



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

**EVALUACIÓN DE LA BIOACUMULACIÓN DE RESIDUOS DE
SULFACLOROPIRIDAZINA EN PLUMAS DE POLLOS BROILER EN
RELACIÓN A SU CONCENTRACIÓN EN TEJIDOS COMESTIBLES**

Francisca Javiera Medina Pontigo

Proyecto 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

FINANCIAMIENTO: Proyecto Fondecyt de Iniciación a la Investigación 11140530

PROFESOR GUÍA: JAVIERA CORNEJO KELLY
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias; Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
2016

MEMORIA DE TÍTULO

EVALUACIÓN DE LA BIOACUMULACIÓN DE RESIDUOS DE SULFACLOROPIRIDAZINA EN PLUMAS DE POLLOS BROILER EN RELACIÓN A SU CONCENTRACIÓN EN TEJIDOS COMESTIBLES

Francisca Javiera Medina Pontigo*

*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

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
Sulfonamidas: características farmacocinéticas y situación en Chile	13
Técnicas instrumentales utilizadas en la identificación y cuantificación de residuos de sulfacloropiridazina.	15
Estudios de bioacumulación de antimicrobianos en plumas y depleción en tejidos comestibles de aves	16
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Animales experimentales	21
Grupos experimentales y muestreos	22
Estándares, reactivos y soluciones	23
Metodología Analítica	24
Parámetros para validación de la metodología analítica	26
Cuantificación de los residuos de antimicrobiano en las muestras.....	28
Estudio de Depleción	28
Bioseguridad	29
RESULTADOS	30
Objetivo específico 1: Implementar y validar metodologías analíticas por LC MS/MS para la detección y cuantificación de SCP en las matrices plumas, músculo e hígado de aves de engorda.	30
<i>Implementación y optimización de las metodologías analíticas</i>	30

<i>Validación de metodologías analíticas</i>	31
Objetivo específico 2: Evaluar la depleción de las concentraciones cuantificadas de SCP en plumas de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial y comparar estas concentraciones con las cuantificadas en los tejidos comestibles (musculo e hígado), en los mismos puntos de muestreo.....	38
<i>Cuantificación de sulfacloropiridazina en músculo de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial</i>	38
<i>Cuantificación de Tilosina en plumas de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial</i>	39
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dieta pollos broilers experimentales.....	22
Tabla 2. Rango aceptable de recuperación según concentración detectada de analito mediante LC MS/MS.....	27
Tabla 3. Cambios realizados para la optimización de la metodología analítica para la extracción de sulfocloropiridazina.....	30
Tabla 4. Carta de fortificación de sulfacloropiridazina para LC MS/MS.....	31
Tabla 5. Tiempos de retención y CV% a partir de seis inyecciones de droga pura de sulfacloropiridazina.....	32
Tabla 6. Promedio, DS y CV% de las concentraciones detectadas de sulfacloropiridazina en las 20 repeticiones fortificadas al LD en las matrices biológicas plumas, hígado y músculo.....	33
Tabla 7. Calculo del LC para el analito sulfacloropiridazina en las matrices biológicas plumas e hígado.....	34

Tabla 8. R ² y CV% de las tres curvas de calibración fortificadas a cinco niveles de concentración (10, 20, 40, 80, 100 µg kg ⁻¹), para las matrices plumas e hígado.	35
Tabla 9. Promedios, DS y CV% de las recuperaciones de sulfacloropiridazina a partir de las matrices biológicas, según las concentraciones de trabajo 10, 40 y 100 µg kg ⁻¹	36
Tabla 10. Repetibilidad, muestra el promedio, DS y CV% de las concentraciones cuantificadas para cada nivel de fortificación de 10, 40, 100 µg kg ⁻¹	37
Tabla 11. Reproducibilidad intralaboratorio, muestra el promedio, DS y CV% de las concentraciones cuantificadas para cada nivel de fortificación de 50, 150, 250 µg kg ⁻¹	37
Tabla 12. Comparación de los CV% de la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio, para las matrices plumas e hígado... ..	38
Tabla 13. Concentración de sulfacloropiridazina en músculo de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial para aves de engorda (sulfacloropiridazina sodica al 10%)	39
Tabla 14. Concentración de sulfocloropiridazina en hígado de pollos broiler tratados con na formulación farmacéuticas comercial para aves de engorda (sulfacloropiridazina sodica al 10%).....	39
Tabla 15. Concentración de sulfacloropiridazina en plumas de pollos broiler tratados con na formulación farmacéuticas comercial para aves de engorda (sulfacloropiridazina sódica al 10%).....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de tratamiento y muestreo de las aves.....	23
Figura 2. 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..	32
Figura 3. 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..	33
Figura 4. Curvas de calibración de 5 niveles de concentración (10, 20, 40, 80, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), en las matrices plumas e hígado..	34
Figura 5. Depleción de sulfacloropiridazina en plumas de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica de sulfocloropiridazina sódica al 10%.....	41

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 sulfacloropiridazina, 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 consto con una totalidad de 71 pollos broiler criados bajo condiciones controladas, a los cuales se les administro un tratamiento con una formulación farmacéutica comercial de sulfacloropiridazina sodica al 10%, vía oral durante 5 días consecutivos. Se implementaron y validaron metodologías analíticas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), para detectar y cuantificar en forma confiable y precisa el analito de interés a partir de las matrices de estudio. Las concentraciones de sulfacloropiridazina 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 se encontraron por debajo del LMR ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) al día 7 post tratamiento. Mediante el estudio de depleción se estableció un tiempo de depleción para sulfacloropiridazina con un 95% de confianza en la matriz plumas, de 61 días. Este estudio concluye que las concentraciones en plumas permanecen en contracciones 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, sulfacloropiridazina, tejidos comestibles, LC MS/MS.

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 sulfacloxyridazine, 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 71 broiler chickens raised under controlled conditions were given treatment with a commercial pharmaceutical formulation of 10% sodium sulfacloxyridazine, orally for 5 consecutive days. Analytical methodologies were implemented and validated by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS), to reliably and accurately detect and quantify the analyte from the studied matrices. The sulfacloxyridazine concentrations were quantified through the linear regression analysis equation of the calibration curves in fortified matrix. Concentrations in muscle and liver were below the LMR ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) at day 7 post-treatment. The depletion study established a depletion time for sulfacloxyridazine with 95% confidence in the feathers matrix of 61 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, sulfacloxyridazine, edible tissues, LC-MS/MS.

INTRODUCCIÓN

La industria avícola se ha caracterizado por ser uno de los rubros del sector pecuario con mayor crecimiento, por sus importantes volúmenes de producción y alta demanda de productos. En el 2014, de los 311,8 millones de toneladas de carne mundial producidas, un 35% correspondió a carne de ave, lo que equivale a 108,7 millones de toneladas. Asimismo, la industria avícola nacional ha evolucionado notablemente en las últimas décadas, alcanzando un beneficio de 22.365.329 aves en enero de 2015, (ODEPA, 2015). En cuanto a exportación nacional, en 2012, Chile alcanzó la cifra histórica de 100.714 toneladas de carne, de las cuales el 79,8% correspondió a carne y subproductos de pollo (ODEPA, 2013). Mientras tanto, en Chile el consumo de carne de aves es de 36,7 kg por habitante según datos del Instituto Nacional de Estadísticas (INE), existiendo más de 32,1 millones de pollos boiler a nivel industrial para satisfacer esta demanda (INE, 2014).

La intensificación de la producción en esta industria a lo largo de los años ha conducido a que la transmisión de enfermedades infecciosas entre los animales sea de importancia para el rubro. Los agentes antimicrobianos se han empleado en aves de corral desde la década de los 50's como tratamiento de enfermedades bacterianas, mejorando la eficiencia de los sistemas productivos y como promotores del crecimiento a concentraciones subterapéuticas en la alimentación, no obstante, en Chile esto se encuentra prohibido desde el 2006 por la modificación de la resolución N°1992 del servicio agrícola y ganadero (SAG) (Ministerio de agricultura, 2006) y en la Unión Europea (UE) por el Reglamento N°1831/2003/UE que entró en vigencia el primero de enero del 2006. Si bien, los antimicrobianos son una eficaz herramienta en el control y tratamiento de diversas patologías de origen bacteriano, tanto para humanos como para animales, su uso puede derivar en la presencia de residuos de antimicrobianos, tanto en productos como subproductos de origen animal, generando un gran riesgo para la salud pública a nivel mundial.

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 de tiempo que debe transcurrir entre la última administración de una droga y la obtención de tejidos comestibles

o productos de un animal tratado, lo que garantiza que el contenido de residuos en los alimentos cumpla con el límite máximo residual (LMR) establecido para los medicamentos veterinarios.

En el caso de los tejidos no comestibles, como las plumas, existen estudios como los de San Martín *et al.*, 2007, Mestorino *et al.*, 2016 y Jansen *et al.*, 2016, quienes analizaron enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino; Berendsen *et al.*, 2013, quienes analizaron oxitetraciclina Cornejo *et al.*, 2010, 2012 y 2016, quienes analizaron flumequina, enrofloxacino y oxitetraciclina, demostrando que estos antimicrobianos pueden permanecer en mayores concentraciones y por periodos de tiempo más prolongados que en los tejidos comestibles.

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, reincorporando de este modo residuos de fármacos a la cadena alimenticia.

Dentro de los antibióticos utilizados en la producción avícola, se encuentran las Sulfonamidas, las cuales, son importantes en medicina veterinaria, pues son efectivos quimioterapéuticos en infecciones bacterianas y protozoarias. Es por esto, que son usados en alimentos y agua para tratar enfermedades en aves de producción, como las infecciones del tracto digestivo y respiratorio (Fang *et al.*, 2006). Actualmente, el Registro de Medicamentos Veterinarios (RMV) SAG tiene autorizadas 3 formulaciones de sulfonamidas para el tratamiento de enfermedades en aves de corral (SAG, 2015). Dentro de estas se encuentran sulfacloropiridazina sódica, sulfacloropiridazina y sulfametazina sódica.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, resulta necesario estudiar las concentraciones de este antimicrobiano en plumas y compararlas con las concentraciones cuantificadas en los tejidos comestibles de pollos tratados. Por este motivo, el presente trabajo consiste en

realizar un estudio de depleción de las concentraciones de sulfacloropiridazina en plumas, músculo e hígado de aves tratadas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En Chile, la industria avícola ha tomado un rol importante tanto para el mercado nacional como internacional. La producción avícola ha registrado un crecimiento promedio anual de 2,1% en los últimos 5 años. El consumo total de carnes para el año 2013 fue de 89,1 kg per cápita, de los cuales 37,5 kg correspondieron a carne de ave, que se traduce en el 42,1% del consumo total de carnes, siendo del total un 95,8% carne de pollo (INE, 2014).

En esta industria los animales son criados principalmente en condiciones de confinamiento, lo cual promueve la propagación de enfermedades infecciosas. De acuerdo a esta situación, los agentes antimicrobianos son importantes en el tratamiento de enfermedades (Landoni y Albarellos, 2015). Sin embargo, la presencia de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos puede representar un riesgo para la salud pública. La toxicidad potencial y efectos adversos dependen de factores como la frecuencia, vía y grado de exposición a ellos. Así, pueden producirse efectos tóxicos directos, inmunológicos (reacciones alérgicas), mutagénesis, carcinogénesis, teratogénesis y efectos a nivel de microflora intestinal, ya que bajas concentraciones de estas drogas generan una continua presión de selección en bacterias resistentes que colonizan tejidos animales y alteran la flora normal (Martínez y Baquero, 2002; Anadón y Martínez-Larrañaga, 2012). Además, ha quedado en evidencia la transferencia de bacterias resistentes, principalmente zoonóticas, como *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp., y genes de resistencia desde animales a humanos, donde pollos y pavos son reservorios animales para ambas bacterias (Anderson *et al.*, 2003; Lapierre, 2012).

Sumado a esto, 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%), a uno o más agentes antimicrobianos, siendo resistentes a ciprofloxacina 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 la ciprofloxacina y ácido nalidíxico. Además, en un estudio realizado por Ta *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%). Asimismo, Angkititrakul *et al.*, (2005) realizaron una investigación en carnes de cerdo y de ave en donde aislaron e identificaron cepas de *Salmonella*, además de obtener aislados de *Salmonella* de pacientes humanos de hospitales locales. A todos los aislados se les realizó pruebas de sensibilidad antimicrobiana contra amoxicilina, cloranfenicol, norfloxacino, ciprofloxacino, gentamicina, sulfametazol, sulfametazol con trimetoprim, tetraciclina y estreptomicina, Resultando que todos los aislados fueron resistentes tanto a sulfametazol como a sulfametazol con trimetoprim, mientras que no se encontró resistencia ni a norfloxacino ni a ciprofloxacino. Todos los demás antimicrobianos analizados resultaron con niveles variables de resistencia entre los aislados en humanos, carne de cerdo y carne de ave.

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

Debido a que el riesgo para los consumidores de productos alimenticios de origen animal proviene de los residuos de los medicamentos, que comprenden tanto el compuesto original como sus productos de degradación, para la Unión Europea la evaluación de la seguridad

de los residuos se realiza de acuerdo con el Reglamento (CEE) N° 2377/90, del Consejo de Europa. Además de la UE, a nivel internacional la FDA y el Codex *alimentarius* también han establecido LMR en los alimentos, de tal forma que se garanticen la protección de la salud de los consumidores.

Sulfonamidas: características farmacocinéticas y situación en Chile

Dentro de los fármacos que se encuentran autorizados por el RMV del SAG para ser utilizados en aves se encuentran las sulfamidas o sulfonamidas. Estas son importantes en medicina veterinaria, pues son efectivos quimioterapéuticos en infecciones bacterianas y protozoarias, es por esto, que son extensamente usados en alimentos y agua, para prevenir y tratar enfermedades en aves de producción, como las infecciones del tracto digestivo y respiratorio (Fang *et al.*, 2006).

Se designan con el nombre general de sulfamida a todos aquellos compuestos, con acción antibacteriana, que contienen la función sulfonamida R-SO₂NH, que derivan del grupo para-amino-benceno-sulfonamida y en el que el radical R está constituido por la anilina (Guzmán, 2001).

El descubrimiento de las sulfamidas dio lugar a la quimioterapia microbiana, puesto que, se trata de sustancias que se interponen en el metabolismo del microbio paralizando todo anabolismo y no de simples bactericidas. Las sulfonamidas interfieren con la biosíntesis de ácido fólico en las células bacterianas; esto mediante la competencia con el ácido para-aminobenzoico (PABA), que incorpora moléculas de ácido fólico. Mediante la sustitución de la molécula de PABA se previene la formación de ácido fólico necesario para la síntesis de ADN, impidiendo la multiplicación de la célula bacteriana. Solamente organismos que sintetizan su propio ácido fólico son susceptibles (USP, 2007).

La mayoría de las sulfonamidas se absorben bien por vía oral con la excepción de las sulfonamidas entéricas, tales como sulfaquinoxaline, las cuales son mínimamente absorbidas. Las que se absorben por vía oral, lo hacen con rapidez, a nivel del estómago e

intestino delgado y en alta proporción (70% a 90%). Los retrasos en la absorción pueden ser producidos en rumiantes adultos o cuando se administran sulfonamidas con los alimentos en animales monogástricos. La distribución es amplia en los diferentes territorios orgánicos, alcanzando concentraciones terapéuticas en plasma, líquido cefalorraquídeo, sinovial y peritoneal. Ello está en relación con la fijación a las proteínas plasmáticas y su liposolubilidad. Se metabolizan principalmente en el hígado, pero el metabolismo también ocurre en otros tejidos. La biotransformación se produce principalmente por acetilación, glucurónido conjugación, y la hidroxilación aromática en muchas especies. Los metabolitos de acetyl no tienen actividad antimicrobiana y los hidroximetabolitos tienen 2,5 a 39,5% de la actividad de los padres compuesto. En una alta proporción se eliminan por la orina (principalmente por filtración glomerular), en parte como droga libre y otra parte metabolizada. La alcalinización de la orina favorece la eliminación. (USP, 2007).

Si bien se ha perdido algo de interés en las sulfonamidas por la aparición de los antibióticos, ya que estos últimos poseen un espectro antimicrobiano más extendido y son de más fácil manejo, las sulfamidas conservan un elevado interés en veterinaria, en especial si se tiene presente que algunas tienen indicaciones precisas y no son reemplazables por antibióticos. Por ello su uso sigue siendo muy amplio y variado (Guzmán, 2001).

Desde que fue sintetizada por primera vez en 1908, se han sintetizado hasta el momento, alrededor de 15.000 derivados análogos, relacionados con la sulfanilamida, en especial relacionados con el ácido p-aminobenzoico, dentro del más intensivo y extenso programa de modificación molecular. Actualmente existen cerca de 30 tipos distintos de sulfonamidas comerciales, algunas con muy buenos efectos antibacterianos (Guzmán, 2001). Sin embargo en Chile solo se encuentran autorizadas tres sulfonamidas, de las cuales, solo sulfaclopiridazina sódica está disponible en solución oral, mientras que, sulfaclopiridazina y sulfametazina sódica están disponibles en polvo para producción aviar (SAG, 2015).

En el presente estudio se trabajó específicamente con sulfaclopiridazina (SCP). Esta sulfonamida derivada del Prontosil, actúa al igual que los demás miembros del grupo,

compitiendo por su incorporación en la molécula del ácido fólico de la pared bacteriana, ya que es análogo estructural de PABA (SAG, 2014). En Chile existen dos formulaciones de sulfacloropiridazina que están autorizadas por el SAG para ser usadas en pollos broiler, una con el número de registro 0113, llamada Coliprim® y la otra con el número de registro 0245, llamada Consumix plus® (SAG, 2015).

Con respecto a la situación actual de las sulfonamidas, en lo que se refiere a los LMR, en Chile está establecido por la resolución No. 1462 de 1999, modificada por la resolución Exenta N° 551 del 2014 para el conjunto de drogas veterinarias en alimentos para consumo humano (músculo, hígado, riñón y grasa de ave) un LMR de 100 µg/kg (Ministerio de Salud, 1999). En la Unión Europea (EU), según la comisión de regulación (EU) N° 37/2010, también se fija un LMR de 100 µg/kg para el conjunto de sulfonamidas y drogas similares en todos los tejidos comestibles (EMA, 2010). Además, el Codex Alimentarius según su normativa CAC/MRL 2-2015, también fija un LMR de 100 µg/kg para el conjunto de sulfonamidas y drogas similares en todos los tejidos comestibles (Codex Alimentarius, 2015).

Técnicas instrumentales utilizadas en la identificación y cuantificación de residuos de sulfacloropiridazina.

Las sulfonamidas se pueden determinar cuantitativamente en todo tipo de matriz, mediante un gran número de métodos, siendo los instrumentales, sin lugar a dudas, los más utilizados y los que mayor interés presentan (Guzman, 2001).

Dentro de los métodos instrumentales, los métodos espectroscópicos de absorción en el ultravioleta – visible, junto con los cromatográficos, han sido los que han permitido analizar la mayoría de las sulfamidas, aunque también se han empleado, con el fin de determinar estas drogas, técnicas de espectrofluorimetría molecular, así como técnicas electroquímicas (Guzman, 2001).

Los métodos cromatográficos han sido los más utilizados para el análisis de sulfamidas, destacando por su importancia, dentro de ellos, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC o LC), aunque también se han encontrado en bibliografía métodos que utilizan la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía en capa fina (CCF) (Guzman, 2001).

Cromatografía es el nombre que se le da a un grupo de técnicas utilizadas en la determinación de la identidad, cuantificación y separación de sustancias en una mezcla, las cuales se basan en el mismo principio: todos los sistemas de cromatografía abarcan una fase estacionaria y una fase móvil. La cromatografía Líquida comprende todas las técnicas cromatográficas que usan una fase móvil líquida, entre las cuales están la cromatografía de papel, la cromatografía en capa fina, la cromatografía en columna y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Talero-Pérez *et al.*, 2014).

La Cromatografía Líquida acoplado a espectrometría de masas (LC-MS) es una técnica robusta, sensible y selectiva, y se ha convertido en una técnica muy difundida para el análisis cuantitativo y cualitativo (Yoshida *et al.*, 2009). También se emplea en la detección de residuos de medicamentos veterinarios en huevos, leche, pescados y carne. Dado que la técnica de GC-MS requiere de pretratamiento de la muestra y derivatización del analito, la LC-MS es una alternativa que requiere menos complejidad para la determinación de sulfonamidas. Sumado a esto, el acoplamiento MS/MS presenta grandes ventajas prácticas respecto a MS simple, debido a que mejora la calidad y la cantidad de la información en términos de selectividad y elucidación estructural (Talero-Pérez *et al.*, 2014).

Estudios de bioacumulación de antimicrobianos en plumas y depleción en tejidos comestibles de aves

Es importante mencionar que, además de los tejidos comestibles, algunos subproductos derivados de la producción de aves pueden ser incorporados en la cadena alimentaria en forma de piensos, como por ejemplo, las plumas, mientras que otros son incorporados directamente, como es el caso de patas, picos y crestas (Cornejo *et al.*, 2010). La harina de plumas se elabora modificando la estructura de la queratina mediante la aplicación de altas

presiones y temperaturas. Las siguientes condiciones se recomiendan para el procesamiento de harina de plumas que presenten una humedad inicial del 72% como máximo: Presión de hidrólisis entre 45 a 50 psi, tiempo de duración de hidrólisis de 60 minutos aproximadamente (Parzanese, 2014).

Esta harina puede ser reintroducida a la cadena productiva de diferentes formas, pero principalmente se usa como aditivos en alimentos de aves, cerdos, rumiantes y peces, pues sirven de fuente de proteínas de bajo costo (Divakala *et al.*, 2009). Cabe destacar que en el año 2008, Estados Unidos produjo 604 mil toneladas de harina de plumas de las cuales se exportaron 74 mil toneladas (Swisher, 2008).

Estudios publicados evidencian que concentraciones de antimicrobianos pueden acumularse en las plumas de aves en niveles mayores y por periodos más prolongados que en los tejidos comestibles, finalizada la terapia y respetados los periodos de resguardo establecidos para la formulación utilizada. San Martin *et al.*, (2007), en sus resultados, encontraron altas concentraciones de enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino en plumas de aves tratadas con este antimicrobiano, en comparación a los tejidos comestibles (músculo, hígado y riñón). En concordancia, Cornejo *et al.*, (2010, 2012 y 2016), encontraron que los antimicrobianos flumequina, enrofloxacino y oxitetraciclinas fueron transferidos a las plumas de aves tratadas, y que las concentraciones de estos antimicrobianos permanecieron por mayor tiempo y en niveles mayores, que aquellos encontrados en los tejidos comestibles. Así mismo, Berendsen *et al.*, 2013 realizaron estudios, en oxitetraciclina y epioxitetraciclina, evidenciando que estos fármacos se bioacumulan en las plumas de pollos tratados, por periodos más prolongados y en mayor concentración que en los tejidos comestibles (músculo e hígado). En adición, estudios recientes señalan el uso de plumas una herramienta prometedora para el análisis de residuos de sustancias prohibidas y registradas, debido a 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 la fecha aproximada de administración y la duración 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).

La generación de plumas y la muda pueden desempeñar un papel importante en la cinética de la disposición de fármacos en plumas de los animales tratados. A medida que las aves crecen de polluelos a adultos, experimentan una serie de mudas, por lo cual, cuatro generaciones de plumas se desarrollan y crecen del mismo folículo. Todos estos folículos se forman durante el desarrollo del embrión; Una vez que el pájaro ha eclosionado, el número de folículos está fijo. Tanto el folículo como las plumas emergentes se derivan de la epidermis de la piel (Leeson y Walsh, 2004).

Por otro lado, la lenta eliminación de antimicrobianos de las plumas podría explicarse por la reabsorción de la pulpa vascularizada que llena el eje de la pluma a lo largo del proceso de maduración. Este proceso se interrumpe y termina en una cápsula de pulpa, en la que se puede retener el fármaco (Leeson y Walsh, 2004).

Para comprobar esto, Love *et al.*, (2012) realizaron un estudio en donde se muestrearon harinas de plumas de diferentes estados: Arkansas, Carolina del Norte, Oregon, California, Idaho, Tennessee y China (n=12). Estos investigadores detectaron presencia de antimicrobianos en todas las muestras analizadas, encontrando de 2 a 10 antimicrobianos en cada muestra. Se analizaron 6 familias de antimicrobianos, con un total de 26 antimicrobianos distintos, encontrándose presencia de 17 de éstos.

A la fecha no existen estudios que muestren la depleción de residuos en plumas y su relación con las concentraciones presentes en tejidos comestibles de aves tratadas. Los antecedentes presentados demuestran la necesidad de estudiar el comportamiento de estos fármacos en esta matriz.

Considerando los antecedentes entregados, es que en esta tesis se estudió la depleción de residuos de sulfacloropiridazina en plumas y en tejidos comestibles como músculo e hígado de aves tratadas, con el fin de evaluar si residuos de este fármaco permanecen en plumas

por tiempos más prolongados y en mayores concentraciones que en tejidos comestibles. Esto, permitirá estudiar la transferencia y periodos de resguardo de este fármaco en las matrices mencionadas, para evaluar el rol de este subproducto en el reingreso del fármaco en la cadena alimenticia.

HIPÓTESIS

Residuos de sulfacloropiridazina permanecen en plumas de pollos broiler tratados con este antimicrobiano, en concentraciones mayores y por tiempos más prolongados que en los tejidos comestibles en estas aves como musculo e hígado.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las concentraciones de sulfacloropiridazina, durante la fase de depleción, en subproductos (plumas) y en tejidos comestibles (músculo e hígado) de pollos broiler tratados con dicho antimicrobiano de forma terapéutica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar y validar metodologías analíticas por LC MS/MS para la detección y cuantificación de SCP en las matrices plumas, músculo e hígado de aves de engorda.
2. Evaluar la depleción de las concentraciones cuantificadas de SCP en plumas de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial y comparar estas concentraciones con las cuantificadas en los tejidos comestibles (musculo e hígado), en los mismos puntos de muestreo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto de memoria de título se encuentra inserto en el marco del proyecto FONDECYT de Iniciación en Investigación 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”.

Formulación farmacéutica

Se utilizó una formulación comercial de sulfacloropiridazina al 10% en polvo para administración oral, que se encuentra presente en el Registro de Medicamentos de Uso Veterinario del SAG para su administración en aves de corral (N° de registro: 0245), la cual se encuentra disponible en el mercado como Coliprim.

Animales experimentales

Para el tratamiento con sulfacloropiridazina al 10% se utilizaron 71 pollos broiler, de genética Ross 308. Este tamaño muestral se eligió considerando el criterio establecido por la Agencia Europea de Medicamentos, Guía: Aproximación hacia la armonización de los períodos de resguardo EMEA/CVMP/036/95 (1996). La elección de esta raza se basó en que es una raza precoz, de buena conversión alimenticia, y de alta rusticidad y adaptabilidad, aunque tienen 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 primer día 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 cual, fue analizado previamente para evaluar la presencia de residuos de antimicrobianos. El alimento se formuló de acuerdo a los requerimientos de la raza, administrándoles dieta a base de maíz y soya principalmente (fig. 1). 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 estuvo basado en la Ley N°20.380 “Sobre Protección de Animales” (Ministerio de Salud, 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 la aves, se respetó el Reglamento (CE) N° 1099/2009 relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza (CE, 2009).

STARTER (0 – 21 d)	1000 kg	330 kg
Maíz Chile (7,2% PC)	512	168,96
Afrecho de Soya 47% PC	398	131,34
Aceite vegetal (82 mcal)	47	15,51
L-Lisina HCL	2,3	0,76
L-Treonina	0,8	0,26
Metionina DHA	4,7	1,55
Sal común	4,2	1,39
Carbonato de calcio	11,1	3,66
Fosbic (bical 18,5%)	20	6,77
Núcleo inicial sup	2	0,66

STARTER (21 - 42 d)	1000 kg	330 kg
Maíz Chile (7,2% PC)	515	257,50
Afrecho de Soya 47% PC	382	191,00
Aceite vegetal (82 mcal)	67	33,50
L-Lisina HCL	0,40	0,20
L-Treonina	0,47	0,24
Metionina DHA	3,40	1,70
Sal común	3,7	1,85
Carbonato de calcio	8,9	4,45
Fosbic (bical 18,5%)	17,9	8,95
Núcleo inicial sup	2	1,0

Tabla 1. Dieta pollos broilers experimentales.

Grupos experimentales y muestreos

Las aves se dividieron aleatoriamente en 2 grupos experimentales. El grupo A de 55 pollos fue tratado desde el día 7 de vida con una formulación comercial de sulfacloropiridazina al 10%, la cual tiene un PR de 30 días. El grupo B de 16 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 30 mg/kg vía oral una vez al día, durante cinco días consecutivos, hasta el día 11 de vida de las aves. A partir del día 7 al 38 post tratamiento (días 18 a 49 de vida de las aves), 5 aves en el grupo A y 2 aves del grupo B fueron sacrificadas en días definidos de acuerdo a la duración del PR de 30 días. Los días establecidos para la toma de muestras post tratamiento fueron los siguientes: 7, 14, 21, 30, 32, 34, 36 y 38 (8 puntos de muestreo) (fig. 2). Se recolectaron muestras de músculo (pechuga y pierna), hígado y la totalidad de las plumas de las aves. Las muestras fueron procesadas y almacenadas a -20°C de forma individual hasta su extracción y posterior análisis cromatográfico.

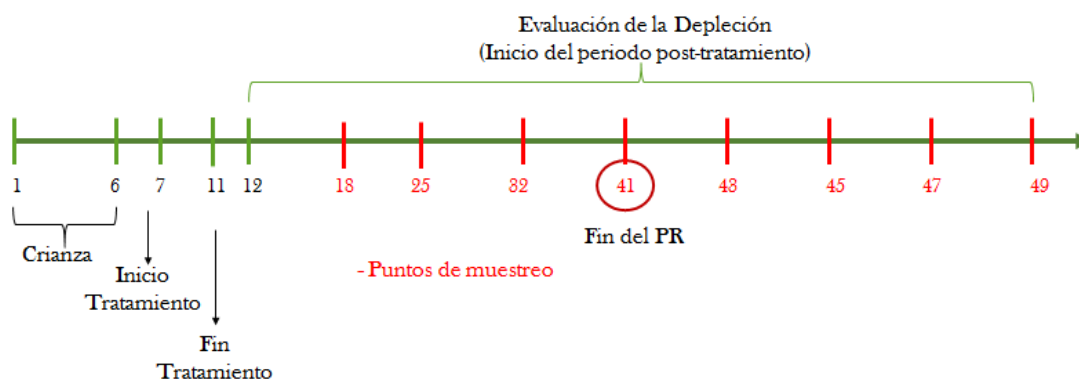


Figura. 1. Esquema de tratamiento y muestreo de las aves.

Estándares, reactivos y soluciones.

Para el análisis y cuantificación, se utilizó sulfacchlorpyridazine (SCP) Sigma Aldrich de pureza certificada, como solución madre (solución stock) e intermedia como solución para fortificar y sulfamethazine- phenyl-13C6 hemihydrate Sigma Aldrich (SMZ) como estándar interno.

Los reactivos y solventes utilizados fueron: agua grado HPLC (Millipore o similar), acetato de etilo grado P.A. (J.T. BAKER o similar), Metanol grado HPLC ((J.T. BAKER o similar), ácido clorhídrico, hidróxido de Sodio grado P.A. (Merck o similar), agua HPLC (Merck o similar), ácido fórmico 98/100% (Merck o similar).

Las soluciones a utilizar fueron: Fase A: Ac. Fórmico al 0,1% en metanol $\text{pH} = 2,9 \pm 0,3$. En una botella agregar 250 ml de agua HPLC y 250 μl de ácido fórmico, agitar y filtrar.

Fase B: Ac. Fórmico al 0,1% en agua $\text{pH} = 2,7 \pm 0,2$. En una botella de 250 ml, agregar 250 ml de agua HPLC, agregar 250 μl de ácido fórmico, agitar y filtrar.

Metodología Analítica

La determinación de sulfacloropiridazina en plumas, hígado y músculo de pollos broiler se llevó a cabo en el laboratorio FARMAVET de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), acreditado bajo la norma ISO 17025 Of 2005. Para el correcto manejo de las muestras se realizó un periodo de capacitación en el laboratorio, previo al desarrollo de la validación del método, de este modo se adquirieron las competencias necesarias para realizar la extracción del analito en cuestión desde la matriz.

Para la detección de sulfonamidas en las matrices de plumas y músculo, se implementaron metodologías analíticas para la detección de sulfonamidas en pollos broliers por LC MS-MS.

La metodología analítica para la extracción de sulfacloropiridazina desde plumas de pollos broiler previamente tratados, fue la siguiente: se pesaron 2 g de muestra en tubos falcón. Estos fueron fortificados con el estándar interno y se dejaron reposar 15 minutos. Luego se agregaron 40 ml de acetato de etilo, se agito por 15 en un vortex y posterior a esto, las muestras fueron puestas por 5 minutos en un baño ultrasónico. A continuación, se centrifugaron a 1.000 g por 10 minutos, una vez centrifugado, se hizo pasar por una jeringa de 50 ml con lana de vidrio a un tubo falcón de 50 ml. Las muestras se concentraron hasta alcanzar 15 ml en un baño termoregulado entre 40° C y 50° C con flujo de nitrógeno. Al

mismo tiempo se acondicionaron columnas de fase sólida SCX (6 ml y 500 mg) con 6 ml de hexano y 6 ml de acetato de etilo.

Una vez, que las muestras estuvieron concentradas y las columnas acondicionadas se hicieron pasar las muestras por las columnas. Posteriormente las columnas se lavaron con 2 ml de agua y 2 ml de metanol. A continuación, las columnas se eluyeron con 10 ml de una solución de metanol (48,5 ml) y amoniaco (1,5 ml), esta elución se llevó a secar a un baño termoregulado entre 40° C y 50°C con flujo de nitrógeno. Luego de secar, las muestras se reconstituyeron con 300 µl de solución con fase A y fase B, en proporción 15/85, para luego agitar en vortex y sonicar por 5 minutos. Posterior a esto, las muestras se pasan a tubos Eppendorf y se centrifuga a 17.369 g por 10 minutos. Por último, las muestras se filtran con filtros Millex y se guardan en viales de vidrio de inyección para LC MS/MS (Hindle, 2003; Shao *et al.*, 2005; Thompson & Noot, 2009).

La metodología analítica para la extracción de sulfacloropiridazina desde músculo de pollos boiler previamente tratados, fue la siguiente: se pesó 5 gr. de muestra en tubos falcón. Estos fueron fortificados con el estándar interno y se dejarán reposar 15 minutos. Posteriormente se agregó 15 ml de agua y se agito 10 minutos en un vortex. A continuación, se agregó 15 µl de NaOH 1 M, se agito 15 minutos en un vortex, se colocó 5 minutos en un baño ultrasónico y se ajustó el pH a 7,5-8,0 con HCl 10% v/v. Luego, se agregaron 10 ml de acetato de etilo, se agito por 10 minutos y se centrifugo por 2 minutos a 2.790 g, luego de esto, se agitaron suavemente para disolver el gel. A continuación, se centrifugaron a 2.790 g por 10 minutos, una vez centrifugado, se guardó la fase superior en un tubo falcón de 50 ml. Posteriormente, se agregó nuevamente 10 ml de acetato de etilo a la muestra, se agito por 10 minutos y se centrifugo 2 minutos a 2.790 g. A continuación, se agito suavemente con la mano hasta disolver el gel, se centrifugo por 10 min a 2.790 g y se guardó nuevamente la fase superior en el tubo falcón de 50 ml. Las muestras se secaron con un flujo de nitrógeno suave, en un baño termoregulado entre 40° C y 50° C.

Luego de secar, las muestras se reconstituyeron con 500 µl de solución con fase A y fase B, en proporción 15/85, posteriormente se agitaron en un vortex y fueron puestas en un

baño ultrasónico por 5 minutos. Posterior a esto, las muestras se pasaron a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 17.369 g. Por último, las muestras se filtraron con filtros Millex y se guardaron en viales de vidrio de inyección para LC MS-MS (Hindle, 2003; Shao *et al.*, 2005; Thompson & Noot, 2009).

Parámetros para validación de la metodología analítica

Para la validación de la metodología analítica se siguieron las recomendaciones de La UE: decisión de la comisión 2002/657/CE (EC, 2002) y la FDA: *VICH GL49 validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011). A partir de estos documentos se creó un protocolo de validación, el cual incluye la evaluación de diferentes parámetros con el fin de que la metodología fuera apta para su uso previsto y sus resultados fueran confiables y precisos. Los parámetros a evaluar para la validación correspondieron a:

- I. Tiempo de retención del analito:** se analizaron 6 repeticiones de droga pura. Dentro de un mismo set de muestras se aceptó un (coeficiente de variación) CV de un 5% de variación.
- II. Especificidad:** se analizaron 20 muestras blanco de cada matriz, para visualizar si existía interferencia en la región de interés en la cual se espera elusión de la sulfaclopiridazina.
- III. Límite de detección (LD):** para determinar el LD se fortificaron muestras a distintas concentraciones y se seleccionó la concentración a la cual la relación señal ruido es a lo menos de 3:1. Esta concentración seleccionada se repitió 20 veces.
- IV. Límite de cuantificación (LC):** al LD se le sumo 1,64 veces la desviación standard de los resultados obtenidos en las 20 muestras fortificadas analizadas previamente. Se acepta si cumple con que la relación señal ruido sea como mínimo 10:1.
- V. Linealidad de la curva de calibración:** se utilizaron 5 concentraciones, siendo la concentración más baja de la curva igual al LD, se realizaron 3 curvas de calibración y un análisis de sus pendientes. Se aceptaron los rangos de concentración con el coeficiente de correlación de $R^2 \geq 0,95$ y el $CV \leq 25\%$.

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

$$R (\%) = \frac{\text{Contenido medido}}{\text{Nivel de fortificado}} \times 100$$

Los niveles de recuperación se aceptaron dentro de un rango de 80%-110%, para las concentraciones de trabajo, en la Tabla 2 se muestran los rangos de recuperación (%) según la concentración del analito.

Tabla 2. Rango aceptable de recuperación según concentración detectada de analito mediante LC MS/MS.

Concentración del Analito	Rango aceptable de Recuperación
<1 µg/kg	-50% a +20%
≥1 µg/kg < 10 µg/kg	-40 a +20%
≥10 µg/kg <100 µg/kg	-30% a +10%
≥100 µg/kg	-20% a +10%

Fuente: Decisión de la comisión 2002/657/CE (EC, 2002).

VII. Precisión: se obtuvo mediante la repetitividad y la reproducibilidad intralaboratorio.

- i. **Repetitividad:** se eligieron 18 muestras blancos de diferentes fuentes y se fortificaron a nivel de 3 puntos de la curva de calibración (6 muestras fortificadas a cada nivel).
- ii. **Reproducibilidad intralaboratorio:** se realizaron 6 curvas fortificadas de diferentes fuentes, a los mismo 3 niveles que en el caso de la repetitividad, pero realizadas en días diferentes y por diferentes analistas.

Máximo CV% según fracción de masa del analito detectado mediante LC MS/MS.

Fracción de masa	CV de Reproducibilidad
1µg/kg	35%
10 µg/kg	35%
100 µg/kg	23%
1000 µg/kg	16%

Fuente: Decisión de la comisión 2002/657/CE (EC, 2002).

Análisis Instrumental

Para el análisis instrumental se utilizó un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas modelo API 4000, marca AB SCIEX. Este instrumento ha sido empleado para fines similares por San Martín *et al.*, (2007) y Conejo *et al.*, (2010, 2012).

Cuantificación de los residuos de antimicrobiano en las muestras

Las concentraciones de sulfacloropiridazina fueron evaluadas en plumas, hígado y músculo de aves tratadas. Los residuos se cuantificaron usando la ecuación del análisis de regresión lineal $y = a + bx$ (donde y es el área, a es el intercepto en y , b es la pendiente y x es la concentración) de las curvas de calibración de matrices fortificadas. Las muestras tomadas del grupo B se utilizaron como muestras blanco para controles positivos y fortificados, requeridos en cada lote de análisis, para la construcción de dichas curvas de calibración. Las muestras blanco fueron fortificadas a concentraciones diferentes y equidistantes, con un coeficiente de determinación $R^2 \geq 0,95$. El análisis de los datos se realizó según las indicaciones de la Note for guidance: Approach towards harmonization of withdrawal periods, EMEA/CVMP/036/95 (EMA, 1996).

Estudio de Depleción

Para realizar el análisis de los datos y establecer el periodo (días) que demora la depleción del analito de sulfacloropiridazina en las matrices de estudio, se siguieron las indicaciones de la European Medicines Agency (1996). Se cuantificaron las concentraciones de SCP 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 llevarán a una gráfica en escala semilogarítmica de concentración v/s tiempo. Se realizó un análisis de regresión lineal en la fase final de eliminación considerado un nivel de confianza del 95%. A partir de esta grafica se definió el momento (días) en el cual las concentraciones son iguales o menores LD establecido para la técnica en el caso de pluma e iguales o menores al LMR establecidos para los tejidos comestibles en el caso del musculo e hígado. El período de resguardo se determinó cuando la pendiente al 95% de confianza interseco al LMR establecido para musculo e hígado. En el caso de las plumas se utilizó el LD establecido para metodología.

Bioseguridad

La extracción de las muestras y su respectivo análisis cromatográfico, se realizaron 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 LC MS/MS para la detección y cuantificación de SCP en las matrices plumas, músculo e hígado de aves de engorda.

Implementación de las metodologías analíticas

Para la detección y cuantificación del analito sulfacloropiridazina a partir de las matrices biológicas (plumas, músculo e hígado), se utilizaron como referencia tres metodologías analíticas descritas en la literatura:

1. *Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Shao et al., 2005).*
2. *A Validated atmospheric pressure chemical ionization method for analyzing Sulfonamides in pork muscle (Hindle, 2003).*
3. *Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Thompson & Noot, 2009).*

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

Dentro de los cambios realizados para la optimización de los de las metodologías de extracción (Tabla 1), se redujo el gramaje de la muestra de 5 a 2 gramos en las matrices de plumas y se aumentó el volumen de los solventes en la extracción para lograr una mayor recuperación del analito.

Tabla 3. Cambios realizados para la optimización de la metodología analítica para la extracción de sulfocloropiridazina.

Parámetros	Matriz	Resultado
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

Para determinar si la metodología implementada cumplía con los objetivos para la extracción de sulfacloropiridazina, se detectó cromatográficamente el analito de interés y se determinó la linealidad a partir de curvas de calibración a concentraciones de 10, 20, 40, 80, 100 ppb (Tabla 2), en las cuales el R^2 fue mayor a 0,95

Tabla 4. Carta de fortificación de sulfacloropiridazina para LC MS/MS.

Fortificación Curva de Calibración				
Analitos	S.S(ng/ml)	Pesaje matriz (g)	Alicuota (µl)	Conc. Final (ng/g)
SCP	1000	2	40	10
			80	20
			160	40
			320	80
			400	100

Validación de metodologías analíticas

Para la validación de los tres métodos analíticos se trabajó con un protocolo interno, el cual se basó en las guías de validación de La Unión Europea: decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE (EC, 2002) y la FDA: VICH GL49 *validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011). Cabe destacar que la metodología para la extracción del analito a partir del matriz músculo ya se encontraba previamente implementada y validada en el laboratorio de FARMAVET, los resultados se muestran en el anexo 5. 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: sulfacloropiridazina. Los promedios de los tiempos de retención y los respectivos CV% se muestran en la Tabla 3.

Tabla 5. Tiempos de retención y CV% a partir de seis inyecciones de droga pura de sulfacloropiridazina.

Analito	Matriz biológica	Promedio TR	CV%
SCP	Plumas	1,925 min	2,58
	Hígado	2,502 min	1,68

2. Especificidad

Para comprobar la especificidad del método analítico se determinó si existían interferencias en el tiempo de retención de sulfacloropiridazina 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, realizados en muestras de pluma e hígado libre de residuos de sulfacloropiridazina. 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.

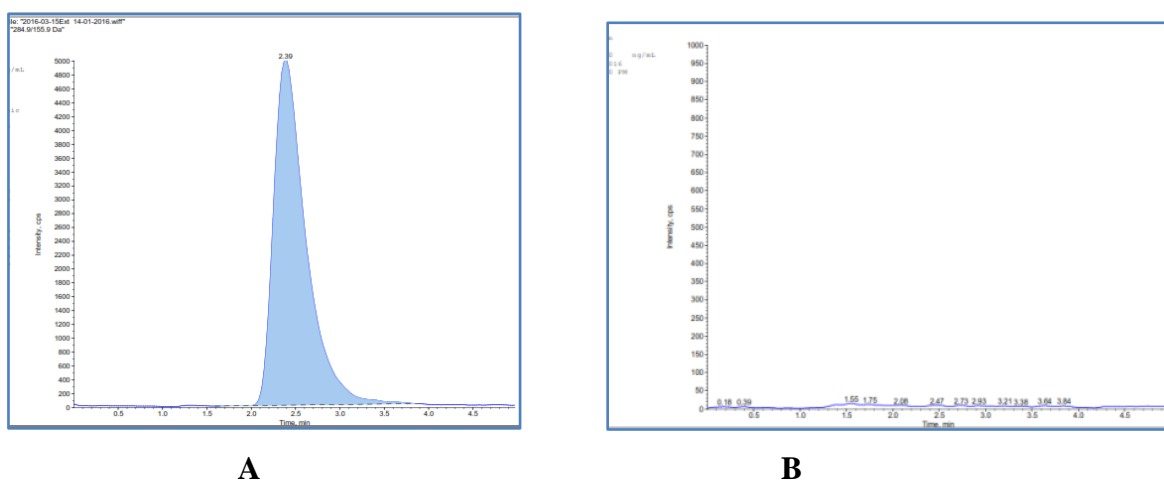


Figura 2. Cromatogramas a partir de muestras de plumas (A) inyección de droga pura representativa de los 6 análisis (B) muestra blanco representativa de los 20 análisis.

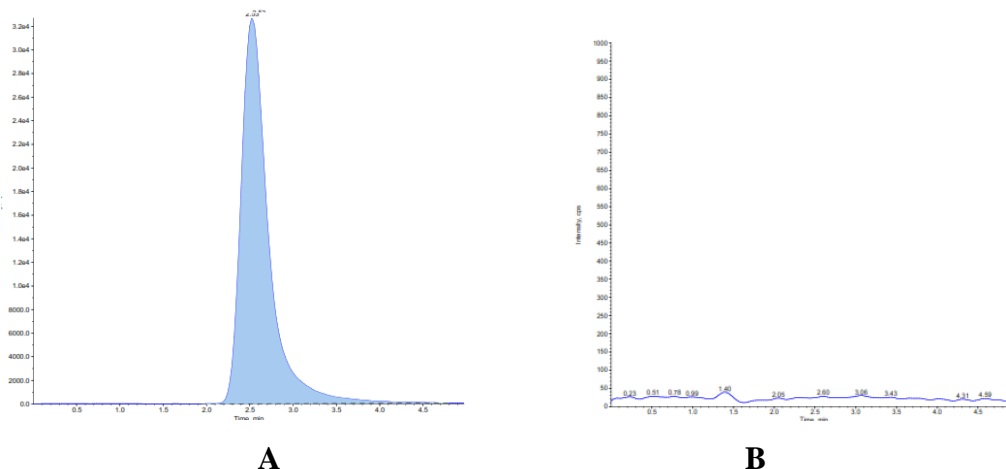


Figura 3. Cromatogramas a partir de muestras de hígado (A) inyección de droga pura representativa de los 6 análisis (B) muestra blanco representativo de los 20 análisis.

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 $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ 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 6. Promedio, DS y CV% de las concentraciones detectadas de sulfacloropiridazina en las 20 repeticiones fortificadas al LD en las matrices biológicas plumas, hígado y músculo.

Analito	Matriz biológica	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Promedio de las 20 repeticiones ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Desviación Estándar (DS)	CV%
SCP	Plumas	10	12,154	1,246	10,25
	Hígado	10	15,725	1,625	10.33

Límite de cuantificación (LC)

Para la definición del LC, a la concentración definida para el LD se le sumo 1,64 veces la desviación estándar de las concentraciones cuantificadas a partir de las 20 repeticiones de los análisis en matriz fortificada al LD. El parámetro se aceptó debido a que la relación señal ruido fue mayor a 10:1. Se definió un LC de 14,6; 12,7 y 10 para sulfacloropiridazina en pluma, músculo e hígado, respectivamente (Tabla 5). Estas concentraciones corresponden a la mínima concentración que puede ser cuantificada de forma precisa por el método analítico para las diferentes matrices.

Tabla 7. Calculo del LC para el analito sulfacloropiridazina en las matrices biológicas plumas e hígado.

Analito	Matriz	Calculo LC (LD+1,64 DS de las 20 repeticiones)	LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
SCP	Plumas	$10 + 1,64 * 2,79$	14,6
	Hígado	$10 + 1,64 * 1,625$	12,7

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: 10, 20, 40, 80 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 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^2) 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 4. Curvas de calibración de 5 niveles de concentración (10, 20, 40, 80, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), en las matrices de hígado, pluma y músculo.

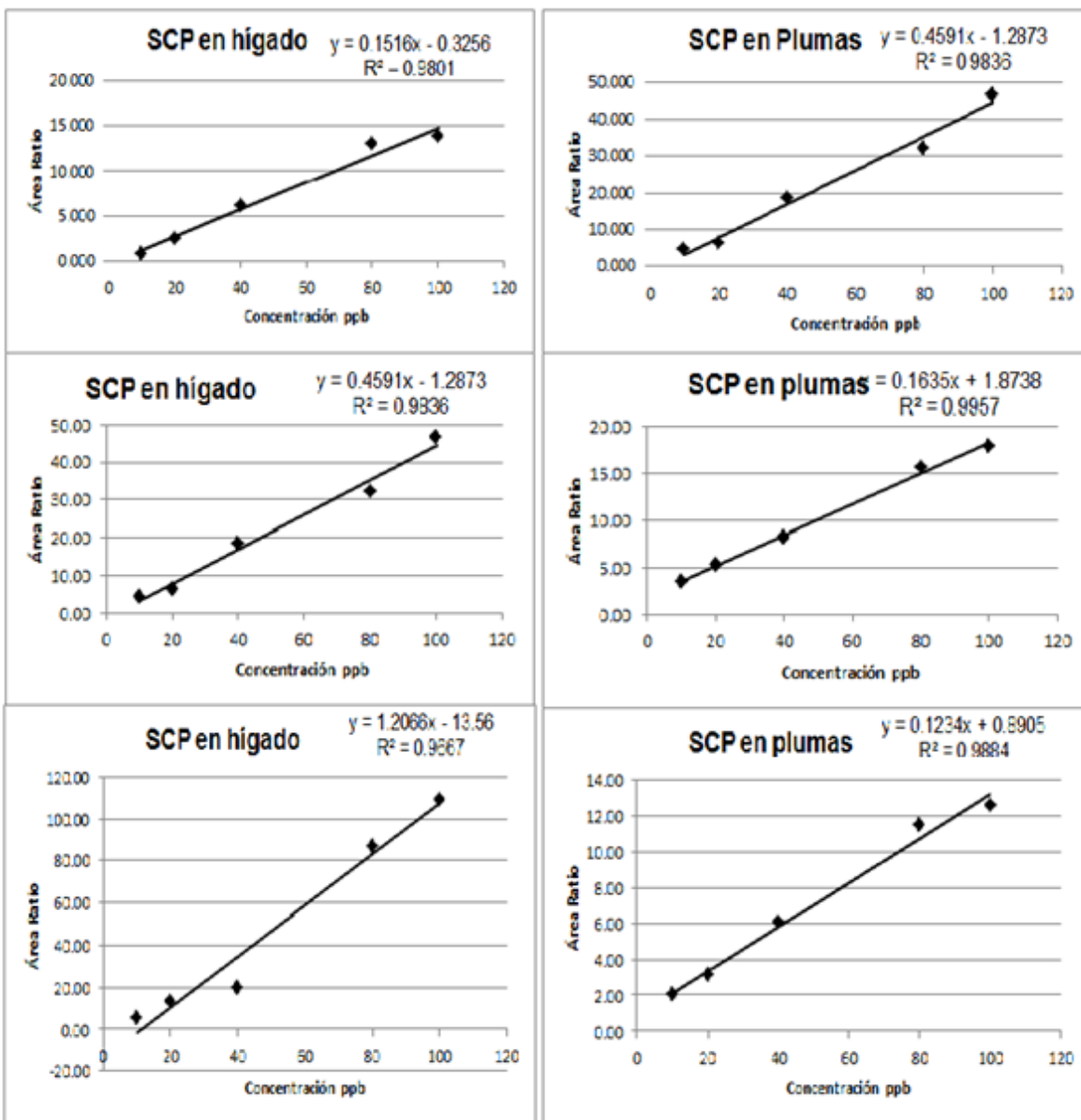


Tabla 8. R^2 y CV% de las tres curvas de calibración fortificadas a cinco niveles de concentración (10, 20, 40, 80, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), para las matrices plumas e hígado.

R ² de las curvas de calibración						
Analito	Matriz	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	CV%
SCP	Plumas	0,9723	0,9957	0,9884	0,9854	0,014
	Hígado	0,9803	0,9836	0,9667	0,9768	0,00745

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 10, 40 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. El analito sulfacloropiridazina presento una recuperación para el LD de un 107,90% y 101,12% con un CV de un 25% 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 (10, 40 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), 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 9. Promedios, DS y CV% de las recuperaciones de sulfacloropiridazina a partir de las matrices biológicas, según las concentraciones de trabajo 10, 40 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Analito	Matriz	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperación (%) (promedio)	Desviación estándar (DS)	CV (%)
SCP	Plumas	10	107,90%	0,26	25%
		40	97,04%	0,10	11%
		100	100,39%	0,01	1%
	Hígado	10	101,12%	0,25	25%
		40	99,58%	0,10	10%
		100	100,05%	0,01	1%

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: 10, 40 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. 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 10. Repetibilidad, muestra el promedio, DS y CV% de las concentraciones cuantificadas para cada nivel de fortificación de 10, 40, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Precisión: Repetibilidad					
Analito	Matriz	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentración cuantificada (%) (promedio)	Desviación estándar (DS)	CV (%)
SCP	Plumas	10	6.7	1,57	23,33
		40	44.9	2,36	5,25
		100	98.2	0,70	0,72
	Hígado	10	13,6	2,83	20,78%
		40	34,56	4,24	12,29%
		100	101,81	1,41	1,39%

Tabla 11. 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: Reproducibilidad					
Analito	Matriz	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentración cuantificada (%) (promedio)	Desviación estándar (DS)	CV (%)
SCP	Plumas	10	10,08	2,84	26,20
		40	38,8	4,14	10,65
		100	100,4	1,39	1,38
	Hígado	10	13,3	3,30	24,86
		40	35,2	4,84	13,73
		100	101.6	1.63	1,61

Tabla 12. Comparación de los CV% de la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio, para las matrices plumas e hígado.

Matriz	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CV %	
		Repetibilidad	Reproducibilidad
Plumas	10	23,33	26,20
	40	5,25	10,65
	100	0,72	1,38
Hígado	10	20,7	24,86
	40	12,29	13,73
	100	1,39	1,61

Objetivo específico 2: Evaluar la depleción de las concentraciones cuantificadas de SCP en plumas de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial y comparar estas concentraciones con las cuantificadas en los tejidos comestibles (músculo e hígado), en los mismos puntos de muestreo.

Las concentraciones de sulfaclopiridacina 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 sulfaclopiridazina en músculo de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial.

En la cuantificación del analito en la matriz músculo, las concentraciones determinadas al día 7 post-tratamiento cuantificaron bajo el Límite Máximo Residual (LMR) para la matriz músculo, establecido en Chile y por la Unión Europea. En la Tabla 8 se muestran las concentraciones promedio determinadas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de sulfaclopiridazina, para los diferentes días post-tratamiento en esta matriz.

Tabla 13. Concentración de sulfacloropiridazina en músculo de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial para aves de engorda (sulfacloropiridazina sodica al 10%)

Punto de muestreo (Días)	Días Post-Tratamiento	Edad de los pollos (Días)	PROMEDIO ng/g
1	7	18	17,67
2	14	25	5,81
3	21	32	6,81
4	30	41	N.D*
5	32	43	N.D*

*N.D: no detectado

Cuantificación de sulfacloropiridazina en hígado de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial.

Los resultados para la matriz hígado, muestran que las concentraciones determinadas a partir del día 7 post-tratamiento cuantificaron bajo el LD de la metodología analítica. En la Tabla 9 se muestran las concentraciones promedio determinadas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de sulfacloropiridazina, para los diferentes días post-tratamiento en esta matriz.

Tabla 14. Concentración de sulfocloropiridazina en hígado de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial para aves de engorda (sulfacloropiridazina sodica al 10%)

Punto de muestreo (Días)	Días Post-Tratamiento	Edad de los pollos (Días)	PROMEDIO ng/g
1	7	18	3,41
2	14	25	16,20
3	21	32	N.D*
4	30	41	N.D*

*N.D: no detectado

Cuantificación de sulfacloropiridazina en pluma de pollo broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial.

Los resultados del estudio muestran que en las plumas al día 7 post-tratamiento, se detectaron altas concentraciones de sulfacloropiridazina, en donde el promedio de las concentraciones detectadas fue de 28587,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Al día 14 post-tratamiento, las concentraciones de los analitos en esta matriz, disminuyeron aproximadamente en un 98,5%, llegando a una concentración promedio de 438,89 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Sin embargo, y a pesar de esta declinación en las concentraciones detectadas, al día 30 post-tratamiento, correspondiente al periodo de resguardo establecido en músculo, para la formulación farmacéutica utilizada (sulfacloropiridazina sódica al 10%), las concentraciones detectadas y cuantificadas en plumas, sobrepasaban al LMR establecido por Chile y la Unión Europea para músculo (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), estas se cuantificaron en un nivel promedio de 188,42 $\mu\text{g kg}^{-1}$. En la Tabla 10 se muestran las concentraciones promedio de sulfacloropiridazina, según los días post-tratamiento.

Tabla 15. Concentración de sulfacloropiridazina en plumas de pollos broiler tratados con na formulación farmacéuticas comercial para aves de engorda (sulfacloropiridazina sódica al 10%).

Punto de muestreo (Días)	Días Post-Tratamiento	Edad de los pollos (Días)	PROMEDIO ng/g
1	7	18	28587,8
2	14	25	438,89
4	30	41	188,42
5	32	43	31,69
6	34	45	13,62
7	36	47	10,63
8	38	49	N.D

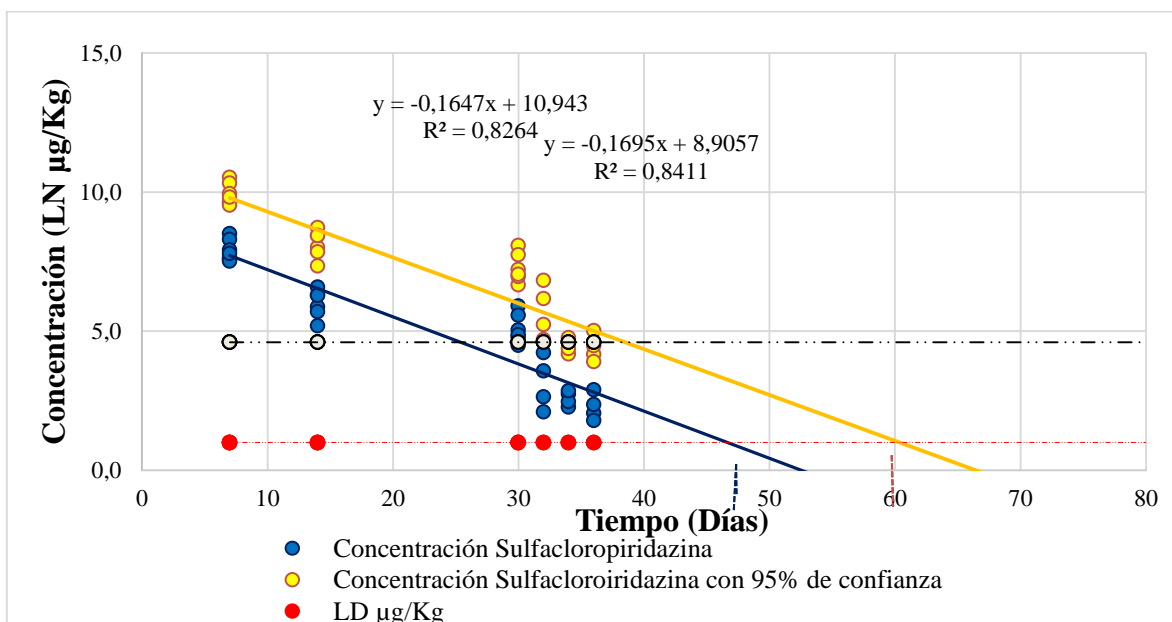
*N.D: no detectado

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 la *Note for guidance: approach towards harmonization of withdrawal periods* (EMA, 2016), recomienda como mínimo 4 puntos de muestreos con concentraciones por sobre el límite de detección ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) para poder determinar un periodo de resguardo de manera precisa.

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 4) 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 60,362 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 considera que a los 61 días con un 95% de confianza las concentraciones de sulfacloropiridazina sean iguales o menores al LD ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) determinado.

Figura 5. Depleción de sulfacloropiridazina en plumas de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica de sulfocloropiridazina sódica al 10%.



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, Jansen *et al.*, 2016). 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 se detectaron sulfonamidas en un 83% de las harinas muestreadas. Conjuntamente, demostraron que pueden permanecer residuos de antimicrobianos incluso después de someter las plumas a una temperatura de 121°C, 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 LC MS/MS 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 sulfacloropiridazina en plumas, músculo e hígado en forma confiable y precisa.

Previamente a la validación se realizó la implementación de las metodologías, paso fundamental, en donde se establecieron las cartas de trabajo que contienen los pasos para la extracción química de los analitos a partir de las matrices biológicas. Fueron establecidas dos cartas de trabajo a partir de trabajo previamente publicado por Shao *et al.*, (2005), Hindle (2003) y Thompson & Noot (2009). Estas cartas diferían en algunos aspectos,

debido a que las matrices son muy diferentes en cuanto a estructura y presencia de interferentes como grasa y proteínas. En conjunto a esto, se establecieron las condiciones analíticas para las tres matrices.

Dentro de las diferentes modificaciones realizadas para la optimización de la metodología analítica implementada para la extracción de sulfacloropiridazina, se observó que al reducir el gramaje de las muestras de 5 gramos (método original para músculo) a 2 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.

Durante la validación y a partir de las pruebas realizadas en matriz fortificada se definió un límite de detección de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para las matrices hígado y plumas, y de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para músculo, 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 sulfacloropiridazina que puede ser detectada por el método analítico en plumas, músculo e hígado de pollo. Por otra parte, 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 sulfacloropiridazina en plumas, músculo e hígado a concentraciones iguales o mayores a 10 , $12,7$ y $14,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ 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 (N.D).

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 10, 20, 40, 80 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, presentando 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 espectrómetro de masas expresada como área ratio (relación del área cuantificada del analito de interés y del estándar interno), es proporcional a la concentración de analito presente en la muestra y por lo tanto, se puede concluir que los métodos son cuantitativos.

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. Observándose una recuperación entre el 82,72% y 107,90. 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 10, 40 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ realizadas en días diferentes, por analistas diferentes y con distintos lotes de reactivos y

solventes. Por otra parte, 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, 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 cuanto a los estudios de depleción, en la actualidad existen diferentes estudios con sulfcloropiridazina en diferentes productos de la industria avícola, como los estudios realizados por Lebkowska & Kowalski (2013), Vandenberg *et al.* (2012) y Li & Bu (2015) quienes determinaron este analito en musculo, hígado, piel y grasa de pollos de engorda posterior a su administración en pienso, concluyendo que este fármaco alcanzaba altas concentraciones hasta el 4 día post tratamiento aproximadamente, para luego depletarse rápidamente hasta no ser detectado. En adición, Lebkowska & Kowalski (2010) detecto este mismos analito en músculo e hígado de pavos, observando una rápida disminución de las concentraciones del fármaco a partir del séptimo día post tratamiento. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, en el cual las concentraciones se encontraron por debajo LMR establecido para musculo e hígado ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) a partir del día 7 post tratamiento. 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.

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), Cornejo *et al.*, (2012), Jansen *et al.*, (2016) y Mestorino *et al.*, (2016), en enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino en tejidos comestibles y plumas de gallinas ponedoras y aves de engorda, respectivamente. Por otra parte, Cornejo *et al.*, (2010), encontraron altas concentraciones del antimicrobiano flumequina presente en la matriz plumas, comparado con las muestras de hígado y músculo, una vez finalizado el periodo de resguardo calculado para la formulación. Además, la eliminación de este antimicrobiano desde las plumas fue más lenta que en los otros tejidos. En concordancia, los resultados de Cornejo *et al.*, (2012) demuestran que enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino fueron transferidos a las plumas de aves tratadas, y las concentraciones de estos antibióticos permanecieron por mayor tiempo y en niveles mayores, que aquellos encontrados en los tejidos comestibles. Sumado a esto, los estudios realizados por Berendsen *et al.* (2013)) describieron la bioacumulación de residuos farmacológicos de oxitetraciclina 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. Del mismo modo, Cornejo *et al.*, (2017) indicaron que altas concentraciones de oxitetraciclinas permanecieron en plumas de pollos broiler, después de su administración oral. 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, además de sus usos como fertilizante, materia prima para diésel, ingrediente de bioplásticos, (Arunlertaree y; Love *et al.*, 2012),

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 la fecha aproximada de administración y la duración 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).

En este estudio se observa que la depleción de sulfacloropiridazina 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 (desde el día 7 al día 36 post tratamiento). De esta forma, se evidenciaron concentraciones detectables durante casi todo el periodo de estudio, permaneciendo sobre los 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (LMR establecido para músculo) hasta el día

30 post tratamiento. Comparando estos resultados con los obtenidos en los tejidos comestibles, se puede afirmar que, en el momento en que las concentraciones de sulfacloropiridazina en los tejidos comestibles (músculo e hígado) se encuentran por debajo del LMR permisible o incluso por debajo del LD ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) establecido para la técnica, en las plumas es posible detectar y cuantificar el analito de interés, en concentraciones que sobrepasan el LMR establecido para músculo. En forma similar, Cornejo *et al.*, (2016) evaluaron oxitetraciclina (OTC) y su metabolito 4-epi-oxitetraciclina (4-epi-OTC), observando que el antimicrobiano permanecía en las plumas durante 46 días, mientras que, en el músculo y el hígado lo hacía durante sólo 12 y 6 días, respectivamente. Por otro lado, Pokrant (2017), observo que la depleción de FF y FFA, en plumas de pollos broiler, fue un poco más lenta, observándose una declinación de las concentraciones de florfenicol y florfenicol amina hasta el día 99 post-tratamiento. Evidenciándose concentraciones detectables en plumas durante todo el estudio, permaneciendo sobre los $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (LMR establecido para músculo). Mientras que, en musculo e hígado las concentraciones de florfenicol y florfenicol amina se depletaron rápidamente llegando a concentraciones no detectables por la metodología analítica, a los 5 y 10 días post-tratamiento respectivamente.

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 moderada unión a proteínas plasmáticas y amplia distribución a los fluidos y tejidos del cuerpo, con una alta liposolubilidad (Vandenberg *et al.*, 2012), por lo que podría alcanzar altas concentraciones en los tejidos periféricos como piel y plumas. En adición, las concentraciones encontradas a nivel de hígado y músculo, fueron detectadas solo hasta el día 14 y 21 post tratamiento, a diferencia de la matriz pluma, donde las concentraciones fueron detectadas hasta el día 36 post tratamiento. 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 esterres que distribuyen por su plumaje durante el acicalamiento (Sandilands *et al.*,

2004). Sin embargo, el no encontrar concentraciones residuales de sulfacloropiridazina en los tejidos diana (músculo e hígado) posterior al día post tratamiento, 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, teniendo una primera muda de plumaje antes del día 45 de vida. 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. 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 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. Es así, como Anderson & Hughes (2012) señala que la resistencia puede producirse a concentraciones de antibióticos que son letales o no letales, siendo a menudo una consecuencia de las dosis no letales. Tales condiciones pueden ocurrir durante la terapia con antibióticos o en entornos naturales antrópicamente contaminados con drogas. La selección no letal aumenta las tasas de aparición mutante y promueve el enriquecimiento de mutantes altamente ajustados y mutantes estables.

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

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada espectrometría de masa (LC-MS/MS), es una herramienta selectiva, específica y sensible, que permite la detección y cuantificación del analito sulfaclopiridazina a partir de las tres matrices de estudio.

El estudio de depleción demostró que concentraciones de sulfaclopiridazina perduran en plumas por un periodo prolongado, permaneciendo en concentraciones iguales o mayores al LD ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) hasta el día 61 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.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las plumas de pollos broiler tratados con una formulación comercial de sulfaclopiridazina sódica al 10%, no debiese utilizarse como subproducto destinado a la alimentación animal, sin ser debidamente monitoreadas, hasta el día 61 post tratamiento. Por lo tanto, es relevante monitorear y fiscalizar los piensos que contengan derivados de plumas, para así evitar el reingreso de residuos farmacológicos en la cadena alimenticia.

Esta memoria de título sustenta la hipótesis planteada de que concentraciones de sulfaclopiridazina 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).

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 medicamento de uso veterinario utilizados en aves de producción.

BIBLIOGRAFÍA

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. 2012. Capítulo 21 Residuos de medicamentos de uso veterinario. **In:** Toxicología alimentaria. 5a ed. Díaz de Santos. 394-412.

ANDERSSON, D.; HUGHES, D. 2012. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. 15(3):162-72

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.

ANGKITTRAKUL, S; CHOMVARIN, C; CHAITA, T; KANISTANON, K; WAETHEWUTAJARN, S. 2005. Epidemiology of antimicrobial resistance in Salmonella isolated from pork, chicken meat and humans in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 36(6):1510-5.

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

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.

BERENDSEN, B.; BOR, G.; GERRITSEN, H.; JANSEN, L.; ZUIDEMA, T. 2013. The disposition of oxytetracycline to feathers after poultry treatment. *Food Addit. Contam.* 30(12): 2102–2107.

CE, COMISIÓN EUROPEA. 1990. Reglamento (CEE) No 2377/90 del consejo de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.

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

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

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

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

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

CHILE, MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2006. Resolución N°1992 Establece nómina de aditivos autorizados para la elaboración y fabricación de alimentos y suplementos para animales y deroga resoluciones que indica. Mayo, 2006.

CODEX ALIMENTARIUS. 2015. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CAC/MRL 2-2015. Updated as at the 38th session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015).

CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA. 2008. Manual de normas de bioseguridad. CONICYT. 2^a ed. Santiago, Chile.

CORNEJO, J.; POKRANT, E.; ARAYA, D.; BRICEÑO, C.; HIDALGO, H.; MADDALENO, A.; ARAYA-JORDÁN, C & SAN MARTIN, B. 2017. Residue depletion of oxytetracycline (OTC) and 4-epi-oxytetracycline (4-epi-OTC) in broiler chicken's claws by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS: PART A.**

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 Drog in food. Hotel Zuiderduin Egmond aan Zee The Netherlands .23 y 25 de mayo. 2016. pp 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. (3) 683-688.

CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGÜEN, D.; PIZARRO, N.; HIDALGO, H.; SAN MARTIN, B. 2010. Depletion study of three formulations of flumequine in edible tissues and drug transfer into chicken feathers. *J. Vet. Pharmacol. Therp.* 34(2): 168-175.

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.

EMA, EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 2010. COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union.

EMEA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 1996. Note for guidance: Approach towards harmonization of withdrawal periods, EMEA/CVMP/036/95.

FANG, G.; HE, J.; WANG, S. 2006. Multiwalled carbon nanotubes as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of 10 sulfonamides in eggs and pork. *Journal of Chromatography A.* 1127:12-17.

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

GUZMAN, F. 2001. Tesis doctoral: Estudio analítico de sulfamidas, compuestos asociados y productos de degradación mediante nuevos métodos de separación. Ciudad Real, España. 15- 25.

HINDLE, R. 2003. A validated atmospheric pressure chemical ionization method for analysing sulphonamides in pork muscle. [En línea]<
<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-0182EN.pdf> > [Consulta: 04-04-16].

INE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS. 2014. Producción Pecuaria 2008-2013.

JANSEN, J.; BOLCK, J.; BERENDSEN, J. 2016. Feather segmentation to discriminate between different enrofloxacin treatments in order to monitor off-label use in the poultry sector. *Anal Bioanal Chem.* 408:495–502.

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.

KAN, C.; PETZ, M. 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between Yolk and White. *J. Agric. Food Chem.* 48: 6397-6403.

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

LAPIERRE, L. 2012. Resistencia a los Antimicrobianos en Bacterias Patógenas aisladas de Animales Productores de Alimentos. *Avances en Ciencias Veterinarias.* Vol: 27(2).

LEESON, S.; WALSH, T. (2004) Feathering in commercial poultry I. Feather growth and composition. *World's Poultry Science Journal*, 60, 42–51.

LEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, B.1.; KOWALSKI, C.J. 2010. Sulfachlorpyrazine residues depletion in turkey edible tissues. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 1365-2885.

LEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, B.1.; KOWALSKI, C.J. 2013. Residue depletion of sulfachlorpyrazine in edible tissues of broiler chickens. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 30(2):272-7.

LI, Y.; BU, S. 2016. Determination of sulphachloropyrazine-diaveridine residues by high performance liquid chromatography in broiler edible tissues. (12):1555-63.

LOVE, D. C.; HALDEN, R. U.; DAVIS, M. F.; NACHMAN, K. E. 2012. Feather meal: a previously unrecognized route for reentry into the food supply pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). *Environ. Sci. Technol.* Vol. 46: 3795-3802.

LOZANO, M.C.; ARIAS, D.C. 2008. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Rev Colom Cienc Pecua.* 21(1):121-135.

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

MARTÍNEZ, J.; BAQUERO, F. 2002. Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. Clin. Microbiol. Rev. 15(4):647-679.

MEEKER, D.; HAMILTON, C. 2006. An overview of the rendering industry. **In:** Meeker D, 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 Drugs in food. Hotel Zuiderduin Egmond aan Zee The Netherlands .23 y 25 de mayo. 2016. pp 175.

MINISTERIO DE SALUD, CHILE. 2014. Resolución 1462 exenta fija límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados al consumo humano. Octubre, 1999.

ODEPA, OFICINA DE ESTUDIOS Y POLITICAS AGRARIAS. 2015. Actualización del mercado avícola. [En línea] <http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1428415820Aves201503.pdf> [Consulta: 10-03-16].

ODEPA. OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS. 2013. Industria Avícola. [En línea]<<http://www.odepa.cl/odepaweb/publicaciones/doc/10530.pdf>> [Consulta: 16-12-15]

PARZANESE, M. 2014. Tecnologías para la Industria Alimentaria PROCESAMIENTO DE SUBPRODUCTOS AVÍCOLAS. Ministerio de Agricultura de Argentina. 1-13

POKRANT, E. 2017. Evaluación de las concentraciones de florfenicol y su metabolito activo florfenicol amina en tejidos comestibles y plumas de pollo broiler mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC MS/MS). Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias; Universidad de Chile. Santiago, Chile.

SAG, SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. 2016. Sistema en línea de búsqueda de medicamentos veterinarios autorizados por el SAG. [En línea]. <http://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos_1.asp>. [Consulta: 24-01-2016].

SAG, SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. 2015. Sistema en línea de búsqueda de medicamentos veterinarios autorizados por el SAG. [En línea]. <http://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos_1.asp>. [Consulta: 17-11-2015].

SAG, SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. 2014. Informe de productos registrados, Coliprim. [En línea]. <<http://medicamentos.sag.gob.cl/CARGAS/ETIQUETAS/113.pdf>>. [Consulta: 24-01-2016].

SHAO, B.; DONG, D.; WU, Y.; HU, J.; MENG, J.; TU, X.; XU, S. 2005. Simultaneous determination of 17 Sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* 546 (2):174–181

SAN MARTIN, B.; CORNEJO, J.; IRAGÜEN, D.; HIDALGO, H.; ANADÓN, A. 2007. Depletion study of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in edible tissues and feathers of white leghorn hens by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Food Prot.* 70(8): 1952-7.

SWISHER, K. 2008. Market Report 2008: Times were good, until prices collapsed. *Render Magazine.*10-17.

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 antibioticresistance of Salmonella isolated from retail raw chicken meat in Vietnam. *Journal of Food Protection.* 77(1): 57-66.

TALERO-PÉREZ, Y.; MEDINA, O.; ROZO-NÚÑEZ, W. 2014. Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Univ. Sci.* 19 (1): 11-29.

THOMPSON, T.; NOOT, D. 2005. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* 551: 168–176.

USP, UNITES STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. 2007. Sulfonamides (Veterinary—Systemic). *American Academy of Veterinary.* 1-4.

VANDENBERGE, V.; DELEZIE, E.; HUYGHEBAERT, G.; DELAHAUT, P.; DAESELEIRE, E.; CROUBELS, S. 2012. Residues of sulfadiazine and doxycycline in

broiler liver and muscle tissue due to crosscontamination of feed. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 29(2):180-8.

WEGH, R.; BERENDSEN, B.; BLOKLAND, M.; ZUIDEMA, T.; STERK, S. 2016. Hair and feathers: the matrix of choice for antedating the use of antibiotics, β -agonists and steroidesters?. **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.**WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2014. Antimicrobial resistance global report on survei.

YOSHIDA, H.; YAMAZAKI, J.; OZAWA, S.; MIZUKOSHI, T.; MIYANO, H. 2009. Advantage of LC-MS metabolomics methodology targeting hydrophilic compounds in the studies of fermented food samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57:1119-1126.

PLANIFICACIÓN

Periodos Actividades	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6	Mes 7	Mes 8
Crianza de pollos								
Implementación de metodologías analíticas								
Preparación de las muestras								
Análisis de las Muestras								
Construcción de Curvas de Calibración								
Análisis de Resultados								
Preparación del Manuscrito								
Informe de Avance								
Informe Final								

ANEXOS

Anexo 1: Certificado de comité de bioética




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


Santiago, 20 de noviembre de 2014

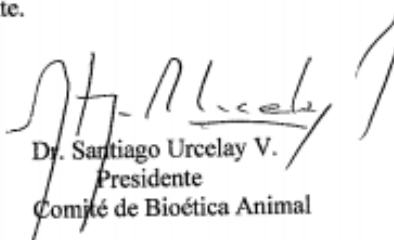
CERTIFICADO N° 23-2014

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 eutanasias de acuerdo a lo especificado en el formulario y según las recomendaciones de AVMA (2013) por personal competente.


Dra. Tamara Tadić G.
Director
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Urceley V.
Presidente
Comité de Bioética Animal

Anexo 2: Certificado comité de bioseguridad



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 sulfacloropiridazina a partir de plumas de pollos broiler.

Detección de sulfacloropiridazina en plumas de pollos broiler mediante

LC MS/MS

Metodología de extracción:

1. Pesar 2 gr de plumas en un tubo falcón de 50 ml.
2. Fortificar con estándar interno a todas las muestras, dejar reposar por 15 min tapado.
3. Agregar 40 ml de acetato de etilo.
4. Agitar 15 en un vortex.
5. Sónicar por 5 min
6. Centrifugar a 3000 RPM por 10 minutos.
7. Pasar por jeringa 50 ml con lana de vidrio a tubo falcón de 50 ml
8. Concentrar hasta 15 ml en baño maría entre 40° y 50°C. con flujo de nitrógeno
9. Acondicionar columnas de fase solida 6ml y 500mg scx con 6ml de hexano y 6ml de acetato de etilo.
10. Pasar muestra a través de columna.
11. Lavar columna con 2 ml de agua.
12. Lavar con 2 ml metanol.
13. Eluir con 10 ml de metanol- amoniaco 48,5/1,5.
14. Secar en baño maría entre 40° y 50° C. con flujo de nitrógeno.
15. Reconstituir con 300 µl de solución 15/85 fase A/ fase B.
16. Agitar y sónicar por 5 min.
17. Pasar a tubo Eppendorf y centrifugar 10 min a 13.500 RPM
18. Filtrar con filtros Millex y guardar en viales.

Anexo 4: Metodología analítica para la extracción de sulfaclopiridazina a partir de hígado de pollos broiler.

**Detección de sulfaclopiridazina en hígado de pollos broiler mediante
LC MS/MS**

Metodología de extracción:

19. Pesar 2 gr de hígado en un tubo falcón de 50 ml.
20. Fortificar con estándar interno a todas las muestras, dejar reposar por 15 min tapado.
21. Agregar 15 ml de agua.
22. Agitar 10 en un vortex.
23. Agregar 500ul de NaOH 1M
24. Agitar por 15 min y sónicar por 5 min.
25. Ajusta a pH 7,5- 8,0 con HCl 10% v/v.
26. Agregar 10 ml de Acetato de Etilo.
27. Agitar 10 min y centrifugar 2 min a 5000rpm.
28. Agitar suavemente con la mano para disolver el gel.
29. Centrifugar por 10 min a 5000 rpm.
30. Guardar la fase superior en tubo falcón de 50 ml.
31. Agregar 10 ml de Acetato de Etilo.
32. Agitar 10 min y centrifugar 2 min a 5000rpm.
33. Agitar suavemente con la mano para disolver el gel.
34. Centrifugar por 10 min a 5000 rpm.
35. Guardar la fase superior en tubo falcón de 50 ml
36. Secar en baño maría entre 40° y 50° C. con flujo de nitrógeno.
37. Reconstituir con 500 µl de solución 15/85 fase A/ fase B.
38. Agitar y sónicar por 5 min.
39. Pasar a tubo Eppendorf y centrifugar 10 min a 13.500 RPM
40. Filtrar con filtros Millex y guardar en viales.

Anexo 5: Metodología analítica para la extracción de sulfacloropiridazina a partir de músculo de pollos broiler.

Detección de sulfacloropiridazina en músculo de pollos broiler mediante LC MS/MS
Metodología de extracción:
<ol style="list-style-type: none">1. Pesar 5 gr de músculo en un tubo falcón de 50 ml.2. Fortificar con estándar interno a todas las muestras, dejar reposar por 15 min tapado.3. Agregar 15 ml de agua.4. Agitar 10 en un vortex.5. Agregar 500ul de NaOH 1M6. Agitar por 15 min y sónicar por 5 min.7. Ajusta a pH 7,5- 8,0 con HCl 10% v/v.8. Agregar 10 ml de Acetato de Etilo.9. Agitar 10 min y centrifugar 2 min a 5000rpm.10. Agitar suavemente con la mano para disolver el gel.11. Centrifugar por 10 min a 5000 rpm.12. Guardar la fase superior en tubo falcón de 50 ml.13. Agregar 10 ml de Acetato de Etilo.14. Agitar 10 min y centrifugar 2 min a 5000rpm.15. Agitar suavemente con la mano para disolver el gel.16. Centrifugar por 10 min a 5000 rpm.17. Guardar la fase superior en tubo falcón de 50 ml18. Secar en baño maría entre 40° y 50° C. con flujo de nitrógeno.19. Reconstituir con 500 µl de solución 15/85 fase A/ fase B.20. Agitar y sónicar por 5 min.21. Pasar a tubo Eppendorf y centrifugar 10 min a 13.500 RPM22. Filtrar con filtros Millex y guardar en viales.

Anexo 6: Tabla resumen validación del método analítico para detección de sulfacloropiridazina en músculo de pollo broiler.

<u>Resumen Validación sulfacloropiridazina</u>	
<u>Especificaciones analíticas</u>	
Método analítico	Sulfacloropiridazina en músculo
Analito	Sulfacloropiridazina
Matriz/especie	Músculo de pollo broiler
Equipo	HPLC
Detector	MS/MS
Columna	Symmetry C8 3,5 um 2,1x100mm waters
Fase móvil	Fase A: Ac. Fórmico al 0,1% en metanol ph = 2,9 +/- 0,3. Fase B: Ac. Fórmico al 0,1% en agua pH =2,7 +/- 0,2.
<u>VALIDACIÓN</u>	
Parámetros	Resultados
1. Tiempo de retención (TR)	SCP: 12,58min (promedio)/ CV: 0,82%
2. Especificidad	No hay interferentes en el TR de los analitos
3. Límite de detección (LD)	SCP: 5ng/gr.
4. Límite de cuantificación (LC)	SCP: 10ng/gr.
5. Linealidad de la curva de calibración	SCP: $R^2 > 0,96$ / CV de las pendientes: 5,81%
6. Recuperación (promedio)	SCP: 82,72%
7. Precisión :	
7.1. Repetibilidad (CV %)	SCP: 10 ng/gr: 5,03% 40 ng/gr: 6,31%; 100 ng/gr: 1,87%
7.2. Reproducibilidad (CV %)	SCP: 10 ng/gr: 8%; 40 ng/gr: 8.65%; 100 ng/gr: 2,92%