



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

**EVALUACIÓN DE LA DEPLECIÓN DE TILOSINA EN PLUMAS DE  
POLLOS BROILER Y SU RELACIÓN CON LAS  
CONCENTRACIONES EN TEJIDOS COMESTIBLES:  
MÚSCULO E HÍGADO**

**Carolina Estefanía Carvallo Santis**

Memoria de Tesis para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario y al Grado de Magíster  
en Ciencias Animales y Veterinarias  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

**PROFESOR GUÍA: JAVIERA CORNEJO KELLY**  
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias

**FINANCIAMIENTO: Proyecto Fondecyt de Iniciación en Investigación 11140530**

**SANTIAGO, CHILE**

**2017**



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

**EVALUACIÓN DE LA DEPLECIÓN DE TILOSINA EN PLUMAS  
DE POLLOS BROILER Y SU RELACIÓN CON LAS  
CONCENTRACIONES EN TEJIDOS COMESTIBLES:  
MÚSCULO E HÍGADO**

**Carolina Estefanía Carvallo Santis**

Memoria de Tesis para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario y al Grado de  
Magíster en Ciencias Animales y  
Veterinarias  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

NOTA FINAL: .....

PROFESORA GUÍA : JAVIERA CORNEJO K. ....

PROFESORA CORRECTORA: BETTY SAN MARTÍN N. ....

PROFESOR CORRECTOR : ANDRONICO NEIRA C. ....

SANTIAGO, CHILE  
2017

MEMORIA DE TÍTULO

**“EVALUACIÓN DE LA DEPLECIÓN DE TILOSINA EN PLUMAS DE POLLOS BROILER Y SU RELACIÓN CON LAS CONCENTRACIONES EN TEJIDOS COMESTIBLES: MÚSCULO E HÍGADO”**

**“EVALUATION OF THE DEPLETION OF TYLOSIN IN THE FEATHERS OF BROILER CHICKENS AND ITS RELATIONSHIP WITH THE CONCENTRATIONS IN EDIBLE TISSUES: MUSCLE AND LIVER”.**

**Carolina Estefanía Carvallo Santis \***

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

### **Financiamiento**

Proyecto FONDECYT de Iniciación en Investigación 2014 (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”.

## ÍNDICE DE CAPÍTULOS

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>6</b>
Importancia del uso de antimicrobianos en producción aviar .....	6
Estudios de bioacumulación y depleción de antimicrobianos en plumas y en tejidos comestibles de aves tratadas .....	8
Tilosina, espectro de acción y características farmacocinéticas .....	11
Situación actual sobre los Límites Máximos Residuales para tilosina.....	13
Validación de las metodologías analíticas .....	14
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
Animales experimentales .....	16
Grupos experimentales y muestreos .....	17
Procesamiento de las muestras .....	17
Reactivos y soluciones .....	18
Metodología Analítica .....	18
Análisis Instrumental .....	20
Validación de metodologías analíticas .....	20
Cuantificación de los residuos de antimicrobiano en las muestras.....	21
Estudio de Depleción .....	22
Bioseguridad .....	22
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>

Objetivo específico 1: Implementar y validar metodologías analíticas por HPLC–DAD para la detección y cuantificación de tilosina en plumas, músculo e hígado de aves de engorda. ....	23
<i>Implementación y optimización de las metodologías analíticas</i> .....	23
<i>Validación de las metodologías analíticas</i> .....	24
Objetivo específico 2: Detectar y cuantificar concentraciones de tilosina en plumas, músculo e hígado de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de dicho antimicrobiano. ....	32
<i>Cuantificación de Tilosina en músculo e hígado de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial.</i> .....	32
<i>Cuantificación de Tilosina en plumas de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial.</i> .....	33
Objetivo específico 3: Evaluar y comparar la depleción de las concentraciones cuantificadas de tilosina en plumas, músculo e hígado de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de dicho antimicrobiano. ....	34
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>42</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>43</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>48</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Cambios realizados para la optimización de las metodologías analíticas para la extracción de tilosina.....	<b>24</b>
<b>TABLA 2.</b> Carta de fortificación de tilosina para HPLC-DAD. ....	<b>24</b>
<b>TABLA 3.</b> Tiempos de retención y CV% a partir de seis inyecciones de droga pura de tilosina. ....	<b>25</b>
<b>TABLA 4.</b> Promedio, DS y CV% de las concentraciones detectadas de tilosina en las 20 repeticiones fortificadas al LD en las matrices biológicas plumas e hígado.....	<b>27</b>
<b>TABLA 5.</b> Calculo del LC para el analito tilosina en las matrices biológicas plumas e hígado. ....	<b>27</b>
<b>TABLA 6.</b> R <sup>2</sup> y CV% de las tres curvas de calibración fortificadas a cinco niveles de concentración (50, 100, 150, 200, 250 µg kg <sup>-1</sup> ), para las matrices plumas e hígado .....	<b>28</b>
<b>TABLA 7.</b> Promedios, DS y CV% de las recuperaciones de tilosina a partir de las matrices biológicas, según las concentraciones de trabajo 50, 150 y 250 µg kg <sup>-1</sup> .....	<b>29</b>
<b>TABLA 8.</b> Repetibilidad, muestra el promedio, DS y CV% de las concentraciones cuantificadas para cada nivel de fortificación de 50, 150, 250 µg kg <sup>-1</sup> .....	<b>30</b>
<b>TABLA 9.</b> Reproducibilidad intralaboratorio, muestra el promedio, DS y CV% de las concentraciones cuantificadas para cada nivel de fortificación de 50, 150, 250 µg kg <sup>-1</sup> . ....	<b>30</b>
<b>TABLA 10.</b> Comparación de los CV% de la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio, para las matrices plumas e hígado.. ....	<b>31</b>
<b>TABLA 11.</b> Concentración de tilosina en músculo e hígado de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial para aves de engorda (tilosina tartrato al 80%)...	<b>32</b>
<b>TABLA 12.</b> Concentración de tilosina en plumas de pollos broiler tratados con una formulación farmacéuticas comercial para aves de engorda (tilosina tartrato al 80%).....	<b>33</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**FIGURA 1.** Cromatogramas a partir de muestras de plumas (a) inyección de droga pura representativa de los 6 análisis (b) muestra blanco representativa de los 20 análisis.. ..... **26**

**FIGURA 2.** Cromatogramas a partir de muestras de hígado (a) inyección de droga pura representativa de los 6 análisis (b) muestra blanco representativa de los 20 análisis.. ..... **26**

**FIGURA 3.** Curvas de calibración de 5 niveles de concentración (50, 100, 150, 200, 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), en las matrices plumas e hígado..... **28**

**FIGURA 4.** Depleción de tilosina en plumas de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica de tilosina tartrato al 80%.. ..... **34**

## RESUMEN

En la producción avícola, los antimicrobianos son la principal herramienta terapéutica para el tratamiento de enfermedades bacterianas. Sin embargo, cuando las terapias farmacológicas no se realizan de forma adecuada, residuos de estos fármacos pueden permanecer en productos y subproductos de origen animal, por sobre los límites máximos residuales (LMR) establecidos, pudiendo generar diversos efectos adversos en la población. Las plumas al ser utilizadas como harina de plumas para la elaboración de piensos de otras especies productivas que van a consumo humano directo, pueden producir una reincorporación de residuos de antimicrobianos a la cadena alimenticia generando un gran riesgo para la salud pública a nivel mundial.

Se realizó un estudio de depleción de concentraciones de tilosina, un antimicrobiano de amplio uso de producción aviar, en plumas y en tejidos comestibles (músculo e hígado) de pollos broiler tratados. Para la realización del estudio, se utilizaron 60 pollos broiler criados bajo condiciones controladas, a los cuales se les administró un tratamiento con una formulación farmacéutica comercial de tilosina tartrato al 80%, vía oral durante 5 días consecutivos. Se implementaron y validaron metodologías analíticas por cromatografía líquida acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-DAD), para detectar y cuantificar en forma confiable y precisa el analito de interés a partir de las matrices de estudio. Las concentraciones de tilosina fueron cuantificadas a través de la ecuación del análisis de regresión lineal de las curvas de calibración en matriz fortificada. Las concentraciones en músculo e hígado fueron inferiores al límite de detección (LD) establecido para la técnica ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) al día 4 post tratamiento. Mediante el estudio de depleción se estableció un tiempo de depleción para tilosina con un 95% de confianza en la matriz plumas, de 27 días. Este estudio concluye que las concentraciones en plumas permanecen en concentraciones mayores y por periodos de tiempos más prolongados que en tejidos comestibles (músculo e hígado) una vez finalizado el tratamiento y respetado el periodo de resguardo establecido para tejidos comestibles.

**Palabras claves:** Residuos antimicrobianos, plumas, depleción, tilosina, tejidos comestibles, HPLC-DAD.

## **ABSTRACT**

In poultry production, antimicrobials are the main therapeutic tool for the treatment of bacterial diseases. However, when pharmacological treatments are not adequately performed, residues of these drugs may remain in products and by-products of animal origin, above established maximum residual limits (MRLs), which may lead to a number of adverse effects on the population. Feathers are used as feather meal for the elaboration of feed for other productive animals that go to direct human consumption, this can produce a reincorporation of antimicrobial residues to the food chain generating a great risk for public health at a world-wide level.

A study of depletion of the concentrations of tylosin, an antimicrobial widely used in avian production, in feathers and in edible tissues (muscle and liver) of treated broiler chickens was carried out. For the study, a total of 60 broiler chickens raised under controlled conditions were given treatment with a commercial pharmaceutical formulation of 80% tylosin tartrate, orally for 5 consecutive days. Analytical methodologies were implemented and validated by liquid chromatography coupled to a photodiode array detector (HPLC-DAD), to reliably and accurately detect and quantify the analyte from the studied matrices. The tylosin concentrations were quantified through the linear regression analysis equation of the calibration curves in fortified matrix. Concentrations in muscle and liver were below the detection limit (DL) established for the technique ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) at day 4 post-treatment. The depletion study established a depletion time for tylosin with 95% confidence in the feathers matrix of 27 days. This study concludes that the concentrations in feathers remain in larger concentrations and for longer periods of time than in edible tissues (muscle and liver) once the treatment is finished and respecting the withdrawal time established for edible tissues.

**Key words:** Antimicrobial residues, feathers, depletion, tylosin, edible tissues, HPLC-DAD.

## INTRODUCCIÓN

La industria avícola se ha caracterizado a nivel mundial por tener un rápido crecimiento dentro del rubro agropecuario, debido a sus grandes volúmenes de producción y bajo costo, permitiendo que la carne de ave se haya transformado en la fuente de proteína de origen animal con mayor demanda a nivel global. En el año 2014, la industria avícola mundial se vio favorecida por una demanda sólida de carne de ave, oferta global relativamente ajustada, altos precios de otras fuentes de proteína animal y expectativa de menores costos de alimentación (ODEPA, 2015a). A nivel nacional ha evolucionado notablemente en las últimas décadas, llegando a ser líder en producción de carnes en el país, alcanzando las 675 mil toneladas para el año 2015 (ODEPA, 2015b).

La intensificación de esta producción a lo largo de los años ha conducido a que la transmisión de enfermedades infecciosas entre los animales sea de gran importancia para el rubro. Es por esto, que el uso de antimicrobianos en la producción avícola remonta desde hace 5 décadas, con el objetivo de tratar patologías de origen bacteriano. Actualmente, su uso como agentes profilácticos en el agua de las aves sanas y como promotores del crecimiento a concentraciones subterapéuticas en la alimentación, se encuentra prohibido en Chile desde el año 2006, por la modificación de la Resolución N°1992 del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y en la Unión Europea (UE) de acuerdo al Reglamento N°1831/2003/UE. Si bien, son una herramienta eficaz en el control y tratamiento de diversas patologías de origen bacteriano, tanto para humanos como para animales, su uso no está exento de riesgos si no se utilizan de forma apropiada. Su manejo inadecuado puede derivar en la presencia de residuos de antimicrobianos en productos comestibles y concentraciones de estos en subproductos de origen animal, generando un gran riesgo para la salud pública a nivel mundial.

Cuando los residuos de antimicrobianos se encuentran sobre los LMR establecidos, pueden llegar a permanecer en el producto final o subproductos de este, por consiguiente, llegar al consumidor generando diversas reacciones adversas, tales como: efectos tóxicos directos, reacciones de hipersensibilidad (alergias), efectos carcinógenos, mutagénicos y teratogénicos. Además, provocan efectos sobre la microflora intestinal, ya que los residuos

de antimicrobianos contribuyen a una presión selectiva sobre los microorganismos del tracto gastrointestinal, generando bacterias patógenas resistentes a estos fármacos que se pueden traspasar a la población humana a través de la cadena alimenticia.

De esta forma, para asegurar el uso correcto de estos fármacos es necesario respetar el periodo de resguardo (PR) del producto farmacéutico empleado en los animales de producción. El cual, se define de acuerdo al Codex *Alimentarius* como el periodo que debe transcurrir entre la última administración de un fármaco y la obtención de tejidos o productos comestibles de un animal tratado, lo que garantiza que el contenido de residuos en los alimentos cumpla con los LMR establecidos para los medicamentos veterinarios. Sin embargo, en el caso de los tejidos no comestibles, como las plumas, existen estudios científicos que demuestran que algunos antimicrobianos pueden permanecer en altas concentraciones aun cuando ya han finalizados los PR establecidos para los tejidos comestibles y los residuos de estos fármacos se encuentran bajo los LMR establecidos para estos. Por su parte, las plumas son un subproducto derivado de la producción avícola que se utiliza para la elaboración de hidrolizado de harina de plumas (concentrado proteico), el cual es incorporado en la alimentación de otros animales productivos destinados a consumo humano, tales como, porcinos, bovinos y peces, pudiendo reincorporarse los fármacos utilizados a la cadena alimenticia.

Dentro de los antimicrobianos utilizados en la producción avícola, se encuentra el grupo de los macrólidos, los cuales son eficaces contra bacterias Gram positivas y *Mycoplasma*, pero tienen actividad limitada contra bacterias Gram negativas. A este grupo pertenece la tilosina, la cual es frecuentemente utilizada para el tratamiento de enfermedades comunes en producción aviar. Se encuentra autorizada por el Registro de Medicamentos Veterinarios del SAG, para su uso en aves de engorda. De acuerdo a lo mencionado, resulta necesario estudiar las concentraciones de este antimicrobiano en plumas y compararlas con las concentraciones detectadas en los tejidos comestibles de pollos tratados.

De acuerdo a los antecedentes bibliográficos expuestos, el presente trabajo consiste en realizar un estudio de depleción de las concentraciones de tilosina en plumas de aves tratadas terapéuticamente y relacionarlo a las concentraciones cuantificadas en músculo e

hígado de estas aves. Para cumplir con este objetivo, es fundamental implementar y validar una metodología analítica que permita detectar y cuantificar la presencia de tilosina en las matrices mencionadas, para que los resultados sean confiables y reproducibles en el laboratorio.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

La industria avícola se ha caracterizado por ser uno de los rubros del sector pecuario con mayor crecimiento en los últimos años. En el año 2014 de los 311,8 millones de toneladas de carne producidas a nivel mundial, la carne de ave dio cuenta de alrededor de un 35%, lo que equivale a 108,7 millones de toneladas. La industria avícola nacional ha evolucionado notablemente en las últimas décadas, alcanzando un beneficio de 22.365.329 de aves en enero de 2015, lo que representa un 0,3% más que enero de 2014, y un 3,3% más que el promedio de enero de los últimos cinco años (ODEPA, 2015a). Además, el consumo total de carnes a nivel nacional en el año 2014 fue de 74,9 kg per cápita, de los cuales 34,4 kg correspondieron a carne de ave, que se traduce en el 46% del consumo total de carnes, siendo del total un 95,8% carne de pollo (APA, 2014).

### **Importancia del uso de antimicrobianos en producción aviar**

En la industria avícola, los animales son criados principalmente en condiciones de confinamiento, lo cual promueve la propagación de enfermedades infecciosas. De acuerdo a esta situación, los antibióticos son ampliamente utilizados para el tratamiento y prevención de enfermedades en producción aviar (APUA, 2010; Landoni y Albarellos, 2015). Si bien, el uso de antimicrobianos en animales de producción trae beneficios sanitarios y productivos, al no respetar las indicaciones, dosis, y PR de estos fármacos, se puede derivar en la aparición de efectos adversos tanto en el hombre como en animales (San Martín, *et al.*, 2014).

En la literatura científica se 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 (Anadón y Martínez-Larrañaga, 2012; Beyene, 2016):

- a) Efectos toxicológicos directos: como el caso del cloranfenicol, el cual ha demostrado que puede producir aplasia medular independientemente de la dosis. Actualmente, se encuentra prohibido su uso en animales de producción.
- b) Reacciones de hipersensibilidad: se define como una respuesta inmune mediada en un paciente sensibilizado hacia un agente o droga. 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. Se ha descrito que los macrólidos pueden ser responsable de lesiones en hígado, causadas por una respuesta alérgica específica a estos, modificada en las células hepáticas.

c) Carcinogénesis, mutagénesis, y teratogénesis: el peligro potencial de los residuos cancerígenos está relacionado con su interacción o unión covalente a diversos componentes intracelulares tales como proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), glucógeno, fosfolípidos, y glutatión. Los residuos mutagénicos, pueden causar mutaciones en una molécula de DNA o dañar el componente genético de una célula o los organismos. Los teratógenos, pueden producir un efecto tóxico sobre el embrión o el feto durante una fase crítica de la gestación.

d) Alteración de la flora intestinal: las bacterias comensales del intestino actúan como una barrera que previene la entrada de patógenos que causan enfermedades. Los antibióticos pueden reducir el número total de las bacterias o selectivamente matar algunas especies importantes, afectando a una amplia gama de flora intestinal y en consecuencia causar trastornos gastrointestinales, como, por ejemplo, con el uso de flunixin, estreptomina, y la tilosina en animales de producción.

e) Desarrollo de resistencia antibacteriana: se considera un efecto secundario indirecto de la ingesta de residuos farmacológicos. Los animales alimentados con un nivel profiláctico de antibióticos pueden desarrollar bacterias resistentes a estos durante la preparación o el consumo de alimentos de origen animal. Conjuntamente, se ha evidenciado transferencia de bacterias resistentes y genes de resistencia desde animales a humanos, principalmente de bacterias zoonóticas, como *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp., donde los pollos y pavos son el reservorio animal para ambas bacterias (Anderson *et al.*, 2003).

De acuerdo a lo señalado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su informe de vigilancia de la resistencia antimicrobiana (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.

Al respecto, Kovalenko *et al.*, (2014) realizaron una investigación en carne de pollos broiler para determinar la resistencia a antimicrobianos desde aislados de *Campylobacter* spp., resultando resistente en un total de 58 aislados (100%), uno o más agentes antimicrobianos, siendo resistentes a ciprofloxacino el 100% de los aislados y a ácido nalidíxico el 87,9%. Se consideró multiresistente a la resistencia a tres o más antimicrobianos no relacionados, detectándose en 39 aislamientos (67,2%). Todos los aislados multiresistentes fueron resistentes a ciprofloxacino y a ácido nalidíxico. En el estudio de Ta Y. *et al.*, (2014) analizaron la resistencia a *Salmonella* spp. aislada de carne de pollo cruda, demostrando que un 73,3% de las muestras aisladas fueron resistentes al menos a 1 antibiótico, presentado alta resistencia a tetraciclina (59,1%) y ampicilina (41,6%).

Para evitar la presentación de estos efectos nocivos en 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 cada 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 establecidos, disminuyendo así el riesgo de que estos puedan producir efectos adversos.

### **Estudios de bioacumulación y depleción de antimicrobianos en plumas y en tejidos comestibles de aves tratadas**

Las plumas, son consideradas subproductos procedentes de la industria avícola, en las cuales no existe regulación de las concentraciones del uso de antimicrobianos, puesto que no van a consumo directo de la población. Sin embargo, existen diferentes estudios, que indican que estas estructuras son capaces de bioacumular antibióticos, persistiendo concentraciones de estos fármacos en niveles mayores y por periodos de tiempo más prolongados que en los tejidos comestibles, finalizada la terapia y respetados los PR establecidos para la formulación utilizada, por lo cual 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 (San Martín *et al.*, 2007; Cornejo *et al.*, 2011; Cornejo *et al.*, 2012). Lo anterior, adquiere gran relevancia al considerar que, de cada 3 kg de carne de pollo producido, 1 kg o más corresponde subproductos (cabezas, huesos, vísceras, y plumas), los cuales ascienden a miles de millones de kilogramos de piezas de tejidos no comestibles y a 2 mil millones de kg de plumas generadas anualmente por la industria avícola en Estados Unidos (Love *et al.*, 2012).

Los estudios de depleción de residuos de antimicrobianos en tejidos comestibles, han sido realizados en distintas especies por diferentes autores (Kukanich *et al.*, 2005; Pavlov *et al.*, 2008; San Martín *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2014). Por el contrario, en el caso de los tejidos no comestibles, como las plumas, existen escasos antecedentes en la literatura científica. San Martín *et al.*, (2007), estudiaron la depleción de enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino en tejidos comestibles (músculo, hígado y riñón) y en plumas de gallinas ponedoras, concluyendo que las concentraciones del fármaco en las plumas permanecieron altas a través de todo el periodo de estudio. En concordancia, Cornejo *et al.*, (2011) estudiaron la depleción en 3 formulaciones de flumequina en tejidos comestibles y su transferencia hacia las plumas de 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 PR y que además se mantiene por un tiempo más prolongado. Conjuntamente, otro estudio realizado por Cornejo *et al.*, (2012) demostró que los antimicrobianos enrofloxacino y ciprofloxacino fueron transferidos a las plumas de aves de engorda tratadas, permaneciendo sus concentraciones por mayor tiempo y en niveles mayores, en comparación a 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 LD del método analítico de  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Del mismo modo, Mestorino *et al.*, (2016) indicaron que altas concentraciones de enrofloxacino y ciprofloxacino permanecieron en plumas de pollos broiler, después de su administración oral por 5 días consecutivos y que ambos compuestos permanecieron durante todo el periodo de estudio.

Considerando los antecedentes expuestos anteriormente, Love *et al.*, (2012) demostraron la presencia de concentraciones de antimicrobianos en plumas de aves de corral crudas, y posterior a someterlas a un proceso de hidrolización en autoclave a altas temperaturas (121°C) para transformarlas en harina de plumas. En este estudio, se analizaron muestras de harina de plumas (n=12) provenientes de diferentes estados de Estados Unidos (Arkansas, Carolina del Norte, Oregón, California, Idaho, Tennessee) y China, en las que se detectaron 6 familias de antimicrobianos diferentes, correspondiendo a un 75% de la frecuencia de detección de antimicrobianos al grupo de los macrólidos.

Por su parte, otros autores como Heinrich *et al.*, (2013) y Berendsen *et al.*, (2013) realizaron estudios, con los antibióticos 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 PR 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. En adición, estudios recientes señalan el uso de plumas como una matriz de muestra no invasiva, siendo una herramienta prometedora para el análisis de residuos de sustancias prohibidas y registradas. Debido a la rápida eliminación de la mayoría de los medicamentos veterinarios desde matrices comestibles, sólo pueden detectarse tratamientos recientes. La principal ventaja es que las plumas muestran una amplia ventana de detección y por lo tanto el uso indebido (extraetiqueta, subterapéutico, uso ilegal) de fármacos, se puede detectar durante un largo periodo de tiempo. Otra ventaja es que, mediante el análisis de plumas, es posible determinar el tiempo aproximado y la duración de la administración de las terapias. Además, mediante el análisis de esta matriz también se ha demostrado que es posible distinguir entre el tratamiento oral y la exposición externa (Jansen *et al.*, 2016; Wegh *et al.*, 2016).

Pese a la evidencia científica publicada actualmente con respecto a la presencia de concentraciones de antimicrobianos en las plumas de aves tratadas, a la fecha solo han sido estudiadas las familias de las fluoroquinolonas y tetraciclinas, sin embargo, es relevante conocer el comportamiento de las otras familias de antimicrobianos en esta matriz, como es

el caso del grupo de los macrólidos, como la tilosina, en donde no existe evidencia del comportamiento de este antimicrobiano en las plumas. Debido a que esta familia de antimicrobianos se encuentra autorizada en nuestro país por el SAG para su uso en aves de engorda, además de las cefalosporinas, tetraciclinas, fluoroquinolonas, fenicoles, sulfonamidas y lincosamidas (SAG, 2014).

### **Tilosina, espectro de acción y características farmacocinéticas**

Dentro de los grupos de antimicrobianos más utilizados en las aves de corral, destaca el grupo de los macrólidos por ser ampliamente empleados en el tratamiento de enfermedades comunes en los animales de producción (EMA, 2011). Dentro de este grupo, se encuentra la tilosina, siendo el antimicrobiano con mayor frecuencia de uso en las aves de corral. Es considerado bacteriostático a concentraciones terapéuticas por su unión a la subunidad 50s ribosomal e inhibición de la síntesis proteica, pero puede ser levemente bactericida, especialmente frente a estreptococos (Landoni y Albarello, 2015).

La tilosina, fue obtenida por primera vez en 1959 por McGuire y colaboradores, a partir de un filtrado de cultivo de *Streptomyces fradiae*, el cual se aisló de una muestra de tierra en Tailandia. Es ampliamente utilizada en animales de producción, como un macrólido de uso exclusivo en medicina veterinaria, con el fin de prevenir problemas de resistencia cruzada (Ji L-W *et al.*, 2014). Es activa contra Gram positivos, con especial acción sobre *Mycoplasma* y sobre algunos Gram negativos (Lewicki, 2006). Posee un anillo lactona macrocíclico de 16 átomos y farmacéuticamente se define como una mezcla de cuatro sustancias homólogas producidas a partir del metabolismo de *Streptomyces fradiae*. Está constituido principalmente por tilosina A (factor A, conforma más del 80% de la mezcla), tilosina B (desmicosina), tilosina C (macrocina) y tilosina D (relomicina). Estos cuatro factores representan al menos el 95% del contenido total (EMA, 2000; Lewicki, 2006). La forma de presentación comercial es en sales de tartrato y sales de fosfato. En avicultura, la sal tartrato muestra una rápida y mejor absorción en intestino cuando se administra vía agua de bebida, mientras que la sal fosfato se prefiere usar en premezclas, pues resulta ser bastante estable al ser mezclado con el pienso (Ji L-W *et al.*, 2014; Lewicki, 2006). En nuestro país, se encuentran disponibles 4 formulaciones de tilosina fosfato para su uso en

aves (todas en presentación en polvo) y 2 formulaciones de tilosina tartrato (inyectable y en polvo), todas incluidas en el Registro de Productos Farmacéuticos de Uso Veterinario del SAG (SAG, 2014).

La tilosina es de gran eficacia para el tratamiento de la enteritis necrótica clínica y subclínica en aves. Además, es uno de los antimicrobianos más eficaces para el tratamiento del Complejo Respiratorio Crónico causado por la infección de *Mycoplasma gallicepticum* en gallinas ponedoras, por lo que restaura la producción de huevos, reduce la transmisión transovárica y minimiza los signos clínicos (Thomas *et al.*, 2001; Landoni y Arbarello, 2015). Del mismo modo, su espectro de acción abarca *Mycoplasma meleagridis* y *Coccidia*, *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, los géneros de *Clostridium*, *Neisseria*, *Hemophilus*, *Treponema*, *Rickettsias*, virus y *Entamoeba histolytica* (Lewicki, 2006). Es una base orgánica débil, altamente soluble en lípidos, que forma fácilmente sales y ésteres. Se une moderadamente a las proteínas plasmáticas (30-47%) y se distribuye ampliamente en los fluidos y tejidos del cuerpo. En pollos de engorda, tiene una biodisponibilidad oral del 30 al 34%, un alto volumen aparente de distribución, y una vida media de eliminación de aproximadamente 2 horas después de la administración oral (Vandenberge *et al.*, 2012). El tartrato de tilosina se absorbe mejor en el tracto gastrointestinal de pollos, pavos y cerdos, a diferencia de la sal fosfato, sin embargo, los efectos sistémicos de esta última dependen del aumento de su concentración cuando se administra oralmente (Sumano y Gutiérrez, 2010). El volumen de distribución varía de 1 a 14.6 l/kg en varias especies animales, distribuyéndose fácilmente en el organismo después de su absorción sistémica llegando rápidamente al hígado, pulmones, tráquea, sacos aéreos, ovario, músculo y riñones, no teniendo buena penetración en el líquido céfalo raquídeo (Sumano y Gutiérrez, 2010; Vandenberge *et al.*, 2012). Se metaboliza principalmente en hígado, dando lugar a sus cuatro metabolitos principales y varios metabolitos menores en la mayoría de las especies estudiadas. Tilosina A es el residuo más abundante en ganado vacuno, cerdos, pollos y ratas, mientras que una vía metabólica principal es la reducción de tilosina A a tilosina D (Lewicki, 2006; JECFA, 2008). Se excreta en grandes cantidades a través de la bilis, lo cual provoca una alta concentración en el ciego, el recto y heces (Lewicki, 2006).

## **Situación actual sobre los Límites Máximos Residuales para tilosina**

Los residuos de tilosina en tejidos comestibles de origen animal, pueden generar efectos indeseables sobre la salud de los consumidores, como posibles efectos tóxicos en el corto plazo o reacciones de hipersensibilidad en individuos alérgicos e inhibición de bacterias Gram positivas de la microflora gastrointestinal humana en el largo plazo, presentando un riesgo para la salud pública (Dewdney *et al.*, 1991; Prats *et al.*, 2002a; Jeong *et al.*, 2010). En consecuencia, para limitar la exposición humana, varias autoridades de control, como la UE y la *Food and Drug Administration* (FDA) han establecido regulaciones para la mayoría de los antibióticos utilizados en medicina veterinaria, estableciendo los LMR para ellos (Botsoglou y Fletouris, 2001; Juan *et al.*, 2010).

En Chile los LMR para tilosina se encuentran establecidos en la Resolución Exenta N° 1462 de 1999 (modificada por la Resolución Exenta N° 551 del 2014), y se basan en los establecidos por el *Codex Alimentarius* (MINSAL, 2014). En el caso de los tejidos comestibles de pollo, los LMR para tilosina son de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para músculo, 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para piel/grasa, 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para hígado y riñón, al igual que los establecidos por la UE (EMA, 2002). En los Estados Unidos, las tolerancias regulatorias establecidas para el uso de tilosina por la FDA son de 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para grasa, riñones, hígado y músculo de pollo (FDA, 2011).

Por su parte las plumas, al ser un subproducto de la industria avícola, no tienen 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 biodiesel, ingrediente de bioplásticos, es 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.

## **Validación de las metodologías analíticas**

Para llevar a cabo este estudio, es necesario implementar y validar una metodología analítica que permita cuantificar las concentraciones de tilosina en las matrices mencionadas, ya que mediante este proceso se determina que un método es confiable, preciso y selectivo (CE, 2002). Por esta razón, diversos estudios han realizado análisis a través de HPLC, siendo de alta especificidad y precisión. (Cherlet *et al.*, 2002; Prats *et al.*, 2002b; Thompson *et al.*, 2005). Conjuntamente, estudios recientes han validado metodologías analíticas para la detección de concentraciones de antimicrobianos en plumas de pollos broiler. Cornejo *et al.*, (2016) implementaron y validaron una metodología analítica para la detección de florfenicol y florfenicol amina en plumas de pollos broiler. Del mismo modo, Pokrant *et al.*, (2016) validó una metodología para la detección de oxitetraciclina y clortetraciclina en plumas de pollos broiler.

Existen diferentes organismos que establecen directivas para la validación de los métodos analíticos como el Codex *Alimentarius* (Directrices armonizadas para la validación interna de los métodos de análisis: CAC/GL 49-2003), la FDA (Validación de los métodos analíticos utilizados en estudios de depleción de residuos: VICH GL49-2011) y la Comunidad Europea (CE) en la decisión de la comisión 2002/657/CE.

Finalmente, considerando los antecedentes entregados, es que en esta memoria de título se estudiará la depleción de residuos de tilosina en plumas y en tejidos comestibles de pollos broiler como músculo e hígado de aves tratadas, con el fin de evaluar si concentraciones de este fármaco permanecen en plumas por tiempos más prolongados y en mayores concentraciones que en tejidos comestibles. Lo cual, permitirá evaluar el rol de este subproducto en el reingreso del fármaco en la cadena alimenticia.

## **HIPÓTESIS**

Concentraciones de tilosina permanecen en plumas de pollos broiler tratados con este antimicrobiano, en mayor cantidad y por tiempos más prolongados que en tejidos comestibles (músculo e hígado).

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar las concentraciones de tilosina durante la fase de depleción, en plumas, músculo e hígado de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial de dicho antimicrobiano.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.** Implementar y validar metodologías analíticas por HPLC – DAD para la detección y cuantificación de tilosina en plumas, músculo e hígado de aves de engorda.
- 2.** Detectar y cuantificar concentraciones de tilosina en plumas, músculo e hígado de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de dicho antimicrobiano.
- 3.** Evaluar y comparar la depleción de las concentraciones cuantificadas de tilosina en plumas, músculo e hígado de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de dicho antimicrobiano.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para llevar a cabo la realización del presente estudio, se utilizó una formulación comercial de tilosina tartrato 80% en polvo para administración oral, presente en el Registro de Medicamentos de Uso Veterinario del SAG para su administración en aves de corral (N° de registro: 1792-B).

### **Animales experimentales**

Para la realización del estudio de depleción, se consto con una totalidad de 60 pollos broiler, de genética Ross 308. Se escogió esta línea genética por ser una raza precoz, de buena conversión alimenticia, y de alta rusticidad y adaptabilidad, con una tasa de crecimiento inferior a los pollos de engorde de genética Cobb 500 (Marcu *et al.*, 2013). De acuerdo a sus características, se evita una condición de engorda excesiva, lo cual contribuye a su bienestar animal bajo condiciones experimentales.

Los animales experimentales fueron mantenidos desde el día 1 de vida en baterías de crianza, con condiciones ambientales controladas ( $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$  de temperatura, 50-60% de humedad relativa), acceso *ad libitum* al agua y alimento no medicado. El alimento fue formulado de acuerdo a los requerimientos de la raza. Las jaulas contaron con un piso de alambre elevado, con el fin de evitar la contaminación con el contenido fecal.

Las aves fueron criadas y monitoreadas en las dependencias del Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La mantención y el sacrificio de los animales experimentales cumplieron con las condiciones de bienestar animal aprobadas por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile (Anexo 1). El protocolo de manejo y supervisión se basó 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). Conjuntamente, para el sacrificio de las aves, se respetó el Reglamento (CE) N° 1099/2009 relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza (CE, 2009).

## **Grupos experimentales y muestreos**

Para definir los tamaños de los grupos experimentales se consideró el criterio establecido por la Agencia Europea de Medicamentos, Guía: Aproximación hacia la armonización de los períodos de resguardo EMA/CVMP/SWP/036/2012 (EMA, 2016).

Las aves se dividieron aleatoriamente en 2 grupos experimentales. El grupo A de 48 pollos fue tratado con la formulación comercial de tilosina tartrato 80%, con un PR de 7 días. El grupo B de 12 pollos fue mantenido como grupo control sin tratamiento. Para asegurar la ingestión completa de la dosis, los animales fueron tratados individualmente, administrando una dosis terapéutica de 32 mg/kg PO una vez al día, durante cinco días consecutivos, hasta el día 26 de vida de las aves. A partir del día 4 al 15 post tratamiento (días 30 a 41 de vida de las aves), 8 aves en el grupo A y 2 aves del grupo B fueron sacrificadas en días definidos de acuerdo a la duración del PR de 7 días. Los días establecidos para la toma de muestras post tratamiento fueron los siguientes: 4, 7, 9, 11, 13 y 15 (6 puntos de muestreo). Se recolectaron muestras de músculo (pechuga y pierna), hígado y la totalidad de las plumas de las aves, de acuerdo a lo establecido por el Instructivo Técnico para la Determinación de Residuos en Productos Pecuarios del SAG (SAG, 2014). Las muestras fueron procesadas y almacenadas a -20°C de forma individual hasta su extracción y posterior análisis cromatográfico.

## **Procesamiento de las 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.

## Reactivos y soluciones

Para el análisis y cuantificación, se utilizó tilosina (Sigma o similar) de pureza certificada, de solución madre (solución stock), intermedia y solución para fortificación.

Los reactivos y solventes utilizados fueron: fosfato monobásico de sodio monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), agua grado HPLC (Merck o similar), ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), fosfato dibásico de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), metanol (Merck o similar), columnas aromatic sulfonic acid SCX (J.T. Baker o similar), acetonitrilo (Merck o similar), dibutilamina (Merck o similar).

Se utilizaron las siguientes soluciones: Buffer fosfato pH 2,5: se pesaron 3,5 gramos de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , se disolvieron en 200 mL de agua y se ajustó a  $\text{pH } 2,5 \pm 0,1$  con ácido fosfórico al 85%. Posteriormente, se trasvasió a un matraz de 250 mL y se aforo con volumen de agua. Buffer fosfato pH 4,0: se pesaron 3,5 gramos de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , se disolvieron en 200 mL de agua y se ajustó a  $\text{pH } 4,0 \pm 0,1$  con ácido fosfórico al 85%. A continuación, se trasvasió a un matraz de 250 mL y se aforo con volumen de agua. Buffer fosfato pH 9,0: se pesaron 1,4 gramos de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , se disolvieron en 80 mL de agua, se ajustó a  $\text{pH } 9,0 \pm 0,1$  con ácido fosfórico al 85%. Consecutivamente, se trasvasió a un matraz de 100 mL y se aforo con volumen de agua.

## Metodología Analítica

Para la determinación de tilosina en plumas, hígado y músculo de pollos broiler, se trabajó con un método de extracción por cromatografía líquida acoplada a un detector por arreglo de fotodiodos (HPLC-DAD), que fue implementado y validado previamente por los investigadores. El desarrollo de esta metodología se realizó en base a la utilizada por el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, para la detección de tilosina en músculo de salmón, la cual se sustenta sobre la base de tres metodologías analíticas publicadas anteriormente: *Determination of tylosin residues in pig tissues using high-performance liquid chromatography* (De Liguoro *et al.*, 1998); *Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feedingstuffs with HPLC-UV/DAD at 1*

*ppm level (Civitareale et al., 2004); Withdrawal Times of Oxytetracycline and Tylosin in Eggs of Laying Hens after Oral Administration (Muñoz et al., 2014).*

La metodología analítica para la extracción de tilosina a partir de la matriz pluma de pollos broiler previamente tratados, fue la siguiente: se pesaron  $5 \pm 0.05$  gramos de muestra en tubos falcón de 50 mL. Para la extracción se agregaron 10 mL de buffer fosfato pH 2,5, 15 mL de metanol y 15 mL de agua grado HPLC. Luego, se agitaron las muestras por 20 min. en vórtex. Posteriormente, se sonicaron y centrifugaron por 10 min. a 1780 g. A continuación, se filtró el sobrenadante a través de lana de vidrio (jeringas de 50 ml), recibiendo el filtrado en jeringas de 50 mL. Posteriormente, se centrifugó por 5 min. a 1780 g. Se acondicionaron columnas SCX con: 5 ml de metanol y 5 mL de buffer fosfato pH 4, para después pasar la muestra a través de las columnas. Consecutivamente, se lavaron las columnas con: 1 mL. de agua y 1 mL de buffer fosfato pH 9. Para la elución de las columnas se utilizaron 7 mL de metanol, el cual se evaporo bajo suave flujo de nitrógeno entre 40-50°C. La reconstitución se realizó con 350  $\mu$ l de agua:acetonitrilo (50:50) para después agitar en vortex por 5 min., sonicar 5 min., traspasar a tubos eppendorf y centrifugar por 5 minutos a 15890 g. Finalmente se transfirió el sobrenadante a viales de inyección para HPLC.

Para las matrices hígado y músculo se pesaron  $5 \pm 0.05$  gramos de muestra en tubos falcón de 50 mL. Para la extracción se agregaron 5 mL de buffer fosfato pH 2,5; 5 ml de metanol y 15 mL de agua HPLC. Se agitaron las muestras por 5 min.; se sonicaron por 5 min. y se centrifugaron por 10 min. a 1780 g. Posteriormente, se filtró el sobrenadante a través de lana de vidrio (jeringas 10 mL), recibiendo el filtrado en otro tubo de 50 mL. Luego, se centrifugo por 5 min. a 1780 g.; se acondicionaron las columnas SCX con 5 mL de metanol y 5 mL de buffer fosfato pH 4 y se pasó la muestra a través de las columnas. A continuación, se lavaron las columnas con 1 mL de agua, 1 mL de buffer fosfato pH 9 y 0,4 mL de metanol. Se eluyeron las columnas con 7 mL de metanol y se llevaron a sequedad con suave flujo de nitrógeno entre 40-50°C. Se reconstituyeron las muestras con 350  $\mu$ l de agua:acetonitrilo (50:50) para luego agitar en vórtex 5 min., sonicar 5 min. y traspasar a tubos eppendorf para centrifugar por 5 min. a 15890 g. Finalmente, se transfirió el sobrenadante a viales de inyección para HPLC.

## **Análisis Instrumental**

Para el análisis instrumental se utilizó un cromatógrafo líquido acoplado a un detector por arreglo de fotodiodos (HPLC-DAD). Para mantener las mejores condiciones cromatográficas al realizar el análisis, se mantuvo un flujo constante de fase móvil de 1 mL/min, una temperatura de horno de 50°C y una longitud de onda de 287 nm. La columna analítica utilizada fue Chromolith Performance RP-18e 100x4,6 mm. Merck.

## **Validación de metodologías analíticas**

La validación de los métodos analíticos se realizó siguiendo un protocolo de validación interno (“*in house*”), basada en las recomendaciones de la UE: decisión de la comisión 2002/657/CE (CE, 2002) y la FDA: VICH GL49 *validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011). De acuerdo a estos documentos se generó un protocolo interno de validación, 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 tilosina en plumas, músculo e hígado de pollos, 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*: se analizaron seis repeticiones de droga pura, para analizar su Coeficiente de Variación (CV%). Se aceptó un CV% menor al 5% entre estas repeticiones.
2. *Especificidad*: se analizaron 20 muestras blanco de cada matriz, para determinar que en el tiempo específico en que aparece el analito en la corrida cromatográfica, no existan interferencias.
3. *Límite de detección (LD)*: 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, aceptando un CV menor al 25% entre estas repeticiones.
4. *Límite de cuantificación (LC)*: al LD se le sumó 1,64 veces la desviación estándar (DS) de las 20 repeticiones, realizadas previamente. Se cumplió con una relación señal ruido mínima de 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 ( $R^2 \geq 0.95$ ) y un CV  $< 25\%$ .

6. *Recuperación*: para su determinación se seleccionaron 18 muestras de material en blanco, los cuales se fortificaron a tres niveles de concentración (seis muestras por cada nivel). Mediante el siguiente cálculo se determinó la recuperación para cada nivel de concentración:

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

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 la capacidad del método analítico de entregar resultados en forma precisa bajo las mismas condiciones de trabajo. Para determinar este parámetro, se seleccionaron 18 muestras blancos y se fortificaron a tres niveles de concentración diferentes de acuerdo a la CC (seis muestras fortificadas a cada nivel).

7.2. *Reproducibilidad intralaboratorio*: corresponde a la capacidad del método analítico de entregar resultados en forma precisa bajo la variación de las condiciones de trabajo. Para cumplir con este parámetro, se seleccionaron 18 muestras blancos y se fortificaron a tres niveles de concentración diferentes, pero en días diferentes, distintos analistas y diferentes lotes de reactivos y solventes.

### **Cuantificación de los residuos de antimicrobiano en las muestras**

Las concentraciones detectadas de tilosina en las diferentes matrices de estudio, plumas, músculo e hígado de aves tratadas, fueron cuantificadas mediante la ecuación de la recta ( $y=a+bx$ , donde  $y$  es el área,  $a$  es el intercepto en  $y$ ,  $b$  es la pendiente y  $x$  es la concentración) 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. El análisis de los datos se realizó de acuerdo a las indicaciones de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, 2016).

### **Estudio de Depleción**

Para realizar el análisis de los datos y establecer el periodo (días), que demora la depleción del analito tilosina en las matrices de estudio, se siguieron las indicaciones de la EMA, (2016). Se cuantificaron las concentraciones de tilosina 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 del fármaco 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 LD establecido para la técnica para la matriz plumas. El tiempo de depleción del analito se determinó cuando la pendiente al 95% de confianza de acuerdo a la ecuación de K. Stange, intersectó el LD establecido para metodología. En caso de que esto coincidiera con una fracción de 1 día, se tuvo que considerar el período incluyendo un día completo.

### **Bioseguridad**

La extracción de las muestras, y su respectivo análisis cromatográfico, se realizó en las dependencias de FARMAVET, el cual se encuentra acreditado bajo la norma ISO 17025 Of.2005. En cuanto al trabajo con animales experimentales y el manejo de agentes químicos de riesgo, fueron consideradas las indicaciones del Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT (2008) (Anexo 2), que previenen los riesgos para personas, animales y medio ambiente.

## RESULTADOS

**Objetivo específico 1: Implementar y validar metodologías analíticas por HPLC–DAD para la detección y cuantificación de tilosina en plumas, músculo e hígado de aves de engorda.**

### *Implementación y optimización de las metodologías analíticas*

Para la detección y cuantificación del analito Tilosina a partir de las matrices biológicas, se utilizaron como referencia tres metodologías analíticas descritas en la literatura:

1. *Determination of tylosin residues in pig tissues using high-performance liquid chromatography (De Liguoro et al., 1998).*
2. *Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feedingstuffs with HPLC-UV/DAD at 1 ppm level (Civitareale et al., 2004).*
3. *Withdrawal Times of Oxytetracycline and Tylosin in Eggs of Laying Hens after Oral Administration (Muñoz et al., 2014).*

A partir de las referencias señaladas se formularon dos cartas de trabajo con las metodologías analíticas para la extracción del analito de interés; 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.

Dentro de los cambios realizados para la optimización de las metodologías de extracción (Tabla 1), se redujo el gramaje de la muestra de 10 a 5 gramos para todas las matrices estudiadas, se aumentó el volumen de los solventes utilizados para la extracción del analito a partir de las plumas, se aumentó el volumen de elución de las muestras de 2 a 7 mL de metanol y se disminuyó el volumen de los solventes utilizados para lavar las columnas SCX para todas las matrices de estudio. Los cambios mencionados, fueron necesarios para lograr una mayor recuperación del analito a partir de las matrices señaladas.

**Tabla 1.** Cambios realizados para la optimización de las metodologías analíticas para la extracción de Tilosina.

<b>Parámetros</b>	<b>Matriz</b>	<b>Resultado</b>
Reducción del gramaje de las muestras	Plumas Músculo e Hígado	Mayor retención del analito
Aumento del volumen de los solventes	Plumas	Aumento en la recuperación
Disminución del volumen de lavado de las columnas SCX	Plumas Músculo e Hígado	Sin cambios en la recuperación
Aumento del volumen de elución	Plumas Músculo e Hígado	Aumento en la recuperación

Para determinar si la metodología implementada cumplía con los objetivos para la extracción de tilosina, se detectó cromatográficamente el analito de interés y se determinó la linealidad a partir de curvas de calibración fortificadas a concentraciones de 50, 100, 150, 200, 250 ppb (Tabla 2), en las cuales el  $R^2$  fue mayor a 0,97.

**Tabla 2.** Carta de fortificación de Tilosina para HPLC-DAD.

<b>Fortificación Curva de Calibración</b>				
<b>Analitos</b>	<b>S.S(ng/mL)</b>	<b>Pesaje matriz (g)</b>	<b>Alicuota (µl)</b>	<b>Conc. Final (ng/g)</b>
Tilosina	2500	5	100	50
			200	100
			300	150
			400	200
			500	250

### ***Validación de las metodologías analíticas***

Para la validación de los métodos analíticos se trabajó con un protocolo interno, el cual se basó en las guías de validación de la UE: decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE (CE, 2002) y la FDA: VICH GL49 *validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011). Cabe destacar que la metodología para la extracción del analito a partir del matriz músculo ya se encontraba previamente implementada y validada por FARMAVET. De acuerdo a lo señalado se determinaron siguientes parámetros:

## 1. Tiempo de retención del analito

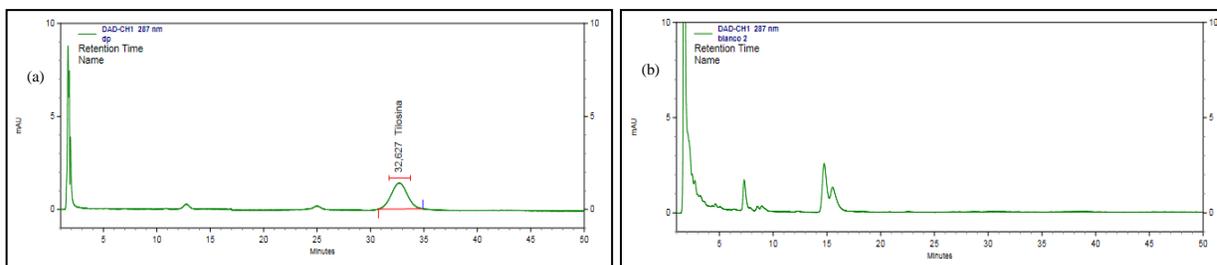
Es el tiempo característico que transcurre después de la inyección de la muestra para que el *peak* de un analito en particular alcance el detector bajo condiciones determinadas. Para determinar el tiempo de retención se analizó el CV% de las seis inyecciones de droga pura, y se observó la variabilidad en los tiempos de retención del analito para los seis análisis, el criterio para aceptar el parámetro valido fue respecto al CV% el cual debía ser menor al 5% de variación para el analito de interés: Tilosina. Los promedios de los tiempos de retención y los respectivos CV% se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Tiempos de retención y CV% a partir de seis inyecciones de droga pura de Tilosina.

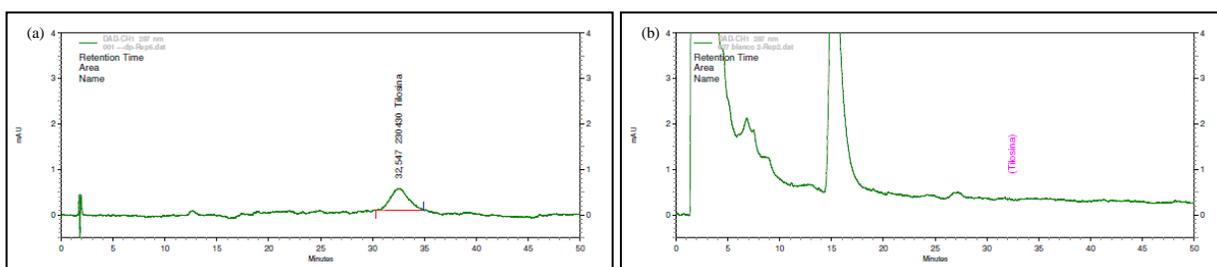
Analito	Matriz biológica	Tiempo de retención (min.)							
		1	2	3	4	5	6	Promedio	CV%
Tilosina	Plumas	34,05	34,05	31,91	31,88	32,04	34,03	32,99	3,50
	Hígado	31,53	32,13	31,54	30,27	32,55	32,57	31,76	2,72

## 2. Especificidad

Para comprobar la especificidad del método analítico se determinó si existían interferencias en el tiempo de retención de tilosina mediante el análisis de las 20 muestras libres de antimicrobianos provenientes de plumas comerciales de pollos broiler. Dentro del grupo de muestras analizadas, los resultados demostraron que no hay presencia de interferentes en el tiempo de retención específico del analito, para las matrices biológicas evaluadas. En la Fig. 1 y 2 se muestran los cromatogramas a partir de la inyección de una droga pura y a partir de muestras de pluma e hígado libres de residuos de tilosina. El método se consideró específico, ya que los resultados de los análisis demostraron que no hay presencia de interferentes en el tiempo de retención del analito de interés.



**Figura 1.** Cromatogramas a partir de muestras de plumas (a) inyección de droga pura representativa de los 6 análisis (b) muestra blanco representativa de los 20 análisis.



**Figura 2.** Cromatogramas a partir de muestras de hígado (a) inyección de droga pura representativa de los 6 análisis (b) muestra blanco representativa de los 20 análisis.

### 3. Límite de detección (LD)

El LD es la concentración más pequeña de un analito que proporciona una señal instrumental significativamente diferente, de forma tal que pueda ser distinguida de la señal de fondo o ruido. Para la definición del LD, 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  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  en las matrices evaluadas.

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 4.

**Tabla 4.** Promedio, DS y CV% de las concentraciones detectadas de Tilosina en las 20 repeticiones fortificadas al LD en las matrices biológicas plumas e hígado.

Analito	Matriz biológica	LD (ug kg <sup>-1</sup> )	Promedio de las 20 repeticiones (ug kg <sup>-1</sup> )	Desviación Estándar (DS)	CV%
Tilosina	Plumas	50	57,88	8,60	14,86
	Hígado	50	55,73	9,78	17,55

#### 4. Límite de cuantificación (LC)

El LC es considerado como el límite de concentración más bajo que se puede cuantificar en forma precisa por el método analítico. 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 64,10 µg kg<sup>-1</sup> y 66,03 µg kg<sup>-1</sup> para tilosina en pluma e hígado, respectivamente (Tabla 5).

**Tabla 5.** Calculo del LC para el analito Tilosina en las matrices biológicas plumas e hígado.

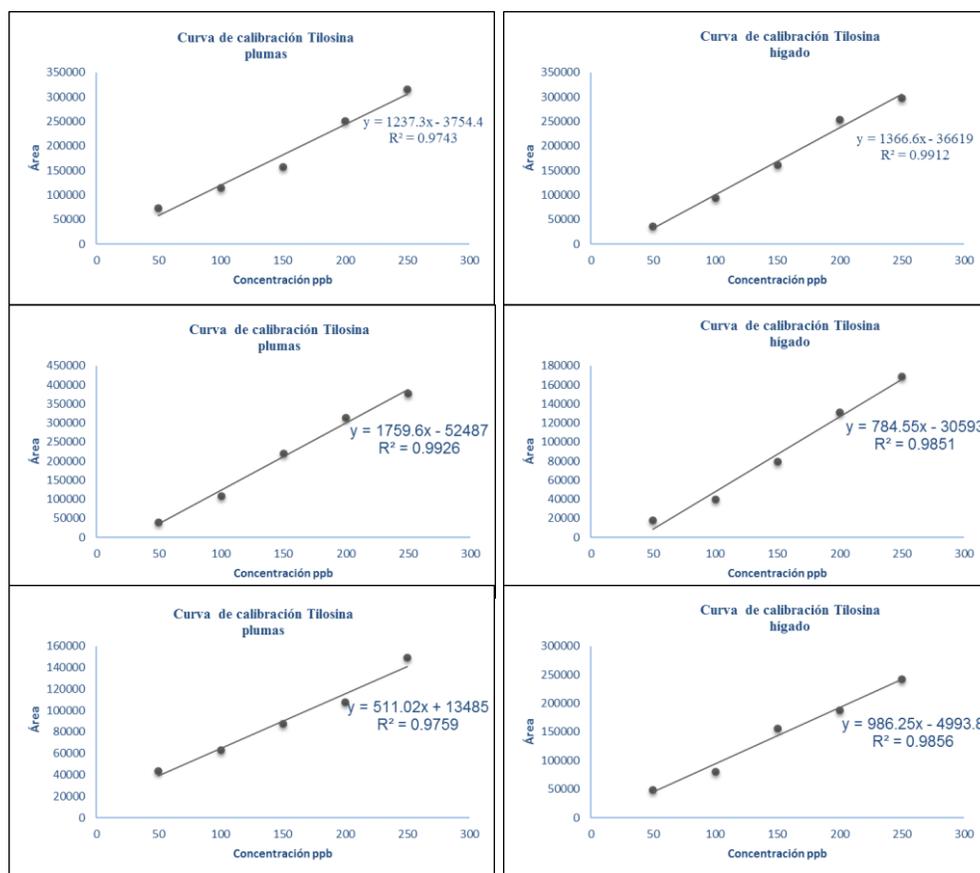
Analito	Matriz	Calculo LC (LD+1,64 DS de las 20 repeticiones)	LC (µg kg <sup>-1</sup> )
Tilosina	Plumas	$50 + 1,64 * 8,60$	64,10
	Hígado	$50 + 1,64 * 9,78$	66,03

#### 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: 50, 100, 150, 200 y 250 µg kg<sup>-1</sup>, para cada una de las tres matrices, con el fin de determinar la linealidad del método (Figura 3). Estas concentraciones fueron definidas teniendo en cuenta el LD y LMR establecido para la matriz músculo por la decisión de la Comisión Europea (CE, 2009). La linealidad de las curvas de calibración fue aceptada debido a que el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) fue

mayor a 0,96 en las matrices evaluadas, 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 6).

**Figura 3.** Curvas de calibración de 5 niveles de concentración (50, 100, 150, 200, 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), en las matrices plumas e hígado.



**Tabla 6.**  $R^2$  y CV% de las tres curvas de calibración fortificadas a cinco niveles de concentración (50, 100, 150, 200, 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), para las matrices plumas e hígado.

<b><math>R^2</math> de las curvas de calibración</b>						
<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>Curva 1</b>	<b>Curva 2</b>	<b>Curva 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>CV%</b>
Tilosina	Plumas	0,9743	0,9926	0,9759	0,98	1,03
	Hígado	0,9912	0,9851	0,9856	0,99	0,34

## 6. Recuperación

La recuperación o capacidad de extracción del analito desde las matrices evaluadas, fue calculada con muestras blanco fortificadas en tres niveles de concentraciones 50, 150 y 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . El analito tilosina presento una recuperación para el LD de un 109,12% y 105,33% con un CV de un 8% y 7%, para las matrices de plumas e hígado respectivamente. En la Tabla 7 se muestran los promedios, DS y CV% para todas las concentraciones de trabajo (50, 150 y 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), 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 7.** Promedios, DS y CV% de las recuperaciones de Tilosina a partir de las matrices biológicas, según las concentraciones de trabajo 50, 150 y 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Analito	Matriz	Concentración ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recuperación (%) (promedio)	Desviación estándar (DS)	CV (%)
Tilosina	Plumas	50	109,12	0,09	8
		150	93,92	0,06	6
		250	101,83	0,02	2
	Hígado	50	105,33	0,07	7
		150	101,80	0,05	5
		250	101,48	0,02	2

## 7. Precisión

La precisión es la capacidad de la metodología de entregar el mismo resultado en mediciones diferentes. 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: 50, 150 y 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Se calculó el promedio, la DS y el CV% para cada nivel de fortificación (Tabla 8), los resultados se compararon con los resultados de las seis curvas realizadas para la reproducibilidad intralaboratorio (Tabla 9), a los mismos niveles de fortificación, pero realizadas por dos analistas, en 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 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y de un 23% de variación para la

concentración de 150 y 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 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 (CE, 2002) (Tabla 10). Según los resultados obtenidos los parámetros se aceptan, por lo cual el método descrito es preciso.

**Tabla 8.** Repetibilidad, muestra el promedio, DS y CV% de las concentraciones cuantificadas para cada nivel de fortificación de 50, 150, 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Precisión: Repetibilidad					
Analito	Matriz	Concentración ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Concentración cuantificada (%) (promedio)	Desviación estándar (DS)	CV (%)
Tilosina	Plumas	50	54,6	4,36	7,99
		150	140,9	8,72	6,19
		250	254,6	4,35	1,71
	Hígado	50	53,7	4,17	7,77
		150	142,7	8,34	5,85
		250	253,6	4,17	1,64

**Tabla 9.** Reproducibilidad intralaboratorio, muestra el promedio, DS y CV% de las concentraciones cuantificadas para cada nivel de fortificación de 50, 150, 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Precisión: Repetibilidad					
Analito	Matriz	Concentración ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Concentración cuantificada (%) (promedio)	Desviación estándar (DS)	CV (%)
Tilosina	Plumas	50	54,9	6,08	11,07
		150	140,2	12,16	8,68
		250	254,9	6,08	2,38
	Hígado	50	52,5	7,23	13,76
		150	145,0	14,45	9,97
		250	252,5	7,23	2,86

**Tabla 10.** Comparación de los CV% de la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio, para las matrices plumas e hígado.

Matriz	CV %
--------	------

	<b>Concentración</b> <b>(<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Repetibilidad</b>	<b>Reproducibilidad</b>
Plumas	50	7,99	11,07
	150	6,19	8,68
	250	1,71	2,38
Hígado	50	7,77	13,76
	150	5,85	9,97
	250	1,64	2,86

**Objetivo específico 2: Detectar y cuantificar concentraciones de tilosina en plumas, músculo e hígado de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de dicho antimicrobiano.**

Las concentraciones de Tilosina 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  $R^2 \geq 0,95$ .

***Cuantificación de Tilosina en músculo e hígado de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial (Tilosina Tartrato 80%).***

En la cuantificación del analito de estudio, a partir de las matrices músculo e hígado de pollos broiler tratados, las concentraciones determinadas a partir del día 4 post tratamiento cuantificaron bajo el LD de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  establecido para la metodología analítica, condición que se observó en los siguientes puntos de muestreo evaluados. Por lo tanto, a lo largo del estudio de depleción del fármaco en estas matrices, las concentraciones se encontraron por debajo del LMR ( $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) establecido para músculo en Chile y por la UE. En la Tabla 11 se muestran las concentraciones promedio determinadas de tilosina, para los diferentes días post tratamiento en las matrices mencionadas.

**Tabla 11.** Concentración de Tilosina en músculo e hígado de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial para aves de engorda (tilosina tartrato al 80%).

Matriz	Número de muestreo	Días Post tratamiento	Edad pollos (días)	Concentración promedio de Tilosina ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Músculo	1	4	30	<LD*
	2	7	33	<LD*
Hígado	1	4	30	<LD*
	2	7	33	<LD*

LD\* ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ )

***Cuantificación de Tilosina en plumas de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial.***

Los resultados del estudio muestran que en las plumas a partir del día 4 post tratamiento, se detectaron altas concentraciones de tilosina, en donde el promedio de las concentraciones detectadas fue de 2588,77  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Al día 7 post-tratamiento, las concentraciones del analito en esta matriz, disminuyeron aproximadamente en un 67%, llegando a una concentración promedio de 3001,93  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , correspondiente al término del periodo de resguardo establecido para músculo, para la formulación farmacéutica utilizada (tilosina tartrato al 80%). Sin embargo, a pesar de la declinación observada a lo largo del estudio, las concentraciones detectadas y cuantificadas en plumas, sobrepasaron el LMR establecido por Chile y la UE para músculo (100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Esta condición se mantuvo hasta el día 15 post tratamiento donde las concentraciones detectadas siguieron cuantificando por sobre el LMR establecido para músculo. En la Tabla 12 se muestran las concentraciones promedio de tilosina, de acuerdo a los días post tratamiento.

**Tabla 12.** Concentración de Tilosina en plumas de pollos broiler tratados con una formulación farmacéuticas comercial para aves de engorda (tilosina tartrato al 80%).

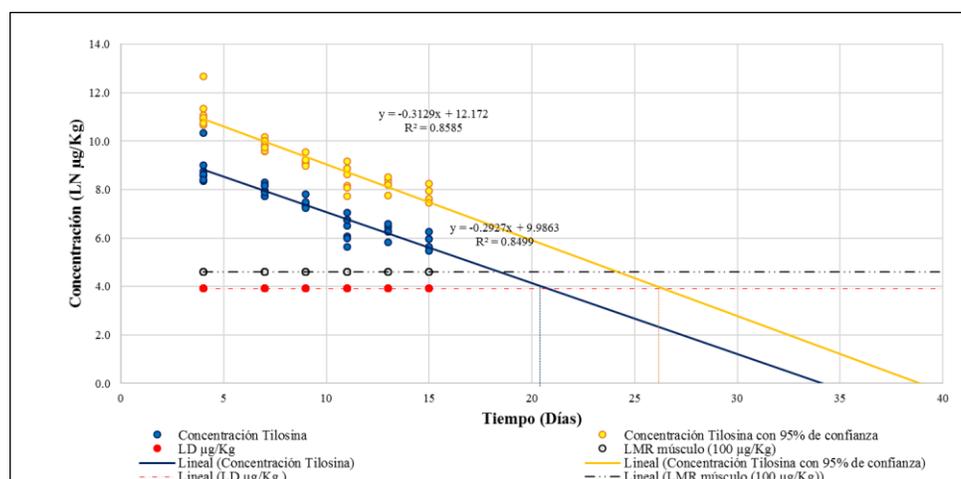
<b>Matriz</b>	<b>Muestreo</b>	<b>Días Post tratamiento</b>	<b>Edad pollos (días)</b>	<b>Concentración promedio de Tilosina (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>
Plumas	1	4	30	9246,53
	2	7	33	3001,93
	3	9	35	1710,59
	4	11	37	664,77
	5	13	39	552,23
	6	15	41	356,59

**Objetivo específico 3: Evaluar y comparar la depleción de las concentraciones cuantificadas de tilosina en plumas, músculo e hígado de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de dicho antimicrobiano.**

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

Para las matrices músculo e hígado, no se realizó un estudio de depleción, puesto que no se detectaron concentraciones del analito de interés en los muestreos 1 y 2 (correspondientes a los días 4 y 7 post tratamiento respectivamente) considerando un LD de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Los resultados obtenidos de las cuantificaciones a partir de la matriz plumas, 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 26.4, 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 27 días para que con un 95% de confianza las concentraciones de tilosina sean iguales o menores al LD ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) determinado.



**Figura 4.** Depleción de Tilosina en plumas de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica de Tilosina tartrato al 80%.

## DISCUSIÓN

Las plumas de pollos broiler, tienen gran utilidad como materia prima para diferentes fines, siendo incorporadas en la elaboración de fertilizantes, biodiesel y como ingrediente para bioplásticos. Además, son utilizadas como insumo para piensos en la alimentación de diferentes especies animales (rumiantes, aves, cerdos, peces), reincorporando de esta forma concentraciones de antimicrobianos a la cadena alimenticia. Sin embargo, la presencia de concentraciones de antimicrobianos en esta matriz a la fecha ha sido estudiada por un número reducido de autores (San Martín *et al.*, 2007; Cornejo *et al.*, 2011; Cornejo *et al.*, 2012; Berendsen *et al.*, 2013 y Heinrich *et al.*, 2013). Por su parte, en el estudio realizado por Love *et al.*, (2012) se detectó la presencia de diferentes familias de antimicrobianos en harinas de plumas obtenidas a partir de diversas fuentes, en las cuales el 75% de la frecuencia de detección correspondió al grupo de los macrólidos. Conjuntamente, demostraron que pueden permanecer residuos de antimicrobianos incluso después de someter las plumas a altas temperaturas de autoclave para transformarlas en harina de plumas, concluyendo que no deben ser incorporadas en las dietas de animales de producción. Por lo tanto, resulta de gran relevancia realizar estudios en esta matriz y comparar los resultados con los obtenidos a partir de tejidos comestibles. Para cumplir con esta finalidad, se requirió de la implementación y validación de un método analítico por HPLC-DAD que fuese apto para uso previsto, siendo capaz de detectar el analito de interés.

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 (2002/657/CE) y de la FDA (VICH GL49), con el fin de demostrar que el método era apto para su uso, es decir, para el propósito determinado de detectar y cuantificar tilosina en plumas, músculo e hígado en forma confiable y precisa.

Previo a la validación, se realizó la implementación de la metodología analítica de extracción a partir de las matrices de estudio (plumas, músculo e hígado), utilizando como referencia la siguiente metodología analítica: “*Método analítico para la detección de Tilosina en músculo por HPLC-DAD*”, basada en metodologías anteriormente descritas por De Liguoro *et al.*, (1998) y Civitareale *et al.*, (2004) y Muñoz *et al.*, (2014). A partir de

estas se generó un protocolo de extracción y purificación de las muestras, el cual posteriormente fue modificado para su optimización.

Dentro de las diferentes modificaciones realizadas para la optimización de la metodología analítica implementada para la extracción de tilosina, se observó que al reducir el gramaje de las muestras de 10 gramos (método original para músculo) a 5 gramos (método optimizado), se produce un efecto de dilución de la matriz, que al tener más solvente permite una mejor retención del analito. En el caso de las plumas, resulto necesario aumentar la cantidad de solventes utilizados en la carta de trabajo para la extracción del analito, por el mayor volumen que presenta esta matriz, sumado al contenido graso que presentan externamente lo cual le otorga cierto grado de impermeabilidad (Kovalev, *et al.*, 2013). De este modo, se logró aumentar la recuperación del analito de interés en esta matriz, al igual que con el aumento de la cantidad de metanol utilizado en la elución de las muestras (en las tres matrices de estudio).

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  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  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 (CE, 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 tilosina que puede ser detectada por el método analítico en plumas, músculo e hígado de pollo. El LC 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 tilosina en plumas, músculo e hígado a concentraciones iguales o mayores a 64,10 y 66,03  $\mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente. 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 del analito se consideran como no detectadas (ND).

Con respecto al tiempo de retención del analito de interés a partir de las diferentes matrices, se observaron leves diferencias, las cuales se encontraban dentro del 5% de variación. Esto se atribuye a la presencia de interferentes como grasa, lo que produce un retraso en tiempo al cual aparece la expresión cromatográfica del analito. Las curvas de calibración se realizaron en intervalos de trabajo de 50, 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , y presentaron una linealidad con un  $R^2$  mayor a 0,96, cumpliendo el requisito establecido en la decisión 657/2002/CE para las tres matrices biológicas. 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 se establece por:  $y = a+bx$ , 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 detector de arreglo de fotodiodos (DAD) como área, es proporcional a la concentración del analito de interés.

En relación a la recuperación de las metodologías, la cual refleja la extracción del analito a partir de la matriz biológica, se observó que, en todas las matrices evaluadas, la recuperación del analito de interés estuvo 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 93,92 % y un 109,12% la menor y mayor porcentaje de recuperación respectivamente. 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 repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio. Para el caso de la reproducibilidad, que corresponde a la precisión bajo condiciones de trabajo diferente, se realizaron seis curvas a concentraciones de 50, 150 y 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$  realizadas en días diferentes, por 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 con el mismo lote de reactivos y solventes. Los resultados para el analito en las tres matrices de estudio, 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 reactivos y solventes.

Mediante la implementación y validación de la metodología analítica es posible detectar residuos de este antimicrobiano en tejidos comestibles (músculo e hígado) y en plumas de aves tratadas, de forma confiable y precisa, constituyendo así la base del estudio de depleción, con la finalidad de establecer el tiempo en que el fármaco es depletado a partir de las matrices de estudio. En los anexos 5 y 6 se muestran los resúmenes de validación para las matrices de trabajo plumas e hígado respectivamente.

En la actualidad, existen diversos estudios de depleción de este fármaco en diferentes productos de la industria avícola. Vandenberghe *et al.*, (2012) determinaron la presencia de residuos de tilosina en músculo e hígado de pollos de engorda posterior a su administración en pienso, concluyendo que las concentraciones de este fármaco permanecieron por debajo del LC ( $2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) en músculo y solo se encontraron pequeñas concentraciones en hígado que cayeron debajo al LC al día 3 post tratamiento. En adición, Montesissa *et al.*, (1999), posterior a una administración en el agua de bebida de tilosina tartrato a pavos, detecto niveles de este fármaco por debajo del LD ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) en tejidos comestibles (músculo, hígado, riñón y piel/grasa). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, en el cual las concentraciones se encontraron por debajo del LD establecido para la técnica ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) a partir del día 4 post tratamiento en músculo e hígado. 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. En contraste, Soliman y Sedek, (2016), luego de una administración oral de 50 mg/kg de tilosina base por 5 días consecutivos a pollos de engorda, detectaron concentraciones del fármaco hasta el día 5 post tratamiento en hígado y riñón.

A la fecha no existen estudios de este antimicrobiano en plumas de aves tratadas. Por lo tanto, este es el primer estudio que evalúa el comportamiento de este antimicrobiano en la

matriz pluma, y lo compara con las concentraciones detectadas en músculo e hígado. Los resultados de la presente investigación, concuerdan con los obtenidos por otros autores en otros antimicrobianos respecto a este tema, realizados por San Martín *et al.*, (2007) y Cornejo *et al.* (2012), en enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacino en tejidos comestibles y plumas de gallinas ponedoras y aves de engorda, respectivamente. Por otra parte, la depleción de tres formulaciones de flumequina fue estudiada por Cornejo *et al.* (2011) en tejidos comestibles y plumas de pollos broiler. Los estudios realizados por Berendsen *et al.* (2013) y Heinrich *et al.* (2013) describieron la bioacumulación de residuos farmacológicos (oxitetraciclina y ceftiofur) en plumas de pollos tratados, habiendo respetado los períodos de resguardo respectivos, e incluso cuando las concentraciones en músculo e hígado, los tejidos comestibles estudiados, fueron menores a los LMR respectivos o derechamente no eran detectables. Por consiguiente, los estudios mencionados demostraron que los antimicrobianos se bioacumulan en concentraciones mayores en las plumas de las aves tratadas que en tejidos comestibles, una vez finalizada la terapia y respetados los periodos de resguardos establecidos para la formulación farmacéutica utilizada.

La importancia de estudiar las concentraciones de antimicrobianos presentes en las plumas radica en que estos subproductos son incorporados como harina de plumas en la alimentación de otros animales. De esta forma se describe que son parte de la alimentación de animales destinados al 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 la elaboración de piensos (Meeker y Hamilton, 2006; Divakala *et al.*, 2009). En el caso de Chile, del total de carne exportada en el año 2012, 79,8% correspondió a carne y subproductos de pollo y 20,2%, a carne y subproductos de pavo. El crecimiento en la producción nacional está enfocado a aumentar los volúmenes de exportación de los diversos productos y subproductos que se generan, ya que no podría ser absorbido por la demanda interna del país, siendo el mercado asiático el que se ha consolidado con la demanda de subproductos de la industria avícola interna (ODEPA, 2014). En nuestro país, se encuentra autorizado el uso de harina de plumas como ingrediente para producción de alimentos o suplementos animales (Resolución N° 557 de

1980 del SAG), teniendo una alta demanda en la industria acuícola (utilizada en la alimentación de salmones y camarones) y en el mercado de los pets.

En este estudio se observa que la depleción de tilosina a partir de las plumas de pollos broiler, fue paulatina, observándose una declinación de las concentraciones del fármaco a lo largo del estudio de depleción (al día 4, 7, 9, 11, 13 y 15 post tratamiento). De esta forma, se evidenciaron concentraciones detectables durante todo el periodo de 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 que las concentraciones de tilosina en los tejidos comestibles (músculo e hígado) se encuentran por debajo del LMR permisible o incluso por debajo del LD ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) establecido para la técnica, siendo concentraciones no detectables para la metodología analítica, en las plumas es posible detectar y cuantificar el analito de interés, en concentraciones que sobrepasan el LMR establecido para músculo.

Las altas concentraciones obtenidas en plumas no pueden atribuirse a la contaminación externa, ya que las aves fueron criadas en jaulas de alambre de piso elevado, evitando la contaminación fecal, además de ser alimentadas con pienso y agua no medicados.

Las concentraciones elevadas podrían explicarse por las características farmacocinética del antimicrobiano, puesto que es rápidamente absorbido a nivel gastrointestinal, con una baja unión a proteínas plasmáticas y amplia distribución a los fluidos y tejidos del cuerpo, con una alta liposolubilidad (Lewicki, 2006; Vandenberg *et al.*, 2012), por lo que podría alcanzar altas concentraciones en los tejidos periféricos como piel y plumas. En adición, las concentraciones a nivel de tejidos (músculo e hígado) no fueron detectadas y solo se observó en la matriz plumas. Esto, también se podría atribuir a una contaminación externa a través de la glándula uropigeal de las aves, la cual corresponde al órgano responsable de la producción de una mezcla de una sustancia serosa de ácidos grasos y esteroides que distribuyen por su plumaje durante el acicalamiento (Sandilands *et al.*, 2004). Sin embargo, el no encontrar concentraciones residuales de tilosina en los tejidos diana (músculo e hígado), haría menos probable que las concentraciones encontradas en plumas sean de origen glandular. Por otra parte, Cornejo *et al.*, (2011), sugieren que las generación

y cambio de plumaje determinarían la cinética de los fármacos en las plumas, ya que, durante la madurez, los pollitos experimentan un cierto número de muda del plumaje. En adición, la lenta eliminación del fármaco, podría explicarse por la reabsorción de la pulpa vascularizada que llena el eje de las plumas durante la maduración, y que, al discontinuarse, podría acumular el fármaco.

De este modo, las plumas son una importante ruta de ingreso de concentraciones de antimicrobianos a la cadena alimenticia, llegando a ser un gran riesgo para la salud pública, especialmente en el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. Además, el uso inadecuado de estos fármacos contribuye a la selección de cepas bacterianas resistentes que pueden persistir en el medio ambiente producto de los desechos producidos, tanto por la industria farmacéutica, el uso terapéutico en medicina humana y veterinaria, y en producción de animales, ya que además de la eliminación a través de la orina y heces, residuos de antimicrobianos pueden permanecer en los productos y subproductos de origen animal.

Considerando la evidencia científica publicada y la importancia para la salud pública, resulta necesario estudiar esta matriz no comestible como posible ruta de reingreso de residuos de otras familias de antimicrobianos a través de la cadena alimenticia y relacionarlo con las concentraciones presentes en los tejidos comestibles.

## CONCLUSIONES

Esta memoria de título sustenta la hipótesis planteada de que concentraciones de tilosina permanecen en plumas de pollos boiler tratados con este antimicrobiano, en concentraciones mayores y por tiempos más prolongados que en tejidos comestibles (músculo e hígado).

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-DAD), es una herramienta selectiva, específica y sensible, que permite la detección y cuantificación del analito tilosina a partir de las tres matrices de estudio.

De acuerdo a este estudio de depleción demostró que concentraciones de tilosina perduran en plumas por un periodo prolongado, permaneciendo en concentraciones iguales o mayores al LD ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) hasta el día 27 post tratamiento con un 95% de confianza. Situación que es de gran relevancia, al considerar que las plumas son utilizadas como harina de plumas en la alimentación de otras especies productivas.

Con respecto a los resultados obtenidos, las aves sacrificadas el día 42 de vida, deben ser tratadas con tilosina tartrato al 80% hasta el día 15, para asegurar que las concentraciones del antimicrobiano se encuentren bajo el LD ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) establecido para la técnica, tanto en tejidos comestibles como en plumas de aves de tratadas.

Finalmente, un futuro estudio realizado en harina de plumas ya procesadas podría mostrar y determinar el comportamiento de este antimicrobiano una vez procesada la matriz. De igual forma, las plumas podrían ser utilizadas como una matriz de muestra no invasiva para el monitoreo de residuos de diferentes medicamentos de uso veterinario utilizados en aves de producción.

## BIBLIOGRAFÍA

**ALLIANCE FOR THE PRUDENT USE OF ANTIBIOTICS. APUA.** 2010. Antibiotics in food animal production: A forty year debate. *APUA (Alliance for the Prudent Use of Antibiotic)*. 18(2):1-27.

**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.

**ANDERSON, A. D.; NELSON J. M.; ROSSITER S.; ANGULO, F.J.** 2003. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microb. Drug Resist.* 9(4):373-379.

**ARUNLERTAREE, C.; MOOLTHONGNOI, C.** 2008. The use of fermented feather meal for replacemnet of fish meal in the diet of oreochromis niloticus. *Environ. Nat. Resour. J.* 6:13-24.

**ASOCIACION DE PRODUCTORES AVICOLAS. APA.** 2014. Análisis sectorial. Producción 2014. [en línea] < <http://www.apa.cl/industria/11/anlisis-sectorial> > [consulta: 05-11-2015].

**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.

**BEYENE, T.** 2016. Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health. *Journal of Veterinary Science & Technology*. 2016.

**BOTSOGLOU, N.A.; FLETOURIS, D.J.** 2001. *Drug Residues in Food*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.

**CHERLET, M.; DE BAERE, S.; CROUBELS, S.; DE BACKER, P.** 2002. Quantitation of tylosin in swine tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* 473(1): 167-175.

**CHILE. MINISTERIO DE SALUD. MINSAL.** 2009. Ley 20.380 sobre protección de animales. 03 octubre 2009.

**CHILE. MINISTERIO DE SALUD. MINSAL.** 2014. Resolución exenta N°551. Fija límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos para consumo humano. 19 agosto 2014.

**CHILE. MINISTERIO DE AGRICULTURA.** 2016. Resolución exenta N°1992. Establece nómina de aditivos autorizados para la elaboración y fabricación de alimentos y suplementos para animales. 13 mayo 2006.

**CHILE. SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. SAG.** 1980. Resolución exenta N°557. Establece nómina de ingredientes autorizado para la producción de alimentos o suplementos para animales. 02 abril 1980.

**CHILE. SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. SAG.** 2014. Resolución Exenta N° 8063. Aprueba Instructivo Técnico para la Determinación de Residuos en Productos Pecuarios. 18 agosto 2014.

**CIVITAREALE, C.; FIORI, M.; BALLERINI, A.; BRAMBILLA, G.** 2004. Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feedingstuffs with HPLC–UV/DAD at 1ppm level. *J. of pharm. Biomed. anal.* 36(2): 317-325.

**CODEX ALIMENTARIUS COMMITTEE.** 2003. Harmonized IUPAC guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, CAC/GL 49. Codex. Rome, Italy.

**COMISIÓN EUROPEA. CE.** 2002. Decisión de la comisión 2002//657/CE en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.

**COMISION EUROPEA. CE.** 2003. Reglamento N° 1831/2003 del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal.

**COMISIÓN EUROPEA. CE.** 2009. Reglamento N° 1099/2009 del consejo de 24 de septiembre de 2009 relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza.

**COMISIÓN EUROPEA. CE.** 2010. Directiva 2010/63/UE. Diario oficial de la Unión Europea. L 276: 33-79.

**COMISIÓN EUROPEA. CE.** 2010. Reglamento (CE) N° 37/2010 del consejo del 22 de septiembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación respecto a los límites máximos de residuos en los alimentos de origen animal.

**CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGÜEN, D.; PIZARRO, N.; HIDALGO, H.; SAN MARTIN, B.** 2011. 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. **In:** Residues of veterinary drugs in food: Proceedings of the Euro Residue VII Conference. Egmond aan Zee, The Netherlands. 14-16 May 2012. Volume 1, 2 and 3. pp 683-688.

**CORNEJ, J; RIQUELME, R.; POKRANT, E.; MADDALENO, A.; ARAYA, C.; SAN MARTIN, B.** 2016. Implementation and in-house validation of an analytical methodology for the detection of florfenicol (ff) and florfenicol amine (ffa) residues in feathers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (lcms/ms). **In:** Euro ResidueVII. Conferencia on Residues of Veterinary Drogs in food. Hotel Zuiderduin Egmond aan Zee The Netherlands .23 y 25 de mayo. 2016. pp 175.

**DE LIGUORO, M.; MONTESISSA, C.; ANFOSSI, P.; ANGELETTI, R.** 1998. Determination of tylosin residues in pig tissues using high-performance liquid chromatography. *Analyst.* 123(6): 1279-1282.

**DEWDNEY, J.; MAES, L; RAYNAUD, J.; BLANC, F.; SCHEID, J.; JACKSON, T.; VERSCHUEREN, C.** 1991. Risk assessment of antibiotic residues of  $\beta$ -lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food and Chemical Toxicology.* 29(7): 477-483.

**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.

**EUROPEAN MEDICINES AGENCY. EMA.** 2016. Note for guidance: Approach towards harmonization of withdrawal periods, EMA/CVMP/SWP/735325/2012.

**EUROPEAN MEDICINES AGENCY. EMA.** 2000. Committee for Veterinary Medicinal Products. London. United Kingdom. March 2000. Veterinary Medicines and Information Technology. 3pp.

**EUROPEAN MEDICINES AGENCY. EMA.** 2002. Committee for Veterinary Medicinal Products. London. United Kingdom. January 2002. Veterinary Medicines and Information Technology. 2pp.

**EUROPEAN MEDICINES AGENCY. EMA.** 2011. Reflection paper on the use of macrolides, lincosamides and streptogramins (MLS) in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. London. United Kingdom. 14 november 2011. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. 42pp.

**EUROPEAN COUNCIL ON FOREIGN RELATIONS. EFCR.** 2016. Tolerancias para residuos de nuevos fármacos de animales en los alimentos. [en línea]. <[http://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=fedfe8b9e21875e35e8462a41527a1f3&ty=HTML&h=L&r=PART&n=21y6.0.1.1.17#se21.6.556\\_1740](http://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=fedfe8b9e21875e35e8462a41527a1f3&ty=HTML&h=L&r=PART&n=21y6.0.1.1.17#se21.6.556_1740)> [consulta: 26-01-2016].

**FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA.** 2011. VICH GL49 validation of analytical methods used in residue depletion studies. 22 p.

**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.

**HOFACRE, C.; FRICKE, J.; INGLIS, T.,** 2013. Antimicrobial use in poultry. **In:** Griguere, S., Prescott, J., Dowling, P. (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Fifth Ed. Wiley Blackwell. Ames. IA. USA. pp. 569-588.

**JANSEN, L.; BOLCK, Y.; BERENDSEN, B.** 2016. Feather segmentation analysis for monitoring off-label use of antibiotics in the poultry sector. **In:** Euro ResidueVII. Conferencia on Residues of Veterinary Drogas in food. Hotel Zuiderduin Egmond aan Zee The Netherlands .23 y 25 de mayo. 2016. pp 175.

**JEONG, S.; KANG, D.; LIM, M.; KANG, C.; SUNG, H.** 2010. Risk assessment of growth hormones and antimicrobial residues in meat. *Toxicological research.* 26(4): 301.

**JI, L.-W.; DONG, L.-L.; JI, H.; FENG, X.-W.; LI, D.; DING, R.-L.; JIANG, S.-X.** 2014. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of tylosin tartrate and tylosin phosphate after a single oral and iv administration in chickens. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics.* 37(3): 312-315.

**JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. JECFA.** 2008. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. **In** Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting 70<sup>th</sup>. 2008: Genova. Suiza. Organizacion Mundial de la Salud. pp. 1-144.

**JUAN, C.; MOLTÓ, J.; MAÑES, J.; FONT, G.** 2010. Determination of macrolide and lincosamide antibiotics by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in meat and milk. *Food Control.* 21(12):1703-1709.

**KOVALEV, A.; FILIPPOV, A.; GORB, S.** 2013. Unzipping bird feathers. *J. R Soc. Interface* 11: 20130988. 8 pág.

**KOVALENKO, K.; ROASTO, M.; ŠANTARE, S.; BĒRZIŅŠ, A.; HÖRMAN, A.** 2014. Campylobacter species and their antimicrobial resistance in Latvian broiler chicken production. *Food Control.* (46): 86-90.

**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.

**LANDONI, M.F.; ALBARELLOS, G.** 2015. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *The Veterinary Journal.* 205(1):21-27.

**LEWICKI, J.** 2006. Tylosin: a review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods. 14-23. **In** 15<sup>th</sup> Session of the Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods. Ciszewskiego. Polonia. 2006. Division of Pharmacology and Toxicology. Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Agricultural University. pp. 14-23.

**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 of multiple pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). *Environmental science & technology.* 46(7): 3795-3802.

**MARCU, A.; VACARU-OPRIȘ, I.; DUMITRESCU, G.; PETCULESCU, L.; MARCU, A.; NICULA, M.; PET, I.; DRONCA, D.; KELCIOV, B.; MARIȘ, C.** 2013. The influence of genetics on economy efficiency of broiler chickens growth. *Spasb.* 46(2): 339-346.

**MEEKER, D.; HAMILTON, C.** 2006. An overview of the rendering industry. **In:** Meeker DI, editor. *Essentials of rendering: All About the animal By-product Industry.* Arlington, VA: National Renderers Association. 16 pág.

**MESTORINO, N.; DANIELE, M.; DADE, M.; VEDOVATO, V.; MARCHETTI, M.** 2016. Enrofloxacin and ciprofloxacin residues in broiler chicken feathers after oral administration. **In:** Euro Residue VII. Conferencia on Residues of Veterinary Drgs in food. Hotel Zuiderduin Egmond aan Zee The Netherlands .23 y 25 de mayo. 2016. pp 175.

**MONTESISSA, C., DE LIGUORO, M., SANTI, A., CAPOLONGO, F., & BIANCOTTO, G.** 1999. Tylosin depletion in edible tissues of turkeys. *Food Additives & Contaminants.* 16(10): 405-410.

**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 Laying Hens after Oral Administration. *J. Food Protect.* 77(6):1017-1021.

**OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS. ODEPA.** 2014. Industria avícola. [en línea]. <<http://www.odepa.cl/odepaweb/publicaciones/doc/10530.pdf>>. [consulta: 25-11-2015].

**OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS. ODEPA.** 2015a. Actualización del mercado avícola. Ministerio de Agricultura. 9pp.

**OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS. ODEPA.** 2015b. Rubro-Carnes. [en línea]. <<http://www.odepa.cl/rubro/carne/>>. [consulta: 23-03-2016].

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. OMS.** 2014. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. **In:** WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. pp. 232.

**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.

**POKRANT, E.; KROGHI, M.; MADDALENO, A.; ARAYA, C.; SAN MARTIN, B.; CORNEJO, J.** 2016. In-house validation of an analytical methodology for detection of oxytetracycline (otc), chlortetracycline (ctc) residues and their metabolites in feathers by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (lc-ms/ms). **In:** Euro Residue VII. Conferencia on Residues of Veterinary Drgs in food. Hotel Zuiderduin Egmond aan Zee The Netherlands .23 y 25 de mayo. 2016. pp 175.

**PRATS, C.; EL KORCHI, G.; FRANCESCH, R.; ARBOIX, M.; PÉREZ, B.** 2002a. Tylosin depletion from edible pigg tissues. *Rev Vet Sci.* 73(3): 323-325.

**PRATS, C.; FRANCESCH, R.; ARBOIX, M.; PEREZ, B.** 2002b. Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B.* 766(1): 57-65.

**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.

**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 couple with tandem mass spectrometry. *J Food Protect.* 70(8): 1952-1957.

**SAN MARTIN, B.; CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGUËN, D.; PÉREZ, F.; HIDALGO, H.; ANDRE, F.** 2010. Withdrawal time of four pharmaceutical formulations of enrofloxacin in poultry according to different maximum residues limits. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 33:246-251.

**SAN MARTIN, B.; GALLARDO, A.; MEDINA, P.** 2014. Manual de buenas prácticas en el uso de antimicrobianos y antiparasitarios en la salmonicultura chilena. Farmavet, Universidad de Chile-Sernapesca. 2ª ed. pp 52.

**SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. SAG.** 2014. Sistema en línea de búsqueda de medicamentos veterinarios autorizados por el SAG. [en línea] <[http://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos\\_1.asp](http://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos_1.asp)> [consulta: 07-11-2015].

**SOLIMAN, A.; SEDEK, M.** 2016. Pharmacokinetics and Tissue Residues of Tylosin in Broiler Chickens. *Pharmacology & Pharmacy.* 7(1): 36.

**SUMANO, H.; GUTIÉRREZ, L.** 2010. Farmacología clínica en aves comerciales. 4a edición México: McGraw-Hill Interamericana. 703pp.

**THOMAS, W; MOORE, S; MOORE, C.** 2001. Tylosine tartrate for the control of necrotic enteritis mortality in Broilers Chickens.

**THOMPSON, T.S.; NOOT, D.K.; CALVERT, J.; PERNAL, S.F.** 2005. Determination of lincomycin and tylosin residues in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry.* 19(3): 309-316.

**TA, Y.T.; NGUYEN, T.T.; TO, P.B.; PHAM, D.X.; LE, H.T.H.; THI, G.N.; ALALI, W.Q.; WALLS, I.; DOYLE, M. P.** 2014. Quantification, serovars, and antibiotic resistance of Salmonella isolated from retail raw chicken meat in Vietnam. *Journal of Food Protection.* 77(1): 57-66.

**VANDENBERGE, V.; DELEZIE, E.; DELAHAUT, P.; PIERRET, G.; DE BACKER, P.; DAESELEIRE, E.; CROUBELS, S.** 2012. Transfer of flubendazole and tylosin from feed at cross-contamination levels to various poultry matrices. *Poultry science.* 91(9): 2351-2360.

**WEGH, R.; BERENDSEN, B.; BLOKLAND, M.; ZUIDEMA, T.; STERK, S.** 2016. Hair and feathers: the matrix of choice for antedating the use of antibiotics,  $\beta$ -agonists and steroidesters?. **In:** Euro ResidueVII. Conferencia on Residues of Veterinary Drogas in food. Hotel Zuiderduin Egmond aan Zee The Netherlands .23 y 25 de mayo. 2016. pp 175.

## ANEXOS

**Anexo 1:** Certificado del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, para el uso de animales experimentales.



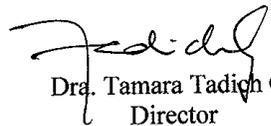
UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias  
Comité de Bioética Animal

Santiago, 20 de noviembre de 2014

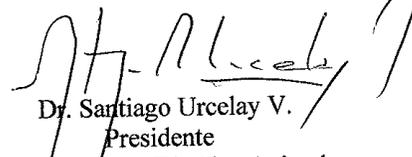
### CERTIFICADO N° 23-2014

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 Tadiç G.  
Director  
Comité de Bioética Animal



  
Dr. Santiago Urcelay V.  
Presidente  
Comité de Bioética Animal

**Anexo 2:** Certificado del Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, que estipula las medidas de bioseguridad para el trabajo en terreno y el laboratorio.



## CERTIFICADO N° 40

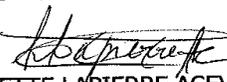
Santiago 21 de Noviembre 2014

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 3:** Metodología analítica para la extracción de Tilosina a partir de la matriz pluma.

**Detección de Tilosina en plumas mediante HPLC-DAD**

Metodología de extracción:

1. Pesar  $5 \pm 0,05$  g. de muestra en tubo falcon de 50 mL.
2. Agregar 10 mL de buffer fosfato pH 2,5 y agitar manualmente.
3. Agregar 15 mL de metanol y agitar manualmente.
4. Agregar 15 mL de agua grado HPLC y agitar manualmente.
5. Agitar por 20 min. en vórtex.
6. Sonicar por 10 min.
7. Centrifugar por 10 min. a 1780 g.
8. Filtrar el sobrenadante a través de lana de vidrio (jeringas de 50 mL), recibiendo el filtrado en otro tubo de 50 mL.
9. Centrifugar por 5 min. a 1780 g.
10. Acondicionar columnas Aromatic Sulfonic Acid SCX con: 5 mL de metanol y 5 mL de buffer fosfato pH 4.
11. Pasar la muestra a través de las columnas.
12. Lavar las columnas con: 1 mL de agua y 1 mL de buffer fosfato pH 9.
13. Eluir con 7 mL de metanol.
14. Llevar a sequedad bajo flujo suave de nitrógeno en baño de agua a 40 - 50°C.
15. Reconstituir con 350  $\mu$ l de solución agua:acetonitrilo en relación 50:50.
16. Agitar por 5 min en vórtex.
17. Sonicar por 5 min.
18. Traspasar a un tubo eppendorf y centrifugar por 5 min a 15890 g.
19. Transferir el sobrenadante a vial de inyección para HPLC.

**Anexo 4:** Metodología analítica para la extracción de Tilosina a partir de tejidos comestibles (músculo e hígado).

**Detección de Tilosina en tejidos comestibles (músculo e hígado) mediante  
HPLC-DAD**

Metodología de extracción:

1. Pesar  $5 \pm 0,05$  g. de muestra en tubo falcon de 50 mL.
2. Agregar 5 mL de buffer fosfato pH 2,5 y agitar manualmente.
3. Agregar 5 mL de metanol y agitar manualmente.
4. Agregar 15 mL de agua grado HPLC y agitar manualmente.
5. Agitar por 5 min. en vórtex.
6. Sonicar por 5 min.
7. Centrifugar por 10 min. a 1780 g.
8. Filtrar el sobrenadante a través de lana de vidrio (jeringas de 10 mL), recibiendo el filtrado en otro tubo de 50 mL.
9. Centrifugar por 5 min. a 1780 g.
10. Acondicionar columnas Aromatic Sulfonic Acid SCX con: 5 mL de metanol y 5 mL de buffer fosfato pH 4.
11. Pasar la muestra a través de las columnas.
12. Lavar las columnas con: 1 mL de agua y 1 mL de buffer fosfato pH 9.
13. Eluir con 7 mL de metanol.
14. Llevar a sequedad bajo flujo suave de nitrógeno en baño de agua a 40 - 50°C.
15. Reconstituir con 350  $\mu$ l de solución agua:acetonitrilo en relación 50:50.
16. Agitar por 5 min en vórtex.
17. Sonicar por 5 min.
18. Traspasar a un tubo eppendorf y centrifugar por 5 min a 15890 g.
19. Transferir el sobrenadante a vial de inyección para HPLC.

**Anexo 5:** Tabla resumen validación método analítico para detección de tilosina en plumas de pollo broiler.

<b><u>RESUMEN VALIDACIÓN TILOSINA</u></b>	
<b>ESPECIFICACIONES ANALÍTICAS</b>	
<b>Método analítico</b>	Tilosina en plumas
<b>Analito</b>	Tilosina
<b>Matriz/especie</b>	Plumas/pollo broiler
<b>Equipo</b>	HPLC
<b>Detector</b>	Detector DAD (278nm)
<b>Columna</b>	Chromolith Performance RP-18e 100 x 4.6 mm. Merck
<b>Fase móvil</b>	pH 3.2 ± 0.2 Sol. A: 300 mL ACN. Sol. B: 300 mL agua. Sol. C: 1L 0.02M DBAP.
<b><u>VALIDACIÓN</u></b>	
Parámetros	Validación
<b>1. Tiempo de retención (TR)</b>	32,29 min / CV: 3,5%
<b>2. Especificidad</b>	No hay interferentes en el TR del analito
<b>3. Límite de detección (LD)</b>	50 ng/g
<b>4. Límite de cuantificación (LC)</b>	64,1 ng/g
<b>5. Linealidad de la curva de calibración</b>	$R^2 > 0,97$ / CV de las pendientes: 1,03%
<b>6. Recuperación (Promedio)</b>	50 ng/g: 109,1%; 150 ng/g: 93,9%; 250 ng/g: 101,8%
<b>7. Precisión:</b>	
<b>7.1. Repetibilidad (CV%)</b>	50 ng/g: 8,0%; 150 ng/g: 6,2%; 250 ng/g: 1,7%
<b>7.2. Reproducibilidad (CV%)</b>	50 ng/g: 11,1%; 150 ng/g: 8,7%; 250 ng/g: 2,4%

**Anexo 6:** Tabla resumen validación método analítico para detección de tilosina en hígado de pollo broiler.

<b><u>RESUMEN VALIDACIÓN TILOSINA</u></b>	
<b>ESPECIFICACIONES ANALÍTICAS</b>	
<b>Método analítico</b>	Tilosina en hígado
<b>Analito</b>	Tilosina
<b>Matriz/especie</b>	Hígado/pollo broiler
<b>Equipo</b>	HPLC
<b>Detector</b>	Detector DAD (278nm)
<b>Columna</b>	Chromolith Performance RP-18e 100 x 4.6 mm. Merck
<b>Fase móvil</b>	pH 3.2 ± 0.2 Sol. A: 300 mL ACN. Sol. B: 300 mL agua. Sol. C: 1L 0.02M DBAP.
<b><u>VALIDACIÓN</u></b>	
<b>Parámetros</b>	<b>Validación</b>
<b>1. Tiempo de retención (TR)</b>	31,8 min / CV: 2,72%
<b>2. Especificidad</b>	No hay interferentes en el TR del analito
<b>3. Límite de detección (LD)</b>	50 ng/g.
<b>4. Límite de cuantificación (LC)</b>	66 ng/g.
<b>5. Linealidad de la curva de calibración</b>	$R^2 > 0,98$ / CV de las pendientes: 0,34%
<b>6. Recuperación (Promedio)</b>	50 ng/g: 105,33%; 150 ng/g: 101,80%; 250 ng/g: 101,48%
<b>7. Precisión:</b>	
<b>7.1. Repetibilidad (CV%)</b>	50 ng/g: 7,8%; 150 ng/g: 5,8%; 250 ng/g: 1,6%
<b>7.2. Reproducibilidad (CV%)</b>	50 ng/g: 13,8%; 150 ng/g: 10,0%; 250 ng/g: 2,9%