidad (CV %)	FF: 20 ng/gr: 18.6%; 100 ng/gr: 4.6%; 200 ng/gr: 1.2% FFA: 20 ng/gr: 10.6%; 100 ng/gr: 3.1%; 200 ng/gr: 0.7%
7.2. Reproducibilidad (CV %)	FF: 20 ng/gr: 23.6%; 100 ng/gr: 7.3%; 200 ng/gr: 1.7% FFA: 20 ng/gr: 17.7%; 100 ng/gr: 6.1%; 200 ng/gr: 1.4%

Anexo 7. Tabla resumen validación método analítico para detección de florfenicol y florfenicol amina en hígado de pollo broiler.

<u>Resumen Validación Florfenicol y Flornicol Amina</u>	
<u>Especificaciones analíticas</u>	
Método analítico	Florfenicol en hígado
Analito	Florfenicol y Florfenicol amina
Matriz/especie	Hígado/pollo broiler
Equipo	HPLC
Detector	MS/MS
Columna	Synergi 4u fusión RP 30 ^a 50 x 2.0 mm.
Fase móvil	Fase A: ácido acético al 0,1% en agua. Fase B: ácido acético al 0,1% en agua/metanol 1:9
<u>VALIDACIÓN</u>	
Parámetros	Resultados
1. Tiempo de retención (TR)	FF (356,0/336,0): 1.4 min (promedio)/ CV: 2.76% FFA (248,0/230,0): 1.07min / CV: 0.70%
2. Especificidad	No hay interferentes en el TR de los analitos
3. Límite de detección (LD)	FF: 20 ng/gr. FFA: 20 ng/gr.
4. Límite de cuantificación (LC)	FF: 21.2 ng/gr. FFA: 22.8 ng/gr.
5. Linealidad de la curva de calibración	FF: R ² > 0.96/ CV de las pendientes: 1.71% FFA: R ² > 0.97/ CV de las pendientes: 1.15%
6. Recuperación (promedio)	FF: 20 ng/gr: 106%; 100 ng/gr: 97%; 200 ng/gr: 100% FFA: 20 ng/gr: 110%; 100 ng/gr: 96%; 200 ng/gr: 100%
7. Precisión :	
7.1. Repetibilidad (CV %)	FF: 20 ng/gr: 3.8%; 100 ng/gr: 1.6%; 200 ng/gr: 0.4% FFA: 20 ng/gr: 7.2%; 100 ng/gr: 3.0%; 200 ng/gr: 0.6%
7.2. Reproducibilidad (CV %)	FF: 20 ng/gr: 13.1%; 100 ng/gr: 4.6%; 200 ng/gr: 1.0% FFA: 20 ng/gr: 24.4%; 100 ng/gr: 11.2%; 200 ng/gr: 2.3%