



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

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS
ANALÍTICAS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTOMETRO DE MASAS (LC MS/MS) PARA LA
DETECCIÓN DE TETRACICLINAS EN PLUMAS Y TEJIDOS
COMESTIBLES DE POLLOS BROILER**

EKATERINA VALERIEVNA POKRANT HUERTA

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

PROFESOR GUÍA: JAVIERA CORNEJO KELLY

Proyecto Fondo de Investigación en Ciencias Veterinarias (FIV) 2013

SANTIAGO, CHILE
2015



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

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS
ANALÍTICAS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTOMETRO DE MASAS (LC MS/MS) PARA LA
DETECCIÓN DE TETRACICLINAS EN PLUMAS Y TEJIDOS
COMESTIBLES DE POLLOS BROILER**

EKATERINA VALERIEVNA POKRANT HUERTA

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

NOTA FINAL:.....

PROFESOR GUÍA : JAVIERA CORNEJO KELLY

PROFESOR CORRECTOR: BETTY SAN MARTIN

PROFESOR CORRECTOR: LISETTE LAPIERRE

SANTIAGO, CHILE
2015

MEMORIA DE TÍTULO

“IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTOMETRO DE MASAS (LC MS/MS) PARA LA DETECCIÓN DE TETRACICLINAS EN PLUMAS Y TEJIDOS COMESTIBLES DE POLLOS BROILER”

“IMPLEMENTATION AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGIES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED MASS SPECTROMETER (LC MS / MS) FOR TETRACYCLINE DETECTION IN FEATHERS AND EDIBLE TISSUES OF BROILER CHICKENS”

Ekaterina Valerievna Pokrant Huerta*

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

Financiamiento

Proyecto Fondo de Investigación en Ciencias Veterinarias (FIV) 2013

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
Tetraciclinas: origen, espectro de acción y características farmacocinéticas.....	3
Situación actual sobre los límites máximos residuales (LMR) para OTC y CTC.....	4
Estudios de bioacumulación de antimicrobianos en plumas y depleción en tejidos comestibles de aves.....	5
Validación de metodologías analíticas.....	7
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Implementación de las metodologías analíticas.....	9
Animales experimentales.....	9
Obtención de las muestras.....	10
Procesamiento de las muestras.....	10
Reactivos y estándares.....	11
Proceso de extracción de las tetraciclinas desde las matrices biológicas.....	11
Parámetros para la validación de las metodologías analíticas.....	12
Análisis instrumental.....	14
Criterios de confirmación para muestras positivas y controles de calidad interno por LC-MS/MS.....	14
RESULTADOS.....	16
Objetivo específico N°1: Implementación y optimización de las metodologías analíticas.....	16
Objetivo específico N°2: Definición del límite de detección y cuantificación de los métodos analíticos.....	19

Objetivo específico N°3: Validación de las metodologías analíticas en plumas, músculo e hígado.....	19
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIÓN.....	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ANEXOS.....	43
Certificado de bioética.....	43
Certificado de bioseguridad.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nro. 1. Rango aceptable de recuperación según concentración detectada de analito mediante HPLC.....	13
Tabla Nro. 2. Máximo CV según fracción de masa del analito detectado mediante HPLC.....	14
Tabla Nro. 3. Tolerancia máxima permitida según intensidad relativa.....	15
Tabla Nro. 4. Cambios para optimización de metodología descrita Berendsen, <i>et al.</i> 2013, para extracción de tetraciclinas en plumas.....	16
Tabla Nro. 5. Coeficientes de determinación (R^2) por columnas SPE empleadas según los analitos de interés a partir de curvas de matriz fortificadas (pluma), en concentraciones de trabajo de 20, 40, 80, 120 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	17
Tabla Nro. 6. Promedio de los tiempos de retención y su CV% a partir de la inyección de seis drogas puras según los analitos de interés.	19
Tabla Nro. 7. Promedio, Des. Est. y CV% de las concentraciones cuantificadas de las 20 repeticiones de fortificados al LD para los analitos OTC, CTC, epi-OTC y epi-CTC en las tres matrices (plumas, músculo e hígado).....	22
Tabla Nro. 8. Cálculo del LC para los 4 analitos según las matrices plumas, músculo e hígado.....	23
Tabla Nro. 9. R^2 y CV % de las tres curvas de calibración para los 4 analitos de interés, según matriz: plumas, músculo e hígado a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	26
Tabla Nro. 10. Promedio, DS y CV de la recuperación de tetraciclinas en matriz plumas según concentraciones de trabajo: 20, 60 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	27
Tabla Nro. 11. Promedio, DS y CV de la recuperación de tetraciclinas en matriz músculo según concentraciones de trabajo: 20, 60 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	28
Tabla Nro. 12. Promedio, DS y CV de la recuperación de tetraciclinas en matriz hígado según concentraciones de trabajo: 20, 60 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	29
Tabla Nro. 13. Cálculo del promedio, la DS y el CV de la repetibilidad para cada nivel de fortificación de los 4 analitos según matrices plumas, músculo e hígado.....	31

Tabla Nro. 14. Cálculo del promedio, la DS y el CV de la reproducibilidad intralaboratorio para cada nivel de fortificación de los 4 analitos según matrices plumas, músculo e hígado.....	32
Tabla Nro. 15. Comparación de los CV de la repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio, según matrices plumas, músculo e hígado.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nro. 1. Curva de calibración de 5 niveles de fortificación (concentraciones de 20, 40-80-120 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) para el analito OTC (A) Limpieza mediante columnas SPE sep-pak C18 y (B) Extracción mediante columnas SPE OASIS HLB.....	17
Figura Nro. 2. Cromatograma de droga pura, representativo de 6 inyecciones (A) muestra peak en el tiempo de retención del analito OTC (461.0/426.0). (B) muestra peak en el tiempo de retención del EI TC-d6 (451.0/416.0).....	20
Figura Nro. 3. Cromatograma de la inyección de muestra negativa de pluma de pollo, representativa de los 20 análisis (A) no existen interferentes en el tiempo de retención del analito OTC (461.0/426.0). (B) muestra peak en el tiempo de retención del EI Tc-d6 (451.0/416.0).....	20
Figura Nro. 4. Cromatograma de la inyección de muestra negativa de músculo de pollo, representativa de los 20 análisis (A) no existen interferentes en el tiempo de retención del analito OTC (461.0/426.0). (B) muestra peak en el tiempo de retención del EI Tc-d6 (451.0/416.0).....	21
Figura Nro. 5. Cromatograma de la inyección de muestra negativa de hígado de pollo, representativa de los 20 análisis (A) no existen interferentes en el tiempo de retención del analito OTC (461.0/426.0). (B) muestra peak en el tiempo de retención del EI Tc-d6 (451.0/416.0).....	21
Figura Nro. 6. Curva de calibración de 5 niveles de fortificación (concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) para el analito OTC, en matriz plumas.....	24
Figura Nro. 7. Curva de calibración de 5 niveles de fortificación (concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) para el analito OTC, en matriz músculo.....	25
Figura Nro. 8. Curva de calibración de 5 niveles de fortificación (concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) para el analito OTC, en matriz hígado.....	25

RESUMEN

Los antimicrobianos en animales productivos son la principal herramienta terapéutica para combatir enfermedades bacterianas, sin embargo su uso incorrecto puede derivar en la presencia de residuos en los productos y subproductos de origen animal. Cuando sobrepasan los Límites Máximos Residuales (LMR) son un riesgo para la salud de la población y una causa del aumento de la resistencia microbiana. Las plumas como subproducto son utilizadas en piensos y según estudios previos acumulan residuos antimicrobianos, de esta forma son una ruta de reingreso de residuos antimicrobianos a través de la cadena alimentaria. Para comparar concentraciones presentes de tetraciclinas en plumas con las de los tejidos, es imprescindible la validación de las metodologías analíticas implementadas para la detección de Tetraciclinas en estas matrices por lo cual el objetivo del estudio fue validar metodologías analíticas mediante cromatografía líquida acoplado a detector de masas (LC-MS/MS) para detectar y cuantificar Oxitetraciclina, Clortetraciclina y sus metabolitos activos en plumas, músculo e hígado. Se utilizaron 20 pollos broiler criados con una dieta libre de antimicrobianos. El análisis fue mediante LC-MS/MS, utilizando columnas de extracción en fase sólida OASIS™ HLB y sep-pak C18. Los resultados indican que las metodologías implementadas son válidas ya que cumplen con los criterios descritos por la FDA: VICH GL49 y la Directiva 2002/657/CE, siendo precisas, selectivas y lineales. Todas las curvas presentaron un coeficiente de determinación (R^2) $>0,95$ y una recuperación para todos los analitos mayor a 90%. Mediante las metodologías validadas es posible detectar y cuantificar tetraciclinas, en las tres matrices con un límite de detección de $20 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$.

Palabras clave: Validación Metodologías Analíticas, Residuos, Tetraciclinas, Plumaz, LC MS/MS.

ABSTRACT

Antimicrobials in livestock are the main therapeutic tool for the combat of bacterial diseases, however the inadequate use may result in the presence of residues in animal edible and non-edible (byproducts) tissues. When exceeding Maximum Residue Limit (MRL) are a risk to the health of the population and a cause of increased antimicrobial resistance. Among the byproduct, feathers are used in feed and according to previous studies can accumulate antimicrobial residues, in this way is a route re-entry of antimicrobial residues via food chain. To compare concentrations of tetracycline present in feathers with tissue, it is essential to validate analytical methodologies implemented for the detection of tetracyclines in these matrices, so the aim of the study was to validate analytical methodologies by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) to detect and quantify Oxytetracycline, Chlortetracycline and its metabolites in feathers, muscle and liver. 20 broiler chickens were used, raised with a diet free of antibiotics. The analysis was made by LC-MS / MS, using columns of solid phase extraction OASISTM HLB and sep-pak C18. The results indicate that the implemented methods are valid because they meet the criteria described by the FDA: VICH GL49 and Directive 2002/657 / EC, to be precise, selective and linear. All curves showed a coefficient of determination (R^2) > 0.95 and a recovery for all analytes greater than 90%. By validated methods can detect and quantify Tetracyclines, in the three matrices with a detection limit of 20 mg / kg⁻¹.

Keywords: Validation Analytical methodologies, Residues, Tetracyclines, Feathers, LC-MS/MS.

INTRODUCCIÓN

Los antimicrobianos han sido empleados en las aves de corral desde los años 1950`s, con el objetivo de tratar enfermedades bacterianas y así mejorar la eficiencia de los sistemas productivos. Si bien estos son una herramienta eficaz en el control y tratamiento de diferentes patologías bacterianas tanto para los humanos como para los animales, su uso no está exento de riesgo cuando no son utilizados de la forma adecuada. De esta forma, el uso incorrecto de estas drogas en animales productivos puede derivar en la presencia de residuos de antimicrobianos en los productos o subproductos de origen animal, constituyendo un riesgo para la salud pública.

Cuando los residuos se encuentran por sobre los Límites Máximos Residuales (LMR), se pueden producir diferentes efectos adversos en la población humana, tales como: efectos tóxicos, como es el caso del cloranfenicol causante de la aplasia medular en personas; efectos inmunológicos (alergias), causados por algunos antimicrobianos como los beta-lactámicos; efectos carcinógenos, como por ejemplo los nitrofuranos por su mecanismo genotóxico; y efectos sobre la microflora intestinal ya que residuos de antimicrobianos contribuyen a una presión selectiva sobre los microorganismos del tracto gastrointestinal, generando bacterias resistentes a estas drogas.

Según la organización mundial de la salud (OMS) en su informe del año 2014, la resistencia antimicrobiana se ha transformado en un importante problema para la salud pública, fundamentalmente cuando se origina frente a antimicrobianos de primera línea de elección, ya que la principal amenaza es que a corto plazo no existirán antimicrobianos para tratar este tipo de bacterias resistentes en la medicina humana

Para asegurar el uso correcto de los fármacos es necesario respetar el periodo de resguardo (PR) del producto farmacéutico empleado en los animales de producción. Este periodo corresponde al lapso de tiempo que transcurre terminada la terapia hasta el momento en que los animales son beneficiados, lo que asegura que no existan residuos de fármacos y/o sus metabolitos en concentraciones que superen a los LMR establecidos para los diferentes tejidos. Sin embargo, en el caso de los tejidos no comestibles, como las plumas, existen estudios publicados que muestran que algunos antimicrobianos como por ejemplo las fluoroquinolonas, pueden permanecer en estas en altas concentraciones aun cuando ya han finalizados los PR y los residuos de esta droga no son detectables en los tejidos comestibles.

Este aspecto cobra relevancia si se considera que las plumas son utilizadas en la elaboración de harina de plumas para la alimentación de otros animales destinados a consumo humano, tales como porcinos, bovinos y peces, incorporando y traspasando residuos de fármacos a la cadena alimenticia.

Dentro de los diferentes antimicrobianos empleados en la producción avícola están las tetraciclinas. Estas son utilizadas por su espectro de acción sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas, Micoplasmas, Clamidias, entre otras. Es por esto, que es necesario determinar las concentraciones de estos antimicrobianos presentes en plumas y compararlas con las concentraciones detectadas en los tejidos comestibles de pollos tratados.

Para poder realizar esta comparación es fundamental contar con una metodología analítica validada que sea capaz de determinar tetraciclinas en las matrices plumas, músculo e hígado, ya que mediante este proceso se asegura el cumplimiento de los requerimientos necesarios para que los resultados obtenidos sean confiables.

Por ese motivo, el objetivo de la presente memoria de título fue implementar, optimizar y validar una metodología analítica, con el fin de demostrar que el método seleccionado para la detección de tetraciclina en tejidos comestibles (músculo e hígado) y plumas es adecuado para su uso previsto en el laboratorio y que sus resultados serán confiables y reproducibles.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los antimicrobianos siguen siendo la principal herramienta terapéutica en el control de patologías infecciosas de origen bacteriano en animales de producción. Si bien estos traen beneficios sanitarios y productivos, su uso debe ser de forma correcta, respetando los periodos de resguardo para evitar la persistencia de residuos por sobre los Límites Máximos Residuales (LMR) en los productos y subproductos de origen animal. (San Martín, *et al.*, 2014).

La permanencia de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados a consumo humano por sobre los LMR establecidos, constituye un riesgo para la salud pública, debido a diferentes efectos adversos sobre la salud humana. Entre estos se encuentran los efectos tóxicos directos, efectos inmunológicos (reacciones alérgicas), mutagénesis, carcinogénesis, teratogénesis y efectos sobre la microflora intestinal, ya que bajas concentraciones de estas drogas contribuyen a una persistente presión para la selección de bacterias resistentes que colonizan tejidos animales y producen disturbios en la flora normal (Martínez y Baquero, 2002; Anadón y Martínez-Larrañaga, 2012). Además se ha evidenciado transferencia de bacterias resistentes y genes de resistencia desde animales a humanos, principalmente de bacterias zoonóticas, como *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp., donde los pollos y pavos son el reservorio animal para ambas bacterias (Anderson *et al.*, 2003).

Fairchild *et al.*, (2005), investigaron los efectos de la administración de tetraciclinas en bacterias provenientes de aves comerciales como *Enterococcus* spp, *E. coli* y *Campylobacter* spp. Observando en el estudio de sensibilidad que *Enterococcus* spp y *E. coli*, presentaban resistencia a tetraciclinas, además estas bacterias incluían diferentes genes de resistencia, en muestras obtenidas a partir de pollos expuestos y no expuestos al tratamiento con este antimicrobiano.

Tetraciclinas: origen, espectro de acción y características farmacocinéticas.

Dentro de los antimicrobianos utilizados en la industria avícola se encuentran las tetraciclinas, las cuales fueron descubiertas en 1948 por Benjamin Duggar, como un producto natural producido por la especie *Streptomyces*. Una de las características más destacables de estos antimicrobianos es la presencia de un grupo funcional ceto-enol, que le entrega la capacidad de quelar cationes divalentes. La clortetraciclina (CTC) y la oxitetraciclina (OTC), son los primeros miembros de esta familia. Estos compuestos

son empleados en medicina veterinaria y humana para el tratamiento de enfermedades respiratorias y digestivas ya que poseen un espectro de acción frente a bacterias: Gram positivos, Gram negativos aerobios, anaerobios, espiroquetas, Actinomyces, Rickettsias, Clamidias, Micoplasmas y algunos protozoos (Prats *et al.*, 2005; Cristofani *et al.*, 2009).

La biodisponibilidad de las tetraciclinas por vía oral es variable, siendo para la clortetraciclina de un 30% y para la oxitetraciclina y tetraciclina de un 60 a 80%. La mayor absorción es en ayuno, y disminuye por la ingestión de sales de calcio e hidróxido de aluminio, ente otros, debido a su propiedad quelante. Se distribuyen ampliamente en el organismo encontrándose en orina y liquido prostático y se acumulan en células reticuloendoteliales del hígado, bazo, médula ósea, huesos, dentina y esmalte de los dientes (Patiño y Campos, 2008; Rang *et al.*, 2012).

Asimismo, se ha descrito que las tetraciclinas pueden acumularse en piel y uñas de humanos (Geria *et al.*, 2009), razón por la cual se pueden encontrar también en plumas de aves tratadas, ya que estas se encuentran formadas por queratina, proteína fundamental de estas estructuras. Las plumas, así como las uñas y pelo son estructuras complementarias del sistema tegumentario (Bragulla y Homberger, 2009).

Para la producción avícola, en nuestro país se encuentran disponibles formulaciones comerciales de OTC y CTC para su uso en aves de engorda, en las siguientes patologías: cólera aviar (por *Pasteurella multocida*), enfermedad crónica respiratoria (por *Mycoplasma gallisepticum* y *Escherichia coli*), coriza infecciosa (por *Avibacterium paragallinarum*), salmonelosis, afecciones digestivas (por enterobacterias), sinovitis infecciosa (por *Mycoplasma synoviae*), coliseptisemia y onfalitis (por *Escherichia coli*) (SAG, 2014).

Situación actual sobre los Límites Máximos Residuales (LMR) para OTC y CTC

En cuanto a la situación actual sobre los LMR, la Unión Europea establece para tetraciclina (TC), OTC y CTC, concentraciones máximas de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ en músculo, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ en hígado y de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ en riñón de pollo (EMEA, 2005; CE, 2009b). En Chile los LMR se encuentran establecidos en la Resolución Exenta N° 551 del 2014, en donde se fijan concentraciones máximas para músculo, hígado y riñón, de 200, 600 y 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ (Chile, Ministerio de Salud, 2014).

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

Actualmente existen algunos estudios que han demostrado 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 Martín *et al.*, (2007), en sus resultados encontraron altas concentraciones de enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacino en plumas de aves tratadas con este antimicrobiano, en comparación a los tejidos comestibles (músculo, hígado y riñón). Además, en estudios recientes realizados por Cornejo *et al.*, (2010), se encontraron altas concentraciones de antimicrobianos presente en la matriz plumas, comparado con las muestras de hígado y músculo, una vez finalizado el periodo de resguardo calculado para la formulación. Asimismo se evidencia que la eliminación de flumequina desde las plumas fue más lenta que en los otros tejidos. Sumado a esto, los resultados de Cornejo *et al.*, (2012) demuestran que los antimicrobianos enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacino 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. Estos autores detectaron una concentración de $100 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ a los 9 días post-tratamiento, momento en que en los tejidos comestibles las concentraciones de residuos no fueron detectadas, con un límite de detección de $1 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$.

Por su parte, otros autores como Heinrich *et al.*, (2013) y Berendsen *et al.*, (2013) realizaron estudios, con los antimicrobianos ceftiofur y oxitetraciclina respectivamente, y evidenciaron que residuos de estos fármacos se bioacumulan en las plumas de pollos tratados, aun cuando se han respetado los periodos de resguardo y las concentraciones de las drogas en músculo e hígado eran menores a los LMR, o en concentraciones no detectables.

Estos antecedentes demuestran que existe traspaso de concentraciones de antimicrobianos a las plumas, lo cual representa un riesgo para la salud pública debido a que son un subproducto que es reincorporado en la cadena alimenticia a través de las dietas de otros animales, como es el caso de los peces (Arunlertaree y Moolthongnoi, 2008), por ser una fuente de aminoácidos de bajo costo para la elaboración de dietas destinadas a animales de producción (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).

Considerando los antecedentes expuestos por San Martín *et al.*, (2007) y Cornejo *et al.*, (2010), Love *et al.*, (2012) realizaron un estudio en donde se muestrearon harinas de plumas de diferentes estados de Estados Unidos (Arkansas, Carolina del Norte, Oregon, California, Idaho, Tennessee) y de China (n=12). En este estudio utilizaron una versión modificada del método EPA 1694 para tejidos y las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida acoplada a detector de masa. 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; los de mayor frecuencia fueron: sulfonamidas, macrólidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, antagonistas del ácido fólico y streptograminas.

Actualmente existen estudios de depleción para tetraciclinas en diferentes matrices. Anadón *et al.*, (2013) cuantificaron clortetraciclina en hígado, riñón y músculo de pollo broiler, mientras que Muñoz *et al.*, (2014) detectaron oxitetraciclina en huevo de gallinas ponedoras *White Leghorn*. Sin embargo a la fecha no existen estudios que muestren la depleción de residuos de tetraciclinas en tejidos comestibles (músculo e hígado) y su relación con las concentraciones presentes en plumas de aves tratadas. Los antecedentes presentados demuestran la necesidad de estudiar el comportamiento de estos fármacos en esta matriz.

Para cumplir este objetivo, y entregar resultados que permitan cuantificar concentraciones de tetraciclinas en las plumas de forma confiable y precisa, es de fundamental importancia la selección de una metodología analítica, así como la validación del método seleccionado.

Para seleccionar un método analítico primero se deben definir los objetivos del estudio. Para los fines de validación es necesario la selección de un método con alta especificidad y precisión, dentro de éstos, los métodos mediante cromatografía líquida acoplada a detector de masas cumplen con estas características, debido a que es un instrumento que detecta específicamente las masas precursoras de los analitos de interés y las masas productos a partir de la fragmentación de la masa precursora, en conjunto se terminan los tiempos de retención, es decir el momento en que aparecen los analitos en

la corrida cromatografía. Es por esto que además ha sido empleado en estudios previos en estas matrices realizados por San Martín *et al.*, (2007), Cornejo *et al.*, (2010), Cornejo *et al.*, (2012), Love *et al.*, (2012), Berendsen *et al.*, (2013) y Heinrich *et al.*, (2013).

Validación de metodologías analíticas

Por su parte, todo método analítico antes de ser empleado en un laboratorio para la determinación de residuos en alimentos, debe ser validado, ya que mediante este proceso se determina que un método es confiable, preciso y selectivo, por lo tanto adecuado para su uso en el laboratorio de acuerdo a los fines propuestos.

Existen diferentes organismos que establecen directivas para la validación de los métodos analíticos como el *Codex Alimentarius*, la FDA (*Food and Drug Administration*) *VICH GL49 validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011) y la Comunidad Europea decisión de la comisión 2002/657/CE (CE, 2002).

En esta memoria de título se implementaron, optimizaron y validaron metodologías analíticas que permiten determinar y cuantificar oxitetraciclina, clortetraciclina y sus metabolitos activos 4-epi-OTC y 4-epi-CTC en plumas y tejidos comestibles, específicamente músculo e hígado de pollos broiler.

OBJETIVO GENERAL

Implementar y validar metodologías analíticas por Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometro de Masas (LC MS/MS) para la detección y cuantificación de Oxitetraciclina (OTC), Clortetraciclina (CTC), 4-epi-OTC y 4-epi-CTC en tejidos comestibles (músculo e hígado) y plumas de aves.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Implementar y optimizar metodologías analíticas por LC MS/MS para la detección de tetraciclinas en las matrices músculo, hígado y plumas.
- 2.** Definir Límites de Detección (LD) y límites de Cuantificación (LC) de los métodos implementados por LC MS/MS para determinar tetraciclinas en tejidos comestibles (músculo e hígado) y plumas.
- 3.** Validar los métodos analíticos por LC MS/MS para determinación de OTC, CTC y sus epímeros: 4-epi-OTC y 4-epi-CTC en tejidos comestibles (músculo e hígado) y plumas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La validación de los métodos analíticos se realizó en el laboratorio FARMAVET de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Acreditado bajo las normas ISO 17025.Of2005. Además se consideraron las medidas de bioseguridad sugeridas por el Manual de Normas de Bioseguridad (CONICYT, 2008).

Para el correcto manejo de las muestras se realizó una capacitación en el laboratorio FARMAVET, asegurando de esta manera las competencias necesarias para realizar la extracción de los analitos de las diferentes matrices, de acuerdo a las normas ISO 17025.Of2005.

Implementación de las metodologías analíticas

Para la implementación de las metodologías analíticas para la detección de OTC, CTC, 4-epi-OTC y 4-epi-CTC en tejidos comestibles se utilizó como referencia el “Método analítico para tetraciclinas en músculo por LC-MS/MS”, el cual se basa en la combinación dos metodologías analíticas publicadas por: Reveurs y Díaz (1994), Khong *et al.*, (2005) y Castellari *et al.*, (2009). Por su parte, para la detección en la matriz plumas se implementó un método analítico utilizando como referencia una metodología publicada: *The disposition of oxytetracycline to feathers after poultry treatment.* (Berendsen *et al.*, 2013).

Las muestras para las pruebas de los métodos analíticos implementos se obtuvieron a partir de muestras comerciales de plumas, músculo e hígado, libres de tetraciclinas.

Animales experimentales

Para la validación del método se utilizaron 20 pollos broiler machos, de genética Ross 308, se escogieron aves de esta genética debido a que son una raza precoz, de buena conversión alimenticia, gran rusticidad y adaptabilidad, y que presentan una tasa de crecimiento inferior a pollos de engorde de genética Cobb 500 (Marcu *et al.*, 2013). Estas características favorecen su uso experimental ya que evitan una condición de engorde excesivo, lo que colabora al bienestar animal en las condiciones experimentales.

Los animales experimentales fueron mantenidos desde el día 1 de vida en baterías de crianza, con condiciones ambientales controladas ($25 \pm 5^\circ\text{C}$ de temperatura, 50-60% de humedad relativa), acceso *ad libitum* al agua y alimento no medicado. El alimento fue

formulado de acuerdo a los requerimientos de la raza. Las jaulas contaron con un piso de alambre elevado, con el fin de evitar la contaminación con el contenido fecal. Las aves fueron criadas y monitoreadas por un médico veterinario especialista en avicultura y patología aviar, en las dependencias del laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Tanto para la mantención como el sacrificio de los animales experimentales se respetaron las condiciones de bienestar animal aprobadas por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El protocolo para el manejo y supervisión fue basado en la Ley N°20.380 “Sobre Protección de Animales” (Chile, Ministerio de Salud, 2009) y en la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (CE, 2010). 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, 2009a).

Obtención de las muestras

Las muestras de plumas, músculo e hígado fueron obtenidas inmediatamente después del sacrificio de los animales experimentales. Las plumas fueron las primeras en ser muestreadas para evitar contaminación con los otros tejidos, posteriormente se obtuvieron muestras de músculo a partir de la pechuga y pierna de las aves, el hígado fue muestreado por completo.

Las muestras fueron almacenadas individualmente en bolsas plásticas y debidamente rotuladas, para su posterior procesamiento.

Procesamiento de las muestras

Tanto para la implementación y optimización de metodologías analíticas, como para el análisis de las muestras para validación, las muestras de tejido fueron procesadas en una procesadora de alimento, previa eliminación de la piel y grasa. Por otro lado las plumas después de un tratamiento criogénico con nitrógeno líquido, fueron procesadas también en una procesadora de alimento. Se utilizaron dos procesadoras, una para cada experimento, para evitar la contaminación cruzada entre las matrices.

Reactivos y Estándares

Para el análisis y cuantificación de OTC, CTC, 4-epi-OTC y 4-epi-CTC en plumas, músculo e hígado se utilizaron estándares de pureza certificada Dr. Ehrenstorfer GmbH, Sigma Aldrich o equivalentes. Todos los solventes utilizados fueron grado *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Como estándar interno (EI) se utilizó tetraciclina Isotópica d-6 (TC-d6) de pureza certificada obtenida de Toronto *Research Chemicals* (Canadá). El uso de un EI proporciona una medida de control para la extracción, inyección de la cromatografía líquida y la variabilidad de ionización. El mejor patrón interno para el análisis es una versión marcada isotópicamente de la molécula que se está cuantificando. Por lo cual, en este estudio se utilizó un EI deuterado.

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

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

Proceso de extracción de tetraciclina desde las matrices biológicas

Para la extracción de residuos desde la matriz plumas se pesaron 5 gr. de muestra a la cual se le agregó el EI TC-d6. Para la extracción se utilizó como solventes acetona y tampón EDTA-McIlvain, y consecutivamente la muestra fue agitada. Para la obtención del sobrenadante las muestras fueron centrifugadas, y la totalidad del sobrenadante fue filtrado por una columna de SPE OASISTM HLB (6cc) acondicionada previamente con metanol, agua HPLC y Buffer EDTA-McIlvain. Para la elución de la columna se utilizó metanol, el cual fue evaporado bajo flujo de nitrógeno suave entre 40-50°C. Finalmente la reconstitución se realizó con 250 µL de fase móvil (ácido oxálico 0,01M/ACN, 5:1).

Para la extracción de los residuos desde las matrices músculo e hígado se pesaron 10 gr. de muestra a la cual se le agregó el EI TC-d6. Se utilizó como solvente para la extracción tampón EDTA-McIlvain y posteriormente la muestra se agitó. Para la obtención del sobrenadante las muestras fueron centrifugadas, en el caso específico de la matriz hígado se adicionó un paso en la limpieza de la muestra, en donde se adicionó hexano. La totalidad del sobrenadante fue filtrado por una columna de SPE Sep-Pak C18 acondicionada previamente con ACN y agua HPLC. Para la elución de la columna se utilizó ácido oxálico 0,01 M en metanol, lo que fue evaporado bajo flujo de nitrógeno suave entre 40-50°C. Finalmente la reconstitución se realizó con 250 µL de fase móvil.

Parámetros para la validación de metodologías analíticas

La validación del método analítico se realizó siguiendo las recomendaciones de La Unión Europea: decisión de la comisión 2002/657/CE (EC, 2002) y la FDA: *VICH GL49 validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011). Basándose en estos documentos se generó un protocolo de validación, el cual contempla la evaluación de diferentes parámetros con el fin de que la metodología sea válida para su uso en el laboratorio FARMAVET de la Facultad de Ciencias Veterinarias y pecuarias de la Universidad de Chile. Los parámetros a evaluar para la validación corresponden a:

- i. Tiempo de retención del analito: se analizaron seis 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 existe interferencia en la región de interés en la cual se espera elusión de las tetraciclinas.
- 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 fuera a lo menos 2 ó 3:1. Esta concentración seleccionada se repitió 20 veces.
- iv. Límite de cuantificación (LC): al LD se le sumó 1,64 veces la desviación estandar de los resultados obtenidos en las 20 muestras fortificadas analizadas previamente. Se aceptó si este cumplía con que la relación señal ruido como mínimo 10:1.

- v. Linealidad de la curva de calibración: se utilizaron cinco concentraciones, siendo la concentración más baja igual al LD, se realizaron tres curvas y un análisis de sus pendientes. Se aceptaron los rangos de concentración si el coeficiente de determinación (R^2) $\geq 0,95$ y el CV $\leq 25\%$.
- vi. Recuperación: Para la determinación de la recuperación se seleccionaron 18 muestras de material en blanco, los cuales se fortifican 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 70-110%, para las concentraciones de trabajo, en la Tabla 1 se muestran los rangos de recuperación (%) según la concentración del analito.

Tabla. 1. Rango aceptable de recuperación según concentración detectada de analito mediante HPLC.

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 repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio.
1. Repetibilidad: se eligieron 18 muestras blancos de diferentes fuentes y se fortificaron al nivel de tres puntos de la curva de calibración (seis muestras fortificadas a cada nivel).
 2. Reproducibilidad intralaboratorio: se realizaron seis curvas fortificadas de diferentes fuentes, a los mismos tres niveles que en el caso de la repetibilidad, pero en días diferentes y por diferentes analistas. El criterio de aceptación fue según los CV máximos aceptables para la fracción de masa del analito detectado, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla. 2. Máximo CV según fracción de masa del analito detectado mediante HPLC.

Fracción de masa	CV de Reproducibilidad
1 µg/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, constituido por una bomba cuaternaria, un autosampler y un horno de columna, (Agilent serie 3200) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (API 4000, ABSCIEX). La columna analítica utilizada fue una C18 Sunfire (3,5mm x 2,1mm x 150 mm) obtenida de Waters® y el software utilizado para la integración de las muestras analizadas consistió en un Analyst versión 1.6.2.

La separación cromatográfica fue mediante un gradiente de fase móvil de: ácido fórmico en agua 0,1% (fase A) y ácido fórmico en metanol 0,1% (fase B), el flujo fue de 0,2 ml/min⁻¹, el volumen de inyección fue de 25 µl y la temperatura del horno de columna de 30°C.

Este instrumento ha sido empleado para fines similares por San Martin *et al.*, (2007) y Cornejo *et al.*, (2010, 2012), debido a su alta sensibilidad y especificidad.

Criterios de confirmación para muestras positivas y controles de calidad interno por LC-MS/MS

Los criterios de confirmación para la detección de los analitos OTC, CTC, 4-epi-OTC Y 4-epi-CTC detectado por LC MS/MS en muestras de plumas, músculo e hígado son los siguientes:

- 1- Tiempo de retención del analito: El tiempo de retención del analito detectado en una muestra no debe superar en un $\pm 2,5\%$ del tiempo de retención del control.
- 2- Tiempo de retención relativo: El cociente entre el tiempo de retención del analito y del EI, no supere en un $\pm 2,5\%$ entre la muestra positiva y el control.

- 3- Ratio: Primero se calcula el cociente entre la transición minoritaria y la transición mayoritaria, expresada en A veces.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Área de transición minoritaria}}{\text{Área de transición mayoritaria}}$$

Una vez obtenido el ratio, este se multiplica por 100 para ser expresado como Intensidad Relativa:

$$\text{Intensidad Relativa} = \text{Ratio} \times 100$$

Obtenida la intensidad relativa, tanto para las muestras detectadas como para los controles, se compara con la tolerancia máxima de la Tabla 3.

Tabla. 3. Tolerancia máxima permitida según intensidad relativa.

Intensidad Relativa (% del pico de base)	Tolerancia máxima permitida
>50%	+/-20%
>20%-50%	+/-25%
>10%-20%	+/-30%
≤10%	+/-50%

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

A cada intensidad relativa le corresponde una tolerancia. Tal tolerancia se aplica entonces al ratio del control, quedando:

$$\text{Ratio control} \pm \text{Tolerancia}$$

Luego, se compara si el ratio obtenido para una muestra positiva cae dentro del intervalo de ratio de los controles. Cabe destacar que el ratio es siempre menor o igual a 1.

- 4- Señal Ruido: Debe ser igual o mayor a 3 en la transición minoritaria de una muestra considerada positiva.

Luego la muestra es considerada positiva si cumple con los cuatro criterios de confirmación en forma simultánea y será expresada en $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ (ppb).

RESULTADOS

Objetivo Especifico N° 1:

Implementación y optimización de las metodologías analíticas

Para implementar la metodología analítica para la extracción de tetraciclinas en plumas se utilizó como base una referencia publicada, *The disposition of oxytetracycline to feathers after poultry treatment*, de Berendsen *et al.*, 2013.

Los cambios realizados para la optimización del método, se muestran en resumen en la Tabla 4. Dentro de estos, el aumento de volumen de los solventes en la extracción fue el más significativo para la recuperación de los analitos desde la matriz.

Tabla. 4. Cambios para optimización de metodología descrita Berendsen, *et al.* 2013, para extracción de tetraciclinas en plumas.

Cambios en metodología Berendsen, et al. 2013	Resultados
Reducción del gramaje de la muestra	Disminución de la sensibilidad
Aumento del volumen de los solventes	Aumento en la recuperación
Cambio por columnas sep-pak C18	Disminución de la recuperación
Adición de reactivo tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride 98% (TCEP-HCL)	Sin cambios en recuperación

Por su parte el uso de cartuchos de extracción SPE sep-pak C18 dio como resultado para las curvas de calibración un $R^2 < 0,95$, por lo cual estas no presentaban una buena linealidad comparadas con las curvas en donde la extracción se realizó mediante cartuchos OASIS HLB, descrita en el método, obteniendo un $R^2 > 0,95$ para todos los analitos de interés (Tabla 5 y Figura 1).

Tabla. 5. Coeficientes de determinación (R^2) por columnas SPE empleadas según los analitos de interés a partir de curvas de matriz fortificadas (pluma), en concentraciones de trabajo de 20, 40, 80, 120 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$.

Coeficientes de Determinación (R^2)		
Analito de interés	Limpieza de muestra con columnas SPE sep-pak C18	Limpieza de muestra con columnas SPE OASIS HLB
OTC	0,9168	0,9715
CTC	0,933	0,9812
4-epi-OTC	0,9222	0,9747
4-epi-CTC	0,8824	0,9581

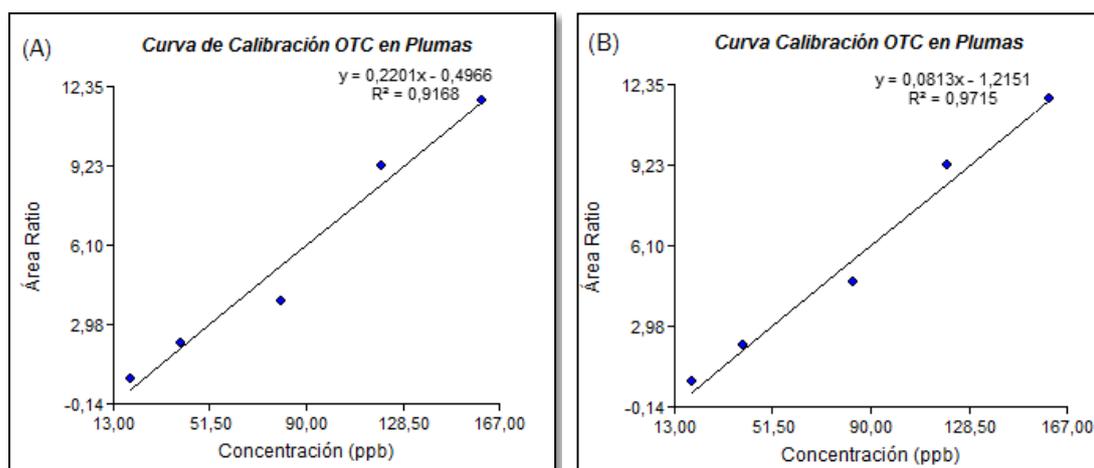


Figura. 1. Curva de calibración de 5 niveles de fortificación (concentraciones de 20, 40-80-120 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) para el analito OTC. (A) Limpieza mediante columnas SPE sep-pak C18 y (B) Extracción mediante columnas SPE OASIS HLB.

Además para un mejor *clean up* de la muestra se adicionó el uso de filtros millex de 30 mm x 0,22 µm, esto debido a la propiedad de la matriz, la que presenta mayor cantidad de interferentes en comparación a la matriz músculo.

En el caso de la matriz músculo se probó la metodología analítica para tetraciclinas en músculo por LC MS/MS del laboratorio FARMAVET, como el método se encuentra estandarizado y validado para esta matriz no se realizó ninguna modificación.

Por su parte para la matriz hígado también se probó la metodología analítica para tetraciclinas en músculo por LC MS/MS del laboratorio FARMAVET. Sin embargo fue necesario adicionar un paso en el *clean up* del método con hexano, debido a las características específicas de la matriz, la cual es la que presenta mayor porcentaje de grasa, lo que actuaría como interferente en la lectura cromatográfica.

Para determinar si las metodologías implementadas cumplían con el objetivo de extracción de los analitos de interés: OTC, CTC, 4-epi-OTC y 4-epi-CTC. Primero se detectaron cromatográficamente estos analitos y posteriormente a partir de curvas de calibración en matriz fortificada a concentraciones de 20, 40, 80, 120 y 160 µg/kg⁻¹, se cuantificaron y se determinó la linealidad mediante la determinación del R².

Objetivo específico N° 2:

Definición del Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC) de los métodos analíticos

Para la definición del límite de detección se realizaron curvas de diferentes concentraciones para determinar la concentración en donde la relación señal ruido fuera mayor a 3:1, con esto se determinó un nivel para el límite de detección de $20 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ en la matriz plumas, músculo e hígado. Determinado el límite de detección para las tres matrices se establecieron las concentraciones de trabajo de 20, 40, 60, 80 y $100 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, para realizar la validación de las tres metodologías analíticas según las recomendaciones de La Unión Europea: decisión de la comisión 2002/657/CE (EC, 2002) y la FDA: *VICH GL49 validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011). En el objetivo específico N° 3 se validó el límite de detección y cuantificación en las tres matrices.

Objetivo específico N° 3:

Validación de las metodologías analíticas en plumas, músculo e hígado

Tiempo de retención del analito

El tiempo de retención para las 6 inyecciones de droga pura se mantuvo constante en los análisis presentando un CV menor al 5% de variación, para los cuatro analitos de interés, el promedio de los tiempos de retención para OTC y su metabolito fue de 12,7 min y 8,2 min. respectivamente. Para el analito CTC y su metabolito fue de 14,6 y de 10,1 min, respectivamente. El EI Tc-d6 mostro un promedio de 11,7 min. en los tiempos de retención, en la Tabla 6 se muestra el promedio de los tiempos de retención de las seis inyecciones de droga pura con los respectivos CV.

Tabla. 6. Promedio de los tiempos de retención y su CV% a partir de la inyección de seis drogas puras según los analitos de interés.

Analito	Promedio de los tiempos de retención (min.)	CV%
OTC	12,7	0,32
CTC	14,6	0,28
epi-OTC	8,2	2,41
epi-CTC	10,1	2,3
TC-d6	11,7	0,96

Especificidad

En cuanto a la especificidad del método esta fue demostrada mediante el análisis de 20 muestras libres de antimicrobianos provenientes de distintas fuentes, para cada matriz. Dentro del grupo de muestras analizadas, los resultados demostraron que no hay presencia de interferentes en el tiempo de retención de los cuatros analitos de interés. En la Fig. 2 se muestra el cromatograma del analito OTC a partir de la inyección de una droga pura. En las Fig. 3, 4 y 5 se muestran los cromatogramas a partir de muestras libres de antimicrobianos en las matrices plumas, músculo e hígado respectivamente, en donde no se observan interferentes en los tiempos de retención del analito OTC.

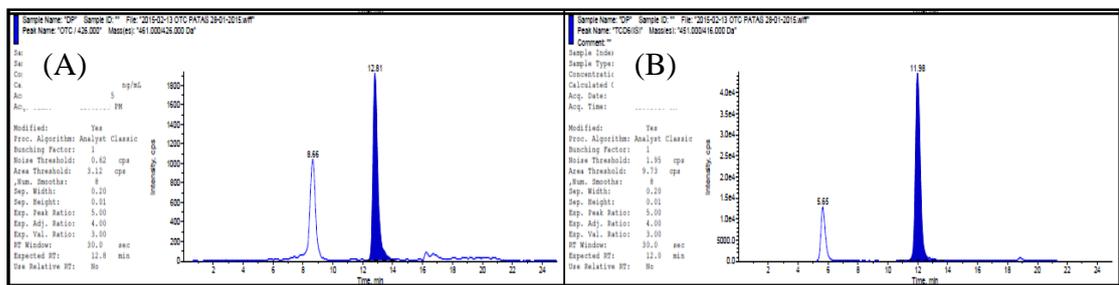


Fig. 2. Cromatograma de droga pura, representativo de 6 inyecciones (A) muestra peak en el tiempo de retención del analito OTC (461.0/426.0). (B) muestra peak en el tiempo de retención del EI TC-d6 (451.0/416.0)

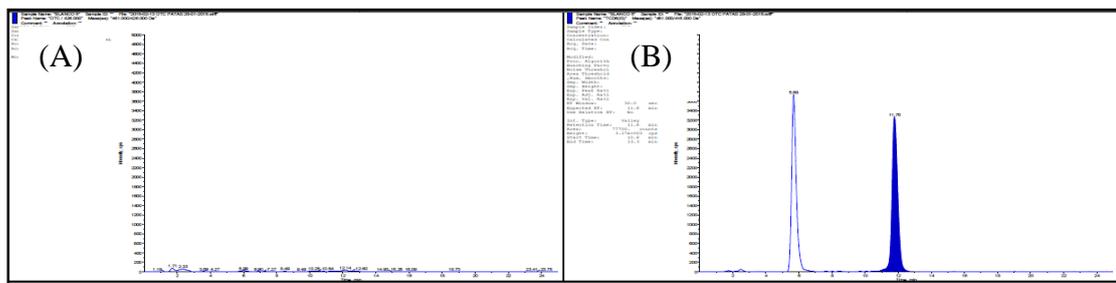


Fig. 3. Cromatograma de la inyección de muestra negativa de pluma de pollo, representativa de los 20 análisis (A) no existen interferentes en el tiempo de retención del analito OTC (461.0/426.0). (B) muestra peak en el tiempo de retención del EI Tc-d6 (451.0/416.0).

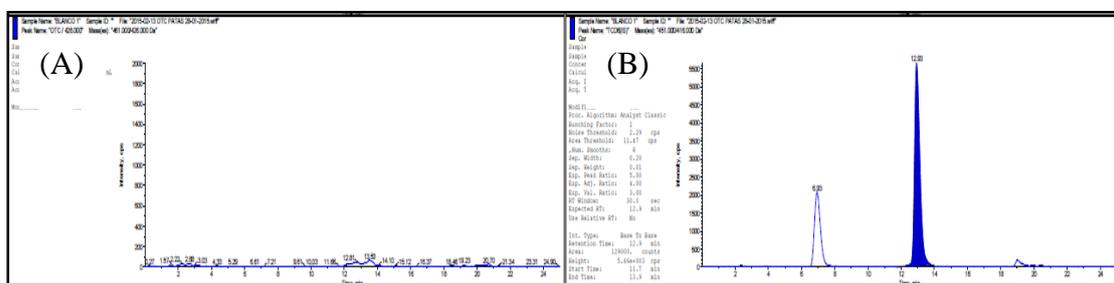


Fig. 4. Cromatograma de la inyección de muestra negativa de músculo de pollo, representativa de los 20 análisis (A) no existen interferentes en el tiempo de retención del analito OTC (461.0/426.0). (B) muestra peak en el tiempo de retención del EI Tc-d6 (451.0/416.0).

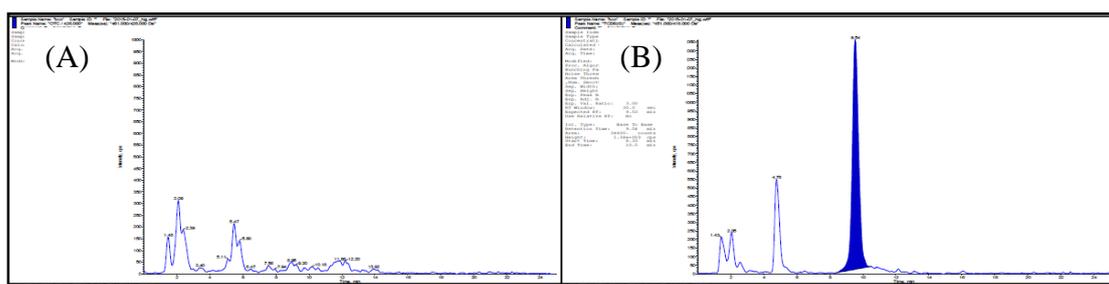


Fig. 5. Cromatograma de la inyección de muestra negativa de hígado de pollo, representativa de los 20 análisis (A) no existen interferentes en el tiempo de retención del analito OTC (461.0/426.0). (B) muestra peak en el tiempo de retención del EI Tc-d6 (451.0/416.0).

Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC)

Para la validación del parámetro se realizaron 20 repeticiones de la concentración en matriz fortificada. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el CV de las 20 repeticiones. Se aceptó un CV% menor al 25%. Los resultados obtenidos cumplieron con el criterio y se muestran en la Tabla 7.

Tabla. 7. Promedio, Des. Est. y CV% de las concentraciones cuantificadas de las 20 repeticiones de fortificados al LD para los analitos OTC, CTC, epi-OTC y epi-CTC en las tres matrices (plumas, músculo e hígado).

	Analito	Promedio de concentraciones de las 20 repeticiones ($\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$)	Des. Est.	CV %
Matriz Plumas	OTC	20,551	1,561	7,6
	CTC	18,965	0,931	4,91
	epi-OTC	14,833	2,581	17,40
	epi-CTC	22,296	1,801	8,03
Matriz Músculo	OTC	21,028	0,762	3,62
	CTC	20,090	0,746	3,96
	epi-OTC	19,030	0,275	1,45
	epi-CTC	20,077	0,965	4,81
Matriz Hígado	OTC	24,173	3,059	12,65
	CTC	21,122	3,369	15,95
	epi-OTC	21,064	4,385	20,82
	epi-CTC	20,075	4,708	23,45

Para el cálculo 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. Los resultados por analito y matriz se muestran en la Tabla 8.

Tabla. 8. Cálculo del LC para los 4 analitos según las matrices plumas, músculo e hígado.

	Analitos	Calculo LC (LD+1,64 DS de las 20 repeticiones)	LC ($\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$)
Matriz Plumas	OTC	$20+1,64*1,561$	22,5
	CTC	$20+1,64*0,931$	21,5
	epi-OTC	$20+1,64*2,581$	24,2
	epi-CTC	$20+1,64*1,801$	22,9
Matriz Músculo	OTC	$20+1,64*0,762$	21,2
	CTC	$20+1,64*0,275$	21,2
	epi-OTC	$20+1,64*0,796$	21,3
	epi-CTC	$20+1,64*0,965$	21,6
Matriz Hígado	OTC	$20+1,64*3,059$	25,0
	CTC	$20+1,64*3,369$	25,5
	epi-OTC	$20+1,64*4,385$	27,2
	epi-CTC	$20+1,64*4,708$	27,7

Linealidad de la curva

En este estudio se realizaron tres curvas de calibración de cinco niveles de concentraciones: 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, por cada una de las tres matrices, para determinar la linealidad del método (Fig. 6, 7 y 8). La linealidad de las curvas de calibración fue aceptada debido a que el coeficiente de determinación (R^2) fue mayor a 0,95 en las tres matrices. El criterio de aceptación es un R^2 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, ya que cumplen con el criterio. El R^2 y el CV% de las tres curvas para cada analito por matriz se muestra en la Tabla 9.

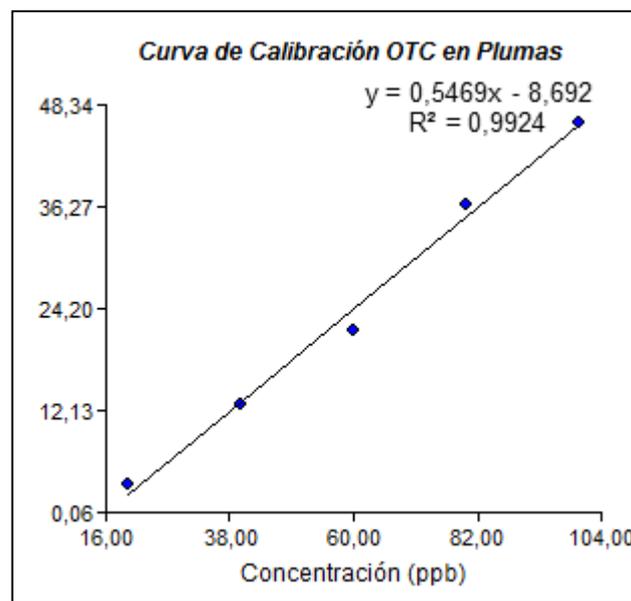


Fig. 6. Curva de calibración de 5 niveles de fortificación (concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) para el analito OTC, en matriz plumas.

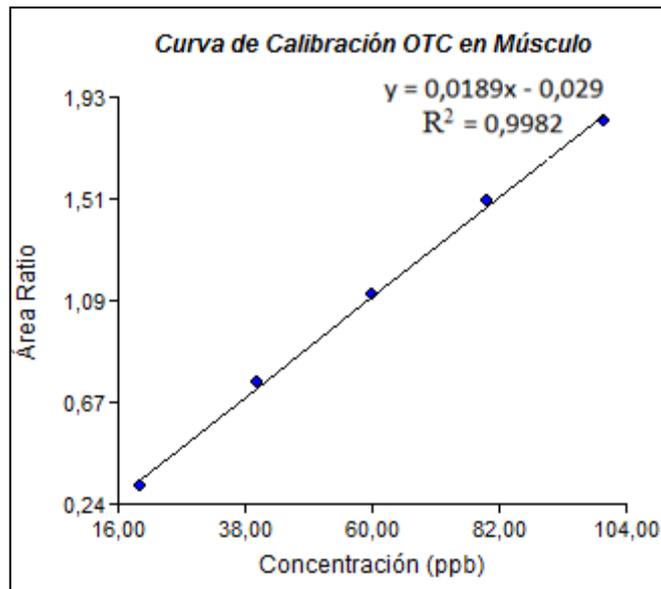


Fig. 7. Curva de calibración de 5 niveles de fortificación (concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) para el analito OTC, en matriz músculo.

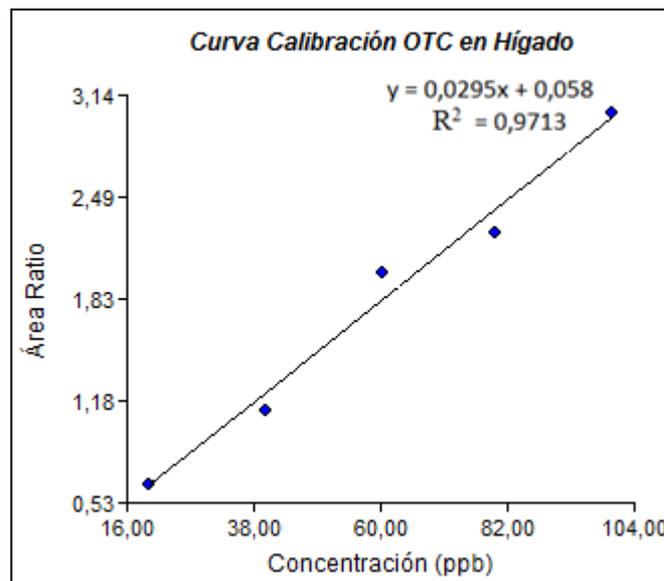


Fig. 8. Curva de calibración de 5 niveles de fortificación (concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) para el analito OTC, en matriz hígado.

Tabla. 9. R² y CV% de las tres curvas de calibración para los 4 analitos de interés, según matriz: plumas, músculo e hígado a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 µg/kg⁻¹.

Matriz	Analitos	R ² de las curvas de calibración			Prom.	Des. Est.	CV%
		Curva 1	Curva 2	Curva 3			
Plumas	OTC	0,9924	0,9822	0,9820	0,986	0,006	0,60%
	CTC	0,9850	0,9689	0,9903	0,981	0,011	1,14%
	epi-OTC	0,9740	0,9900	0,9910	0,985	0,010	0,97%
	epi-CTC	0,9885	0,9886	0,9790	0,985	0,006	0,56%
Músculo	OTC	0,9982	0,9961	0,9919	0,995	0,003	0,32%
	CTC	0,9826	0,9965	0,9926	0,991	0,007	0,72%
	epi-OTC	0,9948	0,9986	0,9965	0,997	0,002	0,19%
	epi-CTC	0,9985	0,9998	0,9924	0,997	0,004	0,40%
Hígado	OTC	0,9713	0,9672	0,9599	0,966	0,006	0,60%
	CTC	0,9610	0,9508	0,9680	0,960	0,009	0,90%
	epi-OTC	0,9787	0,9826	0,9646	0,975	0,009	0,97%
	epi-CTC	0,9620	0,9714	0,9591	0,964	0,006	0,67%

Recuperación

La recuperación fue calculada con muestras blanco fortificadas en tres niveles de concentraciones 20, 60 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1. Los cuatro analitos detectados presentaron entre un 92% y 107% de recuperación con un CV de un 15,21% y 14%, respectivamente en matriz plumas. En el caso de las muestras de músculo el rango de recuperación que se obtuvo fluctuó entre un 94% y 108% con un CV de un 9.57% y 8.3%, respectivamente y en las muestras de hígado se obtuvo una recuperación entre un 93% y 108% con un CV de un 12,87% y 8,37% respectivamente. En la Tabla 10, 11 y 12 se muestran los promedios, desviación estándar (DS) y CV% para todos los analitos según la concentración de trabajo y la matriz fortificada.

De acuerdo a los valores determinados por la Decisión 657/2002 de la Unión Europea y la FDA: VICH GL49. Se consideró un rango aceptable de recuperación para las concentraciones de trabajo entre un 70 a 110%. Por lo tanto, las recuperaciones obtenidas se aceptan ya que se cumple con el parámetro de recuperación.

Tabla. 10. Promedio, DS y CV de la recuperación de tetraciclinas en matriz plumas según concentraciones de trabajo: 20, 60 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1.

Matriz Plumas				
Concentración del fortificado	Analito	Promedio de las recuperaciones	Des. Est.	CV%
20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1	OTC	96%	0,18	19
	CTC	92%	0,14	15
	epi-OTC	107%	0,15	14
	epi-CTC	103%	0,13	13
60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1	OTC	103%	0,12	12
	CTC	105%	0,10	9
	epi-OTC	95%	0,10	11
	epi-CTC	98%	0,09	9
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1	OTC	99%	0,04	4
	CTC	98%	0,03	3
	epi-OTC	101%	0,03	3
	epi-CTC	101%	0,03	3

Tabla. 11. Promedio, DS y CV de la recuperación de tetraciclinas en matriz músculo según concentraciones de trabajo: 20, 60 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$.

Matriz Músculo				
Concentración del fortificado	Analito	Promedio de las recuperaciones	Des. Est.	CV%
20 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	OTC	104%	0,11	11
	CTC	108%	0,09	8
	epi-OTC	106%	0,08	8
	epi-CTC	104%	0,08	8
60 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	OTC	97%	0,07	7
	CTC	94%	0,09	10
	epi-OTC	95%	0,06	6
	epi-CTC	97%	0,06	6
100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	OTC	100%	0,02	2
	CTC	101%	0,03	3
	epi-OTC	101%	0,02	2
	epi-CTC	100%	0,02	2

Tabla. 12. Promedio, DS y CV de la recuperación de tetraciclinas en matriz hígado según concentraciones de trabajo: 20, 60 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$.

Matriz Hígado				
Concentraciones del fortificado	Analitos	Promedio de las recuperaciones	Des. Est.	CV%
20 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	OTC	93%	0,12	13
	CTC	89%	0,14	16
	epi-OTC	89%	0,05	5
	epi-CTC	96%	0,08	8
60 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	OTC	105%	0,08	8
	CTC	108%	0,09	9
	epi-OTC	107%	0,03	3
	epi-CTC	103%	0,05	5
100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	OTC	99%	0,02	2
	CTC	98%	0,03	3
	epi-OTC	98%	0,01	1
	epi-CTC	99%	0,02	2

Precisión

La precisión se evaluó mediante el análisis de la repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio. Para la repetibilidad se realizaron seis curvas para cada matriz, en un día, por un analista, con el mismo lote de reactivos/solventes y analizadas el mismo día. Las curvas fueron fortificadas a tres niveles de concentración: 20, 60 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$. Se calculó el promedio, la DS y el CV para cada nivel de fortificación (Tabla 13), los resultados se compararon con los resultados de las seis curvas realizadas para la reproducibilidad intralaboratorio (Tabla 14), a los mismos niveles de fortificación pero realizadas por dos analistas, en dos días diferentes y con lotes de reactivos/solventes distintos.

Los CV de la reproducibilidad intralaboratorio fueron menores a un 35% de variación para las concentraciones de fortificación de 20 y 60 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ y de un 23% de variación para la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, para los 4 analitos detectados, como se especifica en los criterios de validación de la FDA: VICH GL49 *validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011) y de la Decisión 657/2002 de la unión europea (EC, 2002). A su vez los CV de la repetibilidad fueron menores a los CV de la reproducibilidad intralaboratorio, como señala el criterio de aceptación de la Decisión 657/2002 de la unión europea (EC, 2002). (Tabla 15). Según los resultados obtenidos los parámetros se aceptan, por lo cual el método descrito es preciso.

Tabla. 13. Cálculo del promedio, la DS y el CV de la repetibilidad para cada nivel de fortificación de los 4 analitos según matrices plumas, músculo e hígado.

Repetibilidad					
Matriz	Analito	Concentración µg/kg-1	Promedio	Des. Est.	CV%
Plumas	OTC	20	18,2	2,91	16,00
		60	63,7	0,09	9,13
		100	98,1	0,03	2,95
	epi-OTC	20	20,4	2,66	13,03
		60	59,1	5,33	9,01
		100	100,3	2,82	2,81
	CTC	20	22,1	1,79	8,11
		60	55,9	3,58	6,41
		100	102,1	1,79	1,76
	epi-CTC	20	21,8	1,87	8,61
		60	56,5	3,75	6,64
		100	101,8	1,88	1,85
Músculo	OTC	20	20,7	2,01	9,71
		60	58,6	4,02	6,85
		100	100,7	2,00	1,98
	epi-OTC	20	21,3	1,67	7,86
		60	57,4	3,35	5,83
		100	101,3	1,69	1,67
	CTC	20	21,6	2,78	12,86
		60	56,8	5,56	9,80
		100	101,6	2,78	2,74
	epi-CTC	20	20,5	1,35	6,59
		60	58,9	2,71	4,59
		100	100,5	1,38	1,37
Hígado	OTC	20	18,6	0,13	13,08
		60	62,7	0,08	7,77
		100	98,6	0,02	2,47
	epi-OTC	20	17,7	0,16	15,53
		60	64,5	0,09	8,55
		100	97,8	0,03	2,81
	CTC	20	17,9	0,05	5,13
		60	64,1	0,03	3,11
		100	97,9	0,01	0,95
	epi-CTC	20	19,2	0,08	8,42
		60	61,6	0,05	5,23
		100	99,2	0,02	1,62

Tabla. 14. Cálculo del promedio, la DS y el CV de la reproducibilidad intralaboratorio para cada nivel de fortificación de los 4 analitos según matrices plumas, músculo e hígado.

Reproducibilidad intralaboratorio					
Matriz	Analito	Concentración µg/kg-1	Promedio	Des. Est.	CV%
Plumas	OTC	20	19,2	3,64	18,95
		60	61,6	7,28	11,81
		100	99,2	3,64	3,67
	epi-OTC	20	18,4	2,87	15,60
		60	63,2	5,74	9,08
		100	98,4	2,87	2,91
	CTC	20	21,4	3,00	13,99
		60	57,1	5,99	10,49
		100	101,5	3,01	2,97
	epi-CTC	20	20,5	2,67	13,04
		60	58,9	5,36	9,11
		100	100,5	2,68	2,66
Músculo	OTC	20	20,6	2,09	10,17
		60	58,9	4,19	7,11
		100	102,2	3,34	3,26
	epi-OTC	20	20,0	2,11	10,56
		60	60,1	4,22	7,03
		100	100,0	2,12	2,12
	CTC	20	21,5	2,64	12,24
		60	56,9	5,27	9,26
		100	101,6	2,63	2,59
	epi-CTC	20	20,9	1,87	8,94
		60	58,1	3,75	6,45
		100	101,0	1,85	1,83
Hígado	OTC	20	21,0	0,16	16,28
		60	58,0	0,12	11,79
		100	101,0	0,03	3,37
	epi-OTC	20	20,9	0,14	13,69
		60	58,2	0,10	9,86
		100	100,9	0,03	2,85
	CTC	20	20,4	0,15	15,06
		60	59,1	0,10	10,41
		100	100,4	0,03	3,05
	epi-CTC	20	22,4	0,09	8,57
		60	55,2	0,07	6,95
		100	102,4	0,02	1,88

Tabla. 15. Comparación de los CV de la repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio, según matrices plumas, músculo e hígado.

CV%							
Analito	Concentración µg/kg-1	Plumas		Músculo		Hígado	
		Repetibilidad	Reproducibilidad intralaboratorio	Repetibilidad	Reproducibilidad intralaboratorio	Repetibilidad	Reproducibilidad intralaboratorio
OTC	20	16,0	19,0	9,7	10,2	13,1	16,3
	60	9,1	11,8	6,9	7,1	7,8	11,8
	100	2,9	3,7	2,0	3,3	2,5	3,4
epi-OTC	20	13,0	15,6	7,9	10,6	15,5	13,7
	60	9,0	9,1	5,8	7,0	8,5	9,9
	100	2,8	4,5	1,7	2,1	2,8	2,8
CTC	20	8,1	14,0	12,9	12,2	5,1	15,1
	60	6,4	10,5	9,8	9,3	3,1	10,4
	100	1,8	3,0	2,7	2,6	0,9	3,0
epi-CTC	20	8,6	13,0	6,6	8,9	8,4	8,6
	60	6,6	9,1	4,6	6,5	5,2	7,0
	100	1,9	2,7	1,4	1,8	1,6	1,9

DISCUSIÓN

Para la implementación de las metodologías analíticas para la extracción de las tetraciclinas, oxitetraciclina, clortetraciclina y sus metabolitos activos a partir de plumas, se utilizó como referencia una metodología publicada por Berendsen *et al.*, 2013. Con el fin de optimizar el método se probaron diferentes modificaciones. La optimización del método fue necesaria ya que las plumas son altamente complejas en su procesamiento, debido a su estructura compuesta principalmente por queratina (Bragulla y Homberger, 2009) y el contenido graso que presentan externamente, estas dos características además dificultan el proceso extracción de los analitos de interés a partir de esta matriz ya que le brindan un cierto grado de impermeabilidad (Kovalev, *et al.*, 2013).

Dentro de las diferentes modificaciones realizadas, la adición del reactivo TCEP utilizado en otras metodologías analíticas para la hidrólisis proteica por su capacidad de romper enlaces disulfuro en solución acuosa, no mostro diferencias en la recuperación de los analitos a partir de la matriz plumas, por lo cual no se utilizó en la optimización de la metodología. Por otra parte, se realizaron pruebas con cartuchos SPE sep-pak C18, que corresponden a cartuchos de base sílice, y con cartuchos SPE OASIS HLB, que corresponden a columnas con un balance hidrofóbico-lipófilo. Estos últimos, entregaron recuperaciones más altas, mejor retención y selectividad. Así, los resultados obtenidos comprobaron que las columnas OASIS HLB presentan una mejor recuperación sobre todo a concentraciones más altas de analito en plumas. Además los resultados demuestran que el uso de cartuchos de extracción en fase sólida es de importancia en la matriz plumas, ya que estas estructuras poseen un contenido de grasa que las recubre externamente. Debido a que la glándula uropigial de las aves es el órgano responsable de la producción de aceite para la práctica de acicalamiento, esta glándula secreta una sustancia cerosa que consiste en una mezcla de ácidos grasos y ésteres, que se distribuye en el plumaje durante el acicalamiento (Sandilands, *et al.*, 2004), lo que interfiere en la lectura cromatográfica.

La validación de las metodologías analíticas se realizó bajo las condiciones del laboratorio de FARMAVET, con el fin de demostrar que el método era apto para su uso para el propósito determinado. A partir de las pruebas realizadas en matriz fortificada de pluma, músculo e hígado se definió un límite de detección de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ con una relación señal ruido mayor a 3:1, para las tres matrices. El CV (%) de las 20

repeticiones al LD para las tres matrices fue menor a un 25%, cumpliendo con el criterio de aceptación del parámetro establecido en la decisión 657/2002 de la Unión Europea (EC, 2002), de esta forma se considera que los datos son estadísticamente homogéneos, por lo tanto se acepta el LD. Esta concentración se interpreta como la cantidad mínima de OTC, CTC, 4-epi-OTC y 4-epi-CTC que puede ser detectada por el método analítico en plumas, músculo e hígado de pollo. El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito que debe presentar una muestra para poder ser cuantificada certeramente. De este modo, se puede determinar que el método es capaz de cuantificar confiablemente cantidades mínimas de OTC, CTC, 4-epi-OTC y 4-epi-CTC en plumas, músculo e hígado a concentraciones iguales o mayores a $27,7 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para todos los analitos en las tres matrices. Si la muestra presenta una concentración menor al LC pero mayor al LD, se puede decir que existe la presencia de los analitos pero no pueden ser cuantificados de forma precisa.

Las curvas de calibración se realizaron en intervalos de trabajo de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, y presentaron una linealidad con un R^2 mayor a 0,95, cumpliendo el requisito establecido en la decisión 657/2002/EC para las tres matrices. La regresión lineal obtenida es el diseño del modelo matemático, representado en la ecuación que permite simular el comportamiento de la variable dependiente respecto de la variable independiente. La ecuación de la recta es $y = a+bx$, en donde y = área, a = intercepto en el eje y , x = concentración, b = pendiente. Los métodos implementados para las tres matrices demostraron ser lineales, lo que significa que la respuesta otorgada por el espectrómetro de masas expresada como área ratio (relación del área cuantificada del analito de interés y del estándar interno), es proporcional a la concentración de analito presente en la muestra y por lo tanto, se puede concluir que los métodos son cuantitativos.

Para la recuperación de las metodologías, la cual refleja la extracción del analito a partir de la matriz biológica. Las recuperaciones de todos los analitos para las tres matrices se encuentran dentro de los rangos de aceptación según la decisión 657/2002 de la UE y de la FDA que fija un rango entre 70 y 110% para las concentraciones de trabajo. Siendo un 89% y un 108% la menor y mayor porcentaje de recuperación respectivamente para los cuatro analitos en las tres matrices. Esto indica que los métodos poseen una buena capacidad de extracción del analito a partir de las matrices biológicas estudiadas.

La precisión se evaluó por medio de la reproducibilidad intralaboratorio y la repetibilidad. Para el caso de la reproducibilidad, que corresponde a la precisión bajo condiciones de trabajo diferente, se realizaron seis curvas a concentraciones de 20, 60 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ realizadas en dos días diferentes, por dos analistas diferentes y con distintos lotes de reactivos y solventes. En cambio para la reproducibilidad que corresponde a la precisión bajo las mismas condiciones de trabajo, se realizaron las mismas seis curvas en las mismas concentraciones, pero el mismo día, por el mismo analista y el mismo lote de reactivos y solventes. Los resultados para todos los analitos en las tres matrices cumplen con el criterio de aceptación, el cual determina un CV% para la reproducibilidad de un 23% y 35% para las concentraciones de trabajo y la repetibilidad menor o igual a la reproducibilidad. Cabe señalar que para el analito CTC en la matriz músculo esta relación de repetibilidad menor a la reproducibilidad no se cumplió, sin embargo se acepta el criterio debido a que no involucra un error en el método analítico, es decir que no significa que la metodología analítica no sea repetitiva ni reproducible, si no que se puede explicar en base a que los dos analistas que realizaron la reproducibilidad eran más precisos en la extracción y en particular este analito fue recuperado con mayor precisión. Con los resultados obtenidos se puede afirmar que el método es reproducible y repetitivo y por lo tanto preciso, ya que no existen variaciones importantes en la recuperación de los métodos al ser realizados en diferentes días, por diferentes analistas y distintos lotes de solventes/reactivos.

Las concentraciones de trabajo escogidas para esta validación, se determinaron según los LMR establecidos por la unión europea de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ y 600 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, en las matrices músculo, hígado y riñón respectivamente. Por su parte para Chile el reglamento sanitario de los alimentos en la resolución exenta N°551/2014 fija los límites máximos residuales para músculo, hígado y riñón de pollo de 200, 600 y 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ respectivamente (Chile. Ministerio de Salud. 2014). Sin embargo, para validar las metodologías analíticas se utilizó una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ como último nivel de concentración en las curvas de calibración para las tres matrices, el cual corresponde al LMR para músculo de pollo según los límites establecidos en la Unión Europea (CE, 2009b).

La importancia de este estudio es que mediante la implementación y validación de las metodologías analíticas es posible detectar estos antimicrobianos en pluma, músculo e hígado de forma confiable y precisa, para así poder realizar posteriormente estudios de

depleción en las tres matrices. Actualmente existen diferentes estudios de estas drogas en diferentes productos de la industria avícola, como el estudio realizado por Anadón *et al.*, (2013) en donde cuantificaron CTC en hígado, riñón y músculo de pollo broiler, ellos detectaron residuos de estos antimicrobianos en hígado y riñón en concentraciones de 205,4 y 81,7 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ respectivamente, pero no detectaron concentraciones de residuos en músculo. En este estudio los análisis fueron realizados tres días después terminado el tratamiento. Por su parte Muñoz *et al.*, (2014) detectó OTC en huevo de gallinas ponedoras en donde según los resultados obtenidos indican que los periodos de resguardo se encuentran influenciados por la biodisponibilidad oral, la distribución, el peso molecular y la solubilidad del fármaco y que estas propiedades influían en la distribución del fármaco en el huevo.

En cuanto a los subproductos existe información sobre residuos de OTC en plumas Berendsen *et al.*, (2013) analizaron segmentos de las plumas de pollos tratados con oxitetraciclina, detectando el analito específicamente en la raquis de las plumas.

Sin embargo, a pesar de los resultados de estos estudios, es importante realizar una comparación de las concentraciones de tetraciclinas presentes en las plumas con las presentes en los tejidos comestible ya que publicaciones sobre este tema realizados por San Martín *et al.*, (2007), Cornejo *et al.*, (2010) y (2012) en donde realizaron estudios de depleción de fluoroquinolonas en tejidos de pollos y bioacumulación en plumas, demuestran que la concentraciones de antimicrobianos de esta familia se acumulan en concentraciones mayores que las presentes en los tejidos, por periodos de tiempo más prolongados, una vez finaliza la terapia y respetados los periodos de resguardo establecidos para las formulaciones empleadas. Es por esto que es importante no solo determinar la concentración y acumulación de residuos en plumas, si no relacionarla con concentraciones cuantificadas en tejidos comestibles. Por su parte en un estudio realizado por un grupo de investigadores (Love *et al.*, 2012) en donde se muestrearon directamente las harinas de plumas se detectaron en todas las muestras al menos 2 familias de antimicrobianos.

La importancia de estudiar las concentraciones de antimicrobianos presentes en las plumas es que estos subproductos son incorporados como harinas en la alimentación de otros animales. De esta forma se describe que son parte de la alimentación de otros animales destinados a consumo humano. Se calcula que del peso vivo de los pollos producidos, aproximadamente el 37% no se consume directamente por los seres

humanos convirtiéndose en fuente de materia prima utilizada para piensos (Meeker y Hamilton, 2006; Divakala *et al.*, 2009). Considerando que en Chile se produjeron 567.004,20 toneladas de carne de pollo en el año 2014 (APA, 2015), la cantidad de subproductos producidos es importante. Como ejemplo en EEUU se produjo 604 millones de kg de harina de plumas de los que se exportó un 12% aproximadamente y el 84% restante se utilizó en el país (Swisher, 2008).

De esta forma, las plumas son una fuente importante en la ruta de reingreso de residuos de antimicrobianos a la cadena alimenticia, convirtiéndose en un riesgo para la salud pública, principalmente por el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. Según la OMS en su reporte del año 2014. Además de ser una grave amenaza para la salud pública, tiene efectos económicos se estima un costo de al menos €1.500 millones y 25.000 muertes cada año en la Unión Europea (ECDC, 2009).

Por otra parte el uso de antimicrobianos contribuye a la contaminación del medio ambiente con microorganismos resistentes, a partir de los desechos producidos tanto por la industria farmacéutica, el uso terapéutico en la medicina humana y de animales productivos tratados con antimicrobianos, ya que además de la eliminación a través de la orina y las heces, residuos de antimicrobianos pueden permanecer en los productos y subproductos de origen animal, contribuyendo de esta manera en el traspaso de residuos de antimicrobianos, bacterias resistentes y genes de resistencia (Andersson y Hughes, 2014).

Considerando la evidencia publicada y la importancia para la salud pública es que se deben seguir investigando la ruta de reingreso de residuos a través de la cadena alimentaria, por lo cual es de suma importancia el estudio de bioacumulación de tetraciclinas en las plumas y su relación con las concentraciones presentes en los tejidos, siendo este trabajo la base fundamental para realizar estudios posteriores en plumas y tejidos comestibles, específicamente músculo e hígado, con resultados confiables y precisos.

CONCLUSIÓN

La validación de los métodos fue desarrollada de acuerdo a los criterios de validación descritos en la Decisión 657/2002 de la unión europea (EC, 2002) y la FDA: VICH GL49 *validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011). Los tres métodos descritos para las distintas matrices: plumas, músculo e hígado, cumplieron con las criterios de aceptación para todos los parámetros determinados, por lo cual los métodos validados son precisos, selectivos y lineales, simultáneamente para los analitos: OTC, CTC, y sus metabolitos activos: 4epi-OTC y 4epi-CTC, con un límite de detección de $20 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, concentración menor al LMR para músculo e hígado de pollo según el reglamento (UE) N° 37/2010 (CE, 2009b).

El análisis mediante LC-MS/MS mediante electrospray en modo de ionización positiva es una alternativa eficiente y sustentable para la determinación de tetraciclinas y sus metabolitos activos en plumas, músculo e hígado de aves, ya que es una herramienta de detección altamente sensible y específica debido a que detecta las masas de los analitos y de sus fragmentos.

Los métodos implementados y validados en las tres matrices permiten la detección y cuantificación de los analitos OTC, CTC, 4-epi-OTC y 4-epi-CTC, por lo cual estos métodos validados podrían ser la base para realizar futuros estudios de depleción de estos antimicrobianos en plumas, músculo e hígado, y así además poder comparar y relacionar las concentraciones detectadas entre las tres matrices con resultados confiables y precisos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.** 2012. Capítulo 21 Residuos de medicamentos de uso veterinario. **In:** Toxicología alimentaria. 5ª ed. Díaz de Santos. pág. 394-412.
- **ANADÓN, A.; GAMBOA, F.; MARTÍNEZ, M.; CASTELLANO, V.; MARTÍNEZ, M.; ARES, I.; RAMOS, E.; SUAREZ, F.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.** 2013. Plasma disposition and tissue depletion of chlortetracycline in the food producing animals, chickens for fattening. *Food and Chem. Toxicol.* 50: 2714–2721.
- **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.
- **ANDERSSON, D.; HUGHES, D.** 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* doi: 10.1038/nrmicro3270. 14 pág.
- **APA. ASOCIACION DE PRODUCTORES DE AVICOLAS DE CHILE A.G.** 2015. [en línea]. <<http://www.apa.cl/estadisticas>>. [consulta: 02-04-2015].
- **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.
- **BRAGULLA, H.; HOMBERGER, D.** 2009. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J. Anat.* 214: 516–559.
- **CASTELLARI, M.; GRATACÓS-CUBARSÍ, M.; GARCÍA-REGUEIRO, J.** 2009. Detection of tetracycline and oxytetracycline residues in pig and calf hair by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chrom. A.*, 1216:8096-8100.
- **CE. COMISIÓN EUROPEA.** 2009a. 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.** 2009b. Reglamento (UE) N° 37/2010. Relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. L 15: 1-72.
- **CE. COMISIÓN EUROPEA.** 2010. Directiva 2010/63/UE. Diario oficial de la Unión Europea. L 276: 33-79.F
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 2014. Resolución 551 exenta fija límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos para consumo humano. 04 octubre 1999.
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 2009. Ley 20.380 sobre protección de animales. 03 octubre 2009.
- **CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.** 2008. Manual de Normas de Bioseguridad. CONICYT. 2ª ed. Santiago, Chile.

- **CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGÜEN, D.; PIZARRO, N.; HIDALGO, H.; SAN MARTIN, B.** 2010. Depletion study of three formulations of flumequine in edible tissues and drug transfer into chicken feathers. *J. vet. Pharmacol. Therp.* 34(2): 168-175.
- **CORNEJO, J.; GONZÁLEZ, P.; ARAYA, C.; MADDALENO, A.; SAN MARTIN, B.** 2012. Transfer and depletion of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in feathers of treated broiler chickens. *Residues of veterinary drugs in food. Proceedings of the EuroResidue VII Conference, Egmond aan Zee, The Netherlands, 14-16 May, 2012.* Volume 1, 2 and 3 2012 pp. 683-688
- **CRISTOFANI, E.; ANTONINI, C.; TOVO, G.; FIORONI, L.; PIERSANTI, A.; GALARINI, R.** 2009. A confirmatory method for the determination of tetracyclines in muscle using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Analytica chimica acta* 637: 40-46.
- **DIVAKALA, K.; CHIBA, L; KAMALAKAR, R; RODNING, S; WELLES, E; CUMMINS, K; SWANN, J; CESPEDES F; PAYNE, R.** 2009. Amino acid supplementation of hydrolyzed feather meal diets for finisher pigs. *J. Anim. Sci.* 87:1270-1281.
- **EC. EUROPEAN COMMISSION.** 2002. Comisión 2002/657/EC of Journal Europ. Comm. 221: 8-36.
- **ECDC. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL.** 2009. Latest Europe-wide data on antibiotic resistance. [en línea]. <http://ecdc.europa.eu/en/aboutus/organisation/director%20speeches/111117_marc_sprenger_eaad-2011.pdf>. [consulta: 02-04-2015].
- **EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY.** 2005. Oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline: summary report. EMEA/MRL/023/95. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS. [en línea] <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015378.pdf> [consulta: 08-01-2014].
- **FAIRCHILD, A.; SMITH, J.; IDRIS, U.; LU, J.; SANCHEZ, S; PURVIS, L.; HOFACRE, C.; LEE, M.** 2005. Effects of Orally Administered Tetracycline on the Intestinal Community Structure of Chickens and on tet Determinant Carriage by Commensal Bacteria and *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(10):5865-5872.
- **FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2011. VICH GL49 validation of analytical methods used in residue depletion studies. 22 p.
- **GERIA, A.; TAJIRIAN, A.; KIHICZAK, G.; SCHWARTZ, R.** 2009. Minocycline-Induced Skin Pigmentation: An Update. *Acta Dermatovenerol Croat.* 17(2):123-126.
- **HEINRICH, K.; CHAN, D.; FUSSELL, R.; KAY, J.; SHARMAN, M.** 2013. Can the unauthorised use of ceftiofur be detected in poultry?. *Food Addit. Contam. Part A.* 30 (10): 1733-1738.
- **KHONG, S.P.; HAMMEL, Y. A.; GUY, F. A.** 2005. Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* 19: 493-502.
- **KOVALEV, A.; FILIPPOV, A.; GORB, S.** 2013. Unzipping bird feathers. *J. R Soc. Interface* 11: 20130988. 8 pág.

- **LOVE, D. C.; HALDEN, R. U.; DAVIS, M. F.; NACHMAN, K.E.** 2012. Feather meal: a previously unrecognized route for reentry into the food supply pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). *Environ. Sci. Technol.* 46: 3795-3802.
- **MARCU, A.; VACARU-OPRIȘ, I.; DUMITRESCU, G.; PETCULESCU, L.; MARCU, A.; NICULA, M.; PEȚI, I.; DRONCAI, D.; KELCIOV, B.; MARIȘ, C.** 2013. The influence of genetics on economic efficiency of broiler chickens growth. *Anim. Sci. Biotechnol.* 46 (2): 330-346.
- **MARTÍNEZ, J.; BAQUERO, F.** 2002. Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(4):647-679.
- **MEEKER, D.; HAMILTON, C.** 2006. An overview of the rendering industry. **In:** Meeker DL, editor. *Essentials of rendering: All About the animal By-product Industry.* Arlington, VA: National Renderers Association. 16 pág.
- **MUÑOZ, R.; CORNEJO, J.; MADDALENO, A.; ARAYA, C.; IRAGÜEN, D.; PIZARRO, N.; SAN MARTÍN, B.** 2014. Withdrawal Times of Oxytetracycline and Tylosin in Eggs of Laying Hens after Oral Administration. *J. Food Protect.* 77 (6): 1017–1021.
- **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2014. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. In: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 232 pág.
- **PATIÑO, N.; CAMPOS, E.** 2008. Actualidades farmacológicas: Tetraciclinas. *Rev. Fac. Med. UNAM.* Ciudad de México, México. 51(1): 29-32.
- **PRATS, C.; EL KORCHI, G.; GIRALT, M.; CRISTÒFOL, C.; PEÑA, J.; ZORRILLA, I; SABORIT, J; PÉREZ, B.** 2005. PK and PK/PD of doxycycline in drinking water after therapeutic use in pigs. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 28: 525-530.
- **RANG, H. P.; DALE, M. M; RITTER, J. M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G.** 2012. Sección 5: antibióticos. **In:** *Farmacología.* 7ª ed. Elsevier. pág. 629-630.
- **REVEURS, T.; DÍAZ R.** 1994. Método de determinación de tetraciclinas en tejido por HPLC-Diode - Array. Centro Nacional de Alimentación. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.
- **SANDILANDS, V.; SAVORY, J.; POWELL, K.** 2004. Preen gland function in layer fowls: factors affecting morphology and feather lipid levels. *Comp. Biochem. and Physiol. Part A (137):* 217–225.
- **SAN MARTIN, B.; CORNEJO, J.; IRAGÜEN, D.; HIDALGO, H.; ANADÓN, A.** 2007. Depletion study of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in edible tissues and feathers of white leghorn hens by liquid chromatography couple with tandem mass spectrometry. *J food protect.* 70 (8): 1952-1957.
- **SAN MARTIN, B.; GALLARDO, A.; MEDINA, P.** 2014. Manual de buenas prácticas en el uso de antimicrobianos y antiparasitarios en la salmonicultura chilena. *Farmavet,* Universidad de Chile-Sernapesca. 2ª ed. 52 pág.
- **SAG. SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO.** 2014. Sistema en línea de búsqueda de medicamentos veterinarios autorizados por el SAG. [en línea]. <http://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos_1.asp>. [consulta: 17-03-2014]
- **SWISHER, K.** 2008. Market Report 2008: Times were good, until prices collapsed. *Render Magazine;* 2009. April: 10-17.

ANEXOS



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

Santiago, 11 de Noviembre de 2013

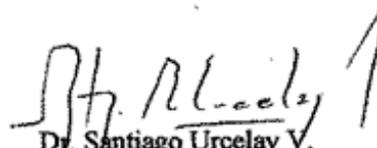
CERTIFICADO N° 03-2013

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

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


Dra. Tamara Tadich O.
Directora
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Urcelay Y.
Presidente
Comité de Bioética Animal

CERTIFICADO N° 31

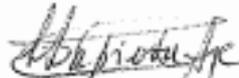
Santiago 28 de Octubre de 2013

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

En el proyecto se estipulan las siguientes medidas de Bioseguridad:

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

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


LISETTE LAPIERRE ACEVEDO
Coordinadora
Comité de Bioseguridad

