



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

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE
MEDICAMENTOS VETERINARIOS Y PESTICIDAS EN
PRODUCTOS PECUARIOS PRIMARIOS PROVENIENTES DE LA
AGRICULTURA FAMILIAR CAMPESINA**

Marianela Verónica Quintrel Curinao

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: JAVIERA CORNEJO KELLY

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

Proyecto “Diseño e implementación de un Plan Nacional de Cierre de Brechas de
Contaminantes Químicos en Productos Primarios”

Financiamiento Fondo de Inversión Estratégica (FIE) del Ministerio de Economía.

SANTIAGO, CHILE

2018



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE
MEDICAMENTOS VETERINARIOS Y PESTICIDAS EN
PRODUCTOS PECUARIOS PRIMARIOS PROVENIENTES DE LA
AGRICULTURA FAMILIAR CAMPESINA**

Marianela Verónica Quintrel Curinao

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

PROFESORA GUÍA : JAVIERA CORNEJO K.

PROFESORA CORRECTORA: PILAR OVIEDO H.

PROFESOR CORRECTOR : MARCO GALLEGUILLOS C.

SANTIAGO, CHILE

2018

MEMORIA DE TÍTULO

“EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS Y PESTICIDAS EN PRODUCTOS PECUARIOS PRIMARIOS PROVENIENTES DE LA AGRICULTURA FAMILIAR CAMPESINA”

“EVALUATION OF THE PRESENCE OF VETERINARY DRUGS AND PESTICIDES RESIDUES IN ANIMAL ORIGIN PRODUCTS FROM PEASANT FAMILY FARMERS”.

Marianela Verónica Quintrel Curinao *

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

Financiamiento

Proyecto ACHIPIA-FAVET Licitación N° 688535-7-LQ16 “Diseño e implementación de un Plan Nacional de Cierre de Brechas de Contaminantes Químicos en Productos Primarios” con financiamiento del Fondo de Inversión Estratégica (FIE) del Ministerio de Economía.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A los pequeños productores que participaron de este proyecto, por su tiempo, amabilidad y disposición durante el desarrollo de esta investigación, y por el esfuerzo que realizan día a día en sus producciones.

A los funcionarios municipales y de INDAP, que apoyaron y facilitaron la ejecución de las actividades en terreno.

A mi profesora guía, Javiera Cornejo, por su compromiso y dedicación con este proyecto.

A Ricardo Riquelme, Ekaterina Pokrant y Karina Yévenes por compartir su amistad y sabiduría, que fueron fundamentales para finalizar con éxito esta etapa.

A mis padres y hermano, por la paciencia y el cariño entregados durante toda mi formación profesional.

Nela

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. Plaguicidas.....	3
2. Medicamentos veterinarios.....	4
3. Situación nacional.....	4
4. Productos pecuarios primarios provenientes de la AFC en Chile.....	5
i. <i>Miel</i>	5
ii. <i>Leche</i>	6
iii. <i>Carne ovina</i>	6
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
1. Selección de muestras y productores.....	9
2. Localidades muestreadas.....	10
3. Metodología analítica.....	11
4. Análisis de resultados.....	13
5. Bioseguridad.....	13
RESULTADOS.....	14
a. Leche.....	14
i. <i>Pesticidas mediante LC-MS/MS y GC-MS/MS</i>	14
ii. <i>Antimicrobianos mediante Método de Cuatro Placas</i>	15
b. Carne ovina.....	18
i. <i>Antimicrobianos mediante Método de Cuatro Placas</i>	18
c. Miel.....	19
i. <i>Pesticidas mediante LC-MS/MS y GC-MS/MS</i>	19

ii. <i>Antimicrobianos mediante LC-MS/MS</i>	19
iii. <i>Amitraz mediante HPLC-MS/MS</i>	21
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26
ANEXOS.....	35
Anexo 1. Tabla de muestreo y productores, según análisis realizado(s).....	35
Anexo 2. Listado de plaguicidas para analizar por LABSER Ltda. según metodología.....	39
Anexo 3. Metodología para screening de residuos antimicrobianos	46
Anexo 4. Metodología analítica para la extracción de Sulfonamidas en Miel, por LC-MS/MS.....	52
Anexo 5. Metodología analítica para la extracción de Tetraciclinas en Miel, por LC-MS/MS.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Número total de muestras analizadas según rubro.....	10
TABLA 2. Número de muestras con residuos detectables de pesticidas en leche.....	14
TABLA 3. Residuos de pesticidas detectados en leche, por comuna, productor y analito.	14
TABLA 4. Muestras con residuos de antimicrobianos de leche, detectadas por familia de antimicrobianos.....	15
TABLA 5. Residuos detectables de antimicrobianos en leche, por comuna, productor y familia de antibióticos detectados.....	16
TABLA 6. Muestras con residuos de antimicrobianos en músculo ovino, detectadas por familia de antimicrobianos.....	18
TABLA 7. Resultados de análisis de antimicrobianos en músculo ovino, por comuna y familia de antibióticos detectados.....	19
TABLA 8. Residuos de antimicrobianos en miel según procedencia de las muestras.....	20

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Comunas muestreadas por región.....	11
--	----

RESUMEN

El uso de medicamentos veterinarios y pesticidas puede conducir a la presencia de residuos en alimentos. Sin embargo, la presencia de residuos en productos de pequeños agricultores ha sido poco documentada en nuestro país. La legislación regula su uso y establece límites máximos residuales (LMR) para sustancias químicas, en conformidad con el *Codex Alimentarius*. Sin embargo, los programas de vigilancia actuales dejan de lado a los alimentos provenientes de pequeños agricultores, que en su mayoría son comercializados en mercados locales. El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de medicamentos veterinarios y residuos de plaguicidas en productos de origen animal (carne ovina, leche y miel), de pequeños agricultores familiares de seis regiones de Chile. Se utilizó un método de *screening* antimicrobiano (método de cuatro placas), cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) para la detección y cuantificación de residuos químicos de medicamentos veterinarios (antimicrobianos y antiparasitarios). Por otro lado, la cromatografía líquida y de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS y LC-MS/MS) se utilizó para el análisis de plaguicidas. Se tomó un total de 122 muestras para realizar el análisis de laboratorio: miel (29 muestras de las regiones de Bio-Bio y Valparaíso), carne de cordero (14 muestras de la región de O'Higgins) y leche (79 muestras de Bio-Bio, Araucanía, Región de Los Ríos y Los Lagos). Para los pesticidas, 2 de las 15 (13,3%) muestras de leche contenían residuos de Permetrina, aunque las concentraciones detectadas estaban por debajo del LMR establecido en Chile. Mientras tanto, en las muestras de miel, no se detectaron residuos de plaguicidas. En el caso de los medicamentos veterinarios, 4 de 14 (28,6%) muestras de carne ovina y 11 de 79 (13,9%) muestras de leche mostraron evidencia de residuos antimicrobianos, correspondientes a las familias de las tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos y betalactámicos. De estas muestras, 1 muestra de carne ovina (7,1%) y 2 muestras de leche (2,5%) no cumplían los LMR establecidos para estas matrices. Para la miel, en 7 de las 29 muestras (24,1%) se detectaron trazas de tetraciclinas y sulfonamidas. Además, se analizó la presencia de Amitraz en muestras de miel; sin embargo, no se detectaron residuos de esta sustancia en esta matriz. Estos hallazgos muestran que existe

presencia de contaminantes químicos en algunos alimentos provenientes de la agricultura familiar campesina. Sin embargo, la mayoría de ellos cumplían con las normas, ya que las concentraciones encontradas no superaban los LMR establecidos. Este estudio proporciona una línea de base para reconsiderar la transferencia, adopción y conocimiento de buenas prácticas de producción (GMP) en la agricultura familiar campesina de Chile. Los datos recopilados permitirán mejorar las condiciones de producción, contribuyendo a los programas de vigilancia del desarrollo centrados en los productos primarios de los agricultores familiares campesinos.

Palabras clave: Pequeños agricultores, pesticidas, residuos antimicrobianos, leche, carne ovina, miel, screening, HPLC-MS/MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS

ABSTRACT

The use of veterinary drugs and pesticides may lead to the presence of residues in food products. However, presence of residues in products from small farmers has been poorly documented in our country. Legislation regulates their use and establishes maximum residual limits (MRLs) for chemical substances, in accordance with *Codex Alimentarius*. Nevertheless, current surveillance programs leave aside foods from small farmers, mostly traded in local markets. The aim of the present study was to assess the presence of veterinary drugs and pesticides residues in products of animal origin (lamb meat, milk and honey), from small family farmers of six regions of Chile. Antimicrobial screening method (four-plate test), liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) were used for the detection and quantification of chemical residues of veterinary drugs (antimicrobials and antiparasitics). On the other hand, gas and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS and LC-MS/MS) was used for the analysis of pesticides. A total of 122 samples were taken to perform the laboratory analysis: honey (29 samples from Bio-Bio and Valparaíso regions), lamb meat (14 samples from O'Higgins region), and milk (79 samples from Bio-Bio, Araucanía, Los Ríos and Los Lagos regions). For pesticides, 2 of 15 (13.3%) milk samples contained Permethrin residues, although detected concentrations were under MRL established in Chile. Meanwhile in honey samples, none pesticides residues were detected. In the case of veterinary drugs, 4 of 14 (28.6%) lamb meat samples and 11 of 79 (13.9%) milk samples showed evidence of antimicrobial residues, corresponding to tetracyclines, macrolides, aminoglycosides and beta-lactams families. From these samples, 1 lamb meat sample (7.1%) and 2 milk samples (2.5%) were non-compliant exceeding the established MRLs for these matrices. For honey, in 7 of the 29 samples (24.1%) traces of tetracyclines and sulfonamides were detected. Additionally, amitraz was analyzed in honey samples; however, no residues of this substance were detected in this matrix. These findings show that there is presence of chemical contaminants in some food products from small family farmers. However, most of them were compliant, as concentrations found did not surpass established MRL. This study provides a baseline to reconsider the transfer, adoption and awareness of good management practices (GMP) in small family farming in Chile. Collected data will allow improving production

conditions, contributing to the development surveillance programs focused in primary products from peasant family farmers.

Keywords: Small farmers, pesticides, antimicrobial residues, milk, lamb meat, honey, screening, HPLC-MS/MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS.

INTRODUCCIÓN

La Agricultura Familiar Campesina (AFC) es definida por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como “todas las actividades agrícolas de base familiar que están vinculadas a varias áreas del desarrollo rural. La agricultura familiar es una forma de organizar la producción agrícola y silvícola, así como la pesca, el pastoreo y la acuicultura, que es gestionada y dirigida por una familia y que en su mayor parte depende de la mano de obra familiar, tanto de mujeres como de hombres” (FAO, 2014). En Chile, este tipo de producciones, son competencia del Instituto de Desarrollo Agropecuario (INDAP). Este organismo define pequeño/a productor/a como “la persona natural que explota una superficie no superior a las 12 Hectáreas de Riego Básico, cuyos activos no superen el equivalente a 3.500 Unidades de Fomento (UF), que su ingreso provenga principalmente de la explotación agrícola, y que trabaje directamente la tierra, cualquiera sea su régimen de tenencia” (Chile, 1990a). A pesar de que la agricultura representa un porcentaje menor a otras fuentes de ingreso en los hogares rurales, su participación en los mercados locales son elementos importantes para su desarrollo (Contreras *et al.*, 2014).

El uso de medicamentos veterinarios y agroquímicos en la producción de alimentos, con fines terapéuticos o para la protección de cultivos, es una práctica habitual en el ámbito de la AFC. Sin embargo, se desconoce la magnitud de la aplicación de estas sustancias, puesto que este tipo de producciones queda fuera de los programas de vigilancia oficiales llevados a cabo por las autoridades nacionales. Considerando que en su mayoría los canales de comercialización corresponden a mercados locales y que muchos de los productores son proveedores de la agroindustria nacional, se hace necesario disminuir brechas de inocuidad en materia de contaminantes químicos, ya que esto genera incertidumbre sobre las condiciones en que se producen los alimentos en nuestro país, pudiendo tener un impacto negativo en los consumidores y en los mercados potenciales.

Los residuos agroquímicos y de antibióticos en alimentos constituyen un riesgo para la salud humana y su presencia puede provocar reacciones alérgicas, comprometer el sistema inmune, y generar cepas bacterianas patógenas resistentes a fármacos (Chen y

Fang, 2011; Ensley, 2016). Sin embargo, la presencia de estos residuos en alimentos de consumo local en Chile está poco documentada.

La AFC es considerada la forma predominante en la producción de alimentos a nivel mundial (FAO, 2014), y por ello es indispensable obtener información acerca de las condiciones en que se lleva a cabo esta actividad. Esto permitiría tener bases concretas para evaluar y mejorar sus procesos en materia de inocuidad, con el fin de garantizar alimentos libres de contaminantes a los consumidores, aumentando la posibilidad de estos productores de participar en mercados con altos estándares de calidad e inocuidad, contribuyendo a mejorar sus perspectivas de desarrollo.

En este contexto, el objetivo de este proyecto de memoria de título es establecer una línea base de contaminantes químicos en productos primarios de origen animal, provenientes de la AFC, entre los que se incluyen miel, lácteos y carne ovina. Éste se enmarca dentro del proyecto “Diseño e implementación de un Plan Nacional de Cierre de Brechas de Contaminantes Químicos en Productos Primarios”, el cual es parte del “Programa Transforma Alimentos” de la Corporación de Fomento de la Producción (CORFO), el "Programa de Altos Estándares para MIPYMES Alimentarias" de la Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria (ACHIPIA), y de las "Iniciativas Habilitantes en Inocuidad y Calidad Alimentaria para la Innovación y Competitividad en Alimentos Saludables" del Fondo de Inversión Estratégica (FIE) del Ministerio de Economía.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La contaminación química de los alimentos incluye sustancias tales como residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas; contaminantes ambientales, como metales pesados; contaminantes orgánicos persistentes y toxinas naturales; y contaminantes resultado de la cocción, procesamiento o envasado (Cooper *et al.*, 2015). En general, los residuos de pesticidas, presentes en productos pecuarios, provienen de la exposición involuntaria de los animales a los agroquímicos aplicados a los cultivos para el control de plagas. En cambio, los residuos de medicamentos veterinarios se deben al uso intencional de éstos con fines terapéuticos o productivos (Kim, 2012).

1. Plaguicidas

La FAO define plaguicida como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte” (FAO, 2002). Sin embargo, su uso implica riesgos, debido a que son potencialmente tóxicos para los seres humanos, y una exposición prolongada a dosis bajas de estas sustancias se ha asociado a daños en la salud, como inmunosupresión, alteraciones hormonales, anormalidades reproductivas, cáncer y daño cognitivo (Ensley, 2016). En este contexto, la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas (JMPR por sus siglas en inglés), cuyo propósito es armonizar el requerimiento y la evaluación de riesgo de los residuos de plaguicidas, y la Comisión del Códex sobre Residuos de Plaguicidas (CCPR) participan en la determinación de los Límites Máximos Residuales (LMR) para estas sustancias en alimentos. Dentro de éstos, se entiende como Límite Máximo para

Residuos de Plaguicida (LMRP) a la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/kg), recomendada por la Comisión del Codex *Alimentarius*, para que se permita legalmente su uso en la superficie o la parte interna de productos alimenticios para consumo humano y de piensos (OMS 2008; FAO, 2017).

2. Medicamentos Veterinarios

Se consideran residuos de medicamentos veterinarios los compuestos de origen y/o sus metabolitos presentes en cualquier porción comestible de un producto animal, así como los residuos de impurezas relacionados con el medicamento veterinario correspondiente (CAC, 2003). Dependiendo del fármaco, respetando las Buenas Prácticas, los riesgos son mínimos después de consumir cualquier tejido comestible. Sin embargo, como consecuencia de su uso indebido, pueden aparecer niveles de residuos más altos en productos comestibles de animales (Moreno y Lanusse, 2017). En particular, los residuos veterinarios más detectados en alimentos son los antibióticos y su presencia constituye un riesgo para la salud humana. Pueden, entre otros efectos, provocar reacciones alérgicas y/o comprometer el sistema inmune, y su presencia en dosis subterapéuticas en alimentos durante largos períodos de tiempo contribuye al origen de cepas bacterianas patógenas resistentes a fármacos. Además, el destino de estos compuestos en el medio ambiente también ha sido reconocido como un problema emergente (OMS, 2014; Chen y Fang, 2011). En este sentido, la Comisión del Codex *Alimentarius* establece Límites Máximos para Residuos de Medicamentos Veterinarios (LMRMV), entendiéndose éstos como la “concentración máxima de residuos resultante del uso de un medicamento veterinario (expresada en mg/kg o mg/kg del peso del producto fresco) que se recomienda como legalmente permisible o se reconoce como aceptable dentro de un alimento o en la superficie del mismo” (OMS, 2008; CAC, 2015).

3. Situación Nacional

El uso de plaguicidas en Chile está regulado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) a través de la Resolución 1557 de 2014 (Chile, 2014a). Por otro lado, la Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria (ACHIPIA) coordina el “Programa Nacional Integrado de Plaguicidas de uso Agrícola”, en el que participan los servicios públicos con competencia en la materia, como el SAG, el Ministerio de Salud (MINSAL) y el Servicio

Nacional de Pesca (SERNAPESCA), abarcando aspectos normativos y regulatorios, Buenas Prácticas Agrícolas, vigilancia y monitoreo de residuos, planes de control y vigilancia de uso de plaguicidas, y programas de capacitación y difusión (ACHIPIA, 2014). Además, cabe destacar que Chile adhiere a una serie de acuerdos internacionales en esta materia, entre ellos, el Código Internacional de Conducta para el Manejo de Plaguicidas de la FAO (Chile, 2005a; Chile 2005b; Chile, 1990b; Chile, 1992). Para la verificación del cumplimiento de estas normativas, tanto el SAG como el MINSAL realizan programas de monitoreo, vigilancia o control de residuos en alimentos (RIAL, 2015). Entre los programas de vigilancia del MINSAL, está el Programa Nacional de Peligros Químicos (metales pesados, plaguicidas y dioxinas), mientras que el SAG con el Programa Control de Residuos Pecuarios (PCR) que trabaja en la detección de contaminantes (pesticidas, metales pesados, micotoxinas y dioxinas) en ovinos, bovinos, cerdos, aves, leche y miel (RIAL, 2015). Además, en la Resolución Exenta 33 del MINSAL se establecen los LMRs para plaguicidas en alimentos (Chile, 2010).

Para el caso de los medicamentos veterinarios, la Resolución 551 del MINSAL (Chile, 2014b) establece los LMRs de estos productos en el país. Dentro del Programa de Vigilancia de Residuos de Medicamentos de Uso Veterinario del MINSAL, durante los años 2012 y 2013 se analizaron alimentos, incluyendo leche, carne de cerdo y bovino, en los que en el 10,4% de las muestras se identificó la presencia estos residuos, y el 4,8% del total de presentó una concentración por sobre los LMR establecidos (ISP, 2014). Por su parte, el PCR del SAG también contempla el análisis de sustancias prohibidas o con efecto anabolizante, y sustancias terapéuticas (antimicrobianos, antihelmínticos, anticoccidiales, piretroides, carbamatos, tranquilizantes y antiinflamatorios) (SAG, 2017a). Sin embargo, pese a estos antecedentes, los productos provenientes de la AFC generalmente quedan fuera de los programas de vigilancia de residuos químicos mencionados. La importancia del monitoreo a este nivel radica en que se trata de alimentos comercializados en mercados locales y destinados a consumo nacional.

4. Productos pecuarios primarios provenientes de la AFC en Chile

i. Miel

La miel destinada a mercado interno es en su mayoría aportada por pequeños y medianos apicultores, comercializándose alrededor de dos tercios de ella en el comercio formal, mientras que el mercado informal absorbe el tercio restante (ODEPA, 2015). Sin embargo, pese a ser un alimento considerado saludable y nutritivo, ha sido foco de alerta alimentaria, debido a la presencia de sustancias químicas peligrosas, como pesticidas, herbicidas, antibióticos y metales pesados en todo el mundo (Al-Waili *et al.*, 2012). La *European Food Safety Authority* (EFSA) en su reporte de monitoreo para residuos veterinarios en productos pecuarios para el 2014, declaró que la mayor parte de las muestras no conformes para antibacterianos se encontró en mieles (EFSA, 2015). El origen de estos residuos son principalmente tratamientos contra parásitos de abejas y enfermedades bacterianas (Juan-Borrás *et al.*, 2014).

ii. Leche

En este rubro, la AFC está representada por pequeños grupos de productores asociados, centros de acopio lecheros y proveedores individuales de plantas receptoras, quienes han experimentado dificultades productivas. Entre las razones que explican tal condición, se encuentran las deficiencias en materia de calidad de la leche procedentes de las pequeñas explotaciones y que se transmite en los volúmenes globales que se entregan a las plantas lecheras (INDAP, 2007a). Prácticas inadecuadas de manejo, tales como registros erróneos, fallas en la identificación de las vacas tratadas, o no seguir las instrucciones de las etiquetas de los fármacos, se han atribuido como posibles causas para muestras de leche positivas a residuos veterinarios en otros países (FDA, 2015).

iii. Carne ovina

La explotación ovina de la AFC se encuentra ubicada en el secano y la precordillera de la zona centro-sur, y en sectores de la cordillera de la costa y precordillera de la zona sur. Por su ubicación marginal y dispersión, históricamente se ha desenvuelto en bajos niveles de productividad (INDAP, 2007b). Ésta se desarrolla con muchos rebaños de pequeño tamaño, asociados a sistemas pastoriles, presentando marcada estacionalidad en el faenamiento (Hervé, 2013), y destinando parte importante de su producción al autoconsumo y a la venta ocasional en predio (ODEPA, 2013). En algunas regiones, se han identificado brechas en el uso de medicamentos veterinarios, en donde no se respetan los periodos de carencia, por

desconocimiento y porque el canal de comercialización de los pequeños productores generalmente no incluye a la industria (INDAP, 2007c).

5. Técnicas para la detección de residuos

El análisis de estos contaminantes químicos se hace una tarea difícil debido al gran número de analitos existentes, los niveles extremadamente bajos a los que se necesita analizar un residuo, y a la complejidad de las matrices alimentarias (Chen y Fang, 2011). Recientemente, se han desarrollado diversas tecnologías para el análisis de residuos en los alimentos, desde métodos de *screening* hasta métodos confirmatorios. Los métodos de detección rápida incluyen los ensayos microbiológicos (sencillos de realizar a gran escala y con un espectro de sensibilidad no específico). Los métodos de *screening* microbiológico utilizan técnicas de difusión de la sustancia antimicrobiana en un agar que contiene microorganismos sensibles a ella. Éstos son útiles para programas de control de residuos, debido a su gran capacidad muestral y bajo costo. Además, facilitan el control y la reducción de muestras que deben ser confirmadas posteriormente con análisis más costosos y complejos (Shankar *et al.*, 2010). Los métodos de confirmación son principalmente en base a cromatografía líquida, siendo hoy en día, la principal técnica de confirmación de residuos de antibióticos en los alimentos, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Pese a sus ventajas, esta técnica tiene el inconveniente de que la muestra necesita de un tratamiento previo, encareciendo sus costos (Chen y Fang, 2011). Para plaguicidas, actualmente la espectrometría de masas es una técnica clave de detección, debido a su capacidad de multianálisis, sensibilidad, selectividad y potencial para el análisis químico cualitativo (Botitsi *et al.*, 2017). Los datos obtenidos mediante esta metodología pueden ofrecer pruebas definitivas; y cuando se dispone del equipo necesario, es la técnica de confirmación preferible. Además, puede utilizarse para el cribado de residuos. Generalmente este análisis se aplica conjuntamente a una técnica cromatográfica de separación, con el fin de obtener simultáneamente datos sobre el tiempo de retención, la relación masa/carga en los iones y la abundancia de los mismos (CAC, 2010a). La potencia analítica de la cromatografía combinada de gas o de cromatografía líquida (GC-MS o LC-MS) en análisis de trazas orgánicas ha demostrado que son herramientas predominantes en el campo del análisis de plaguicidas (Botitsi *et al.*, 2017).

HIPOTESIS

“Alimentos de origen animal provenientes de la Agricultura Familiar Campesina presentan residuos sobre los LMR establecidos para pesticidas y medicamentos veterinarios”.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de residuos de plaguicidas y medicamentos veterinarios en productos pecuarios primarios provenientes de la Agricultura Familiar Campesina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar pesticidas presentes en miel y leche provenientes de pequeños productores.
2. Determinar la presencia de residuos de antibióticos en miel, leche y carne ovina provenientes de pequeños productores.
3. Categorizar las muestras de acuerdo a su origen geográfico y los residuos detectados en ellas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de muestras y productores.

El presente estudio se realizó tomando muestras en terreno de los productores y productos incluidos en el Plan Nacional de Cierre de Brechas de Contaminantes Químicos, entre ellos: miel (Región del Bío Bío y Valparaíso), lácteos (Regiones del Bío Bío, Araucanía, Los Ríos y Los Lagos), y carne ovina (Región del Libertador Bernardo O'Higgins), establecidos en la Resolución Exenta N° 555/2016 del Ministerio de Agricultura (Chile, 2016), que aprueba las bases para dicho proyecto. Estos productos serán obtenidos de usuarios de INDAP, en algunos de sus Servicios de Asesoría Técnica (SAT) o Programas de Desarrollo Local (PRODESAL). La selección de productos a abordar fue establecida por INDAP en base a los rubros y territorios en los tienen más actividad.

Se determinó un total de 122 muestras, de acuerdo a la metodología utilizada por Aguilar *et al.*, en base al número total de productores usuarios de los mencionados servicios de INDAP ($N=6823$), distribuidos en: 1706 usuarios SAT y 5117 usuarios PRODESAL, utilizando la siguiente fórmula (Aguilar *et al.*, 2007):

$$n = \frac{NZ^2p(1-p)}{d^2(N-1) + Z^2p(1-p)}$$

Para ello se utilizaron los siguientes parámetros: precisión (d) = 0,076; confiabilidad (Z) = 1,96; proporción (p) = 0,25; diferencial de p ($q=1-p$) = 0,75.

Según lo anterior, el análisis fue calculado para 16 mieles listas para consumo, 25 muestras de músculo ovino y 81 muestras de leche cruda. La distribución geográfica del muestreo fue determinada en base a la disponibilidad de pequeños productores por región y localidad, según la información proporcionada por INDAP. Sin embargo, debido a condiciones ajenas al estudio, como factores climáticos y emergencias en algunos lugares de muestreo, entre otros, el análisis final de residuos fue realizado de acuerdo a la Tabla 1, no afectando el total de 122 muestras.

Tabla 1. Número total de muestras analizadas según rubro.

Rubro	Nº de muestras
Apícola	29
Carne ovina	14
Leche	79
Total	122

Las muestras fueron identificadas mediante una letra, por productor y análisis realizado, los cuales se encuentran detallados en el Anexo 1.

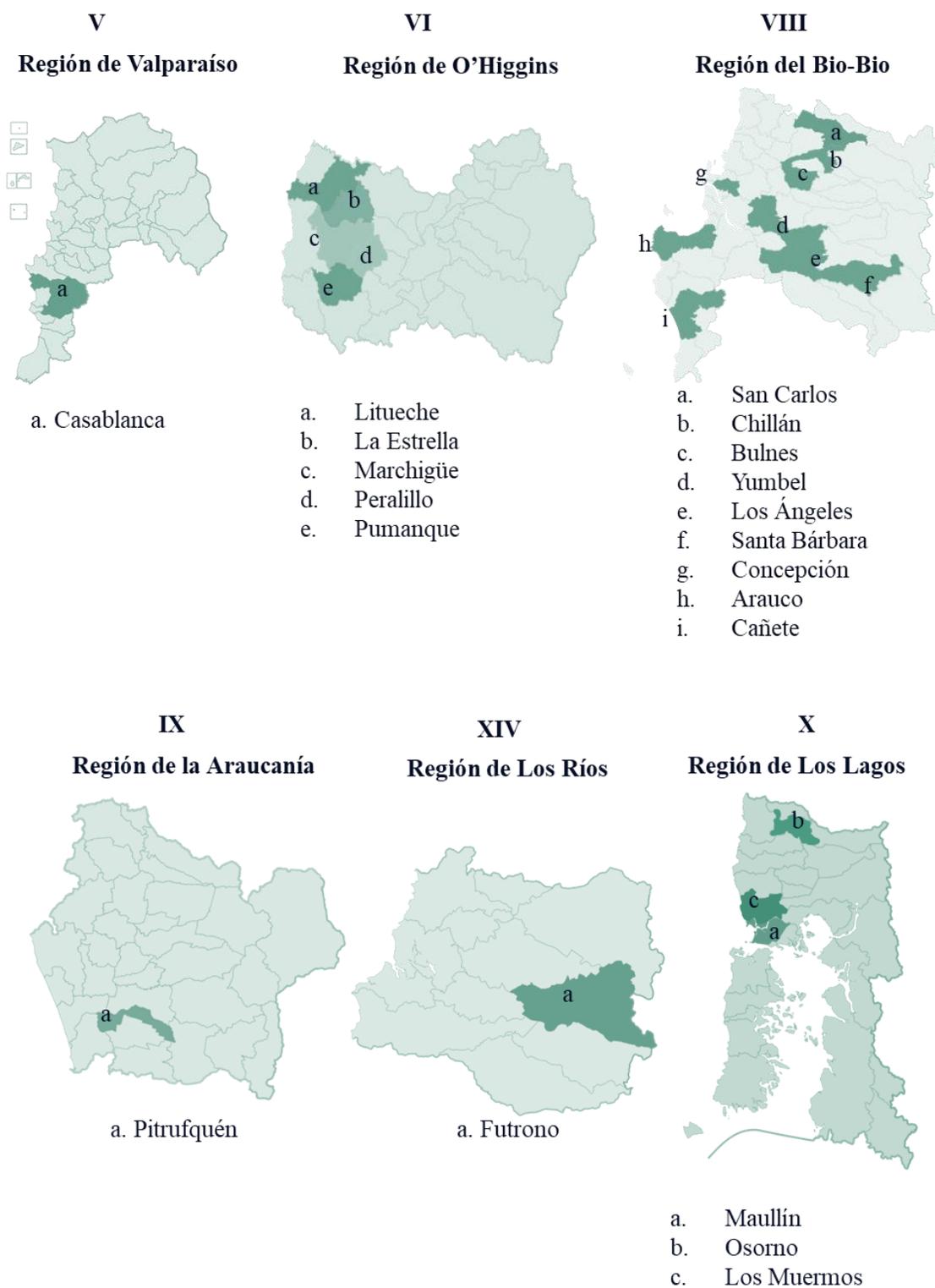
En el caso de los plaguicidas, los muestreos se realizaron tomando las directivas del Codex, “Métodos de Muestreo Recomendados para la Determinación de Residuos de Plaguicidas a Efectos del Cumplimiento de los LMR” CAC/IL GLC 33-1999 (CAC, 2010). Para el muestreo de residuos de medicamentos veterinarios y contaminantes en productos pecuarios, se utilizaron también las “Directrices para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a la producción de alimentos” CAC/GL 71-2009 (CAC, 2014). Además, se tomó como referencia el Programa de Control de Residuos (PCR) del SAG.

Según lo anterior, se determinó como Unidad Muestral el equivalente a: 0,5 litro (l) de leche fresca; 1 kilogramo (kg) de carne músculo ovina (músculo) y 1 kilogramo (kg) de miel.

2. Localidades muestreadas por rubro

Los muestreos se realizaron en un total de 20 comunas, distribuidas en 6 regiones del país (ver Figura 1) para los rubros miel (Región del Bío-Bío y Valparaíso), lácteos (Regiones del Bío-Bío, Araucanía, Los Ríos y Los Lagos), y carne ovina (Región del Libertador Bernardo O’Higgins).

Figura 1. Comunas muestreadas por región.



3. Metodología Analítica.

Para la determinación de residuos de agroquímicos en miel y leche, un porcentaje de las muestras fueron enviadas a un laboratorio externo (LABSER Ltda.), acreditado ISO/IEC 17025:2005, para un posterior análisis multiresidual, utilizando técnicas de cromatografía gaseosa y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS o LC-MS/MS). Dicho laboratorio fue considerado ya que posee los métodos y el equipamiento necesario para dicho análisis, y se encuentra además dentro de los Programas Oficiales de Control de Plaguicidas del SAG. Las sustancias que se evaluaron mediante estas metodologías se detallan en el Anexo 2.

Adicionalmente, una fracción de las muestras de miel fue analizada para detectar la presencia de residuos del antiparasitario Amitraz. Para ello, fueron enviadas al laboratorio Analab Chile S.A, acreditado ISO/IEC 17025:2005, el cual tiene implementado una técnica de cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (HPLC-MS/MS) para dicho propósito.

En el caso de la determinación de residuos de medicamentos veterinarios en leche y músculo ovino, las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos (LIA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, reconocido como laboratorio de verificación para muestras microbiológicas según el Decreto Supremo 707/99 del MINSAL y acreditado bajo la norma ISO 17025:2005. En él se utilizó un método de *screening* antimicrobiano para las familias de antibióticos Aminoglucósidos, Betalactámicos, Macrólidos y Tetraciclinas. Para la verificación de esta metodología, se utilizó una muestra blanco, que corresponde a una muestra sin antibiótico, una muestra fortificada a una concentración conocida de antibiótico, y un control con las drogas puras utilizadas, representativas para la familia de antibióticos (en este caso, Amikacina, Ampicilina, Eritromicina y Oxitetraciclina respectivamente). El detalle de las etapas de esta metodología se encuentra en el Anexo 3.

En las muestras de miel se determinó la presencia de residuos de Tetraciclinas y Sulfonamidas, siendo enviadas al Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, acreditado bajo la norma ISO 17025:2005, en donde se utilizaron métodos de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS), utilizando un equipo API 5500 de AB Sciex. Estos métodos se encuentran detallados en los Anexos 4 y 5. Para la verificación de esta metodología, también se utilizó una muestra blanco, que corresponde a una muestra libre de antibiótico, dos controles fortificados a una concentración conocida de antibiótico, y una curva de calibración en matriz fortificada con 5 concentraciones determinadas del antibiótico para la cuantificación del analito.

4. Análisis de resultados

Con los resultados obtenidos en la etapa anterior, se realizó un análisis descriptivo para determinar el comportamiento de los datos, a partir de la información de la matriz usada, localidad de origen, analito buscado, la concentración detectada, y si superan o no los Límites Máximos Residuales (LMRs) establecidos.

5. Bioseguridad

Se tomaron en consideración las medidas de bioseguridad para el trabajo en laboratorio con muestras, equipos y agentes químicos sugeridas por el Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT (CONICYT, 2008).

RESULTADOS

A continuación, se presenta el detalle de los resultados por matriz, según residuos de pesticidas y antimicrobianos detectados, además del origen geográfico de las muestras, según lo establecido en los objetivos específicos del presente estudio.

a. Leche

i. *Pesticidas mediante LC-MS/MS y GC-MS/MS*

Se seleccionaron 15 de las 29 muestras de leche para detectar residuos de pesticidas. De ellas, se detectó un analito, correspondiente al insecticida y acaricida Permetrina, en 2 muestras, correspondiendo a un 13,3% del total de muestras de leche y a un 8% del total de muestras que se fueron analizadas para pesticidas, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Número de muestras con residuos detectables de pesticidas en leche.

Matriz	<i>n</i>	Nº de muestras con residuos detectables (%)	Analito
Leche	15	2 (13,3)	Permetrina

Las muestras que presentaron residuos de este analito pertenecieron a las comunas de Pitrufquén (Región de la Araucanía) y Maullín (Región de Los Lagos), detectándose concentraciones de 0,013 mg/kg y 0,014 mg/kg respectivamente (ver Tabla 3). Estos resultados no superan el Límite Máximo Residual (LMR) de 0,1 mg/kg establecido en la Resolución Exenta 33/2010 del Ministerio de Salud (Chile, 2010).

Tabla 3. Residuos de pesticidas detectados en leche, por comuna, productor y analito.

Matriz	Región	Comuna	Productor	Número de Analitos Encontrados	Analito	Resultado (mg/kg)	LMR Chile*
Leche	Bio-Bio	Los Ángeles	<i>t</i>	0	-	-	-
		Bulnes	<i>j</i>	0	-	-	-
		Yumbel	<i>w</i>	0	-	-	-
		Arauco	<i>a</i>	0	-	-	-
		Cañete	<i>m</i>	0	-	-	-

	Concepción	<i>o</i>	0	-	-	-
Araucanía	Pitrufoquén	<i>ab</i>	0	-	-	-
		<i>ag</i>	0	-	-	-
		<i>aj</i>	1	Permetrina	0,013	0,1
Los Ríos	Futroneo	<i>an</i>	0	-	-	-
		<i>añ</i>	1	Permetrina	0,014	0,1
Los Lagos	Mauullín	<i>ao</i>	0	-	-	-
		<i>ar</i>	0	-	-	-
		<i>at</i>	0	-	-	-
		<i>av</i>	0	-	-	-
		Total	25	2		

*LMRs establecidos en Resolución Exenta 33/2010 del Ministerio de Salud (Chile, 2010).

ii. *Antimicrobianos mediante Método de Cuatro Placas.*

En la Tabla 4, se observa que para un total de 79 muestras de leche analizadas, se identificaron residuos de las cuatro familias de antimicrobianos estudiadas en 11 muestras (13,9 %). De las muestras de leche positivas, una de ellas tenía residuos detectables de Tetraciclina, una de Macrólidos, 8 muestras fueron positivas a Aminoglucósidos y 1 a residuos de Betalactámicos.

Tabla 4. Muestras con residuos de antimicrobianos de leche, detectadas por familia de antimicrobianos.

Matriz	<i>n</i>	Nº de muestras con residuos detectables (%)	Nº de muestras por tipo de antimicrobiano			
			T	M	A	B
Leche	79	11 (13,9)	1	1	8	1

T: Tetraciclinas; M: Macrólidos; A: Aminoglucósidos; B: Betalactámicos.

La muestra que presentó residuos detectables de tetraciclinas era originaria de la comuna de Arauco (Región del Bio-Bio), superando el LMR de 100 µg/kg de residuos de tetraciclinas en leche establecido en la Resolución Exenta 551/2014 del MINSAL, mientras que la muestra positiva a macrólidos perteneció a la comuna de Los Muermos (Región de Los Lagos). Las muestras de leche con residuos detectables de Aminoglucósidos correspondieron a las comunas de Osorno y Los Muermos (5 y 3 muestras,

respectivamente), ambas en la Región de Los Lagos. Cabe destacar que la muestra perteneciente al productor identificado como *bt* de la comuna de Los Muermos, presentó residuos de macrólidos y aminoglucósidos, superando el LMR de 200 µg/kg de residuos de esta última familia de antimicrobianos (Chile, 2014b). Lo anterior se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5. Residuos detectables de antimicrobianos en leche, por comuna, productor y familia de antibióticos detectados.

Matriz	Región	Comuna	Productor	Familia de Antimicrobianos			
				T	M	A	B
Leche	Bío-Bío	Arauco	<i>a</i>	-	-	-	-
			<i>b</i>	-	-	-	-
			<i>c</i>	-	-	-	-
			<i>d</i>	-	-	-	-
			<i>e</i>	-	-	-	-
			<i>f</i>	+*	-	-	-
			<i>g</i>	-	-	-	-
			<i>h</i>	-	-	-	-
		Bulnes	<i>i</i>	-	-	-	-
			<i>j</i>	-	-	-	-
			<i>k</i>	-	-	-	-
		Cañete	<i>l</i>	-	-	-	-
			<i>m</i>	-	-	-	-
			<i>n</i>	-	-	-	-
			<i>ñ</i>	-	-	-	-
		Concepción	<i>o</i>	-	-	-	-
			<i>p</i>	-	-	-	-
			<i>q</i>	-	-	-	-
			<i>r</i>	-	-	-	-
		Los Ángeles	<i>s</i>	-	-	-	-
			<i>t</i>	-	-	-	-
			<i>u</i>	-	-	-	-
		Santa Bárbara	<i>v</i>	-	-	-	-
		Yumbel	<i>w</i>	-	-	-	-
			<i>x</i>	-	-	-	-
			<i>y</i>	-	-	-	-
			<i>z</i>	-	-	-	-
		Araucanía	Pitrufquén	<i>aa</i>	-	-	-

		<i>ab</i>	-	-	-	-
		<i>ac</i>	-	-	-	-
		<i>ad</i>	-	-	-	-
		<i>ae</i>	-	-	-	-
		<i>af</i>	-	-	-	-
		<i>ag</i>	-	-	-	-
		<i>ah</i>	-	-	-	-
		<i>ai</i>	-	-	-	-
		<i>aj</i>	-	-	-	-
		<i>ak</i>	-	-	-	-
Los Ríos	Futrono	<i>al</i>	-	-	-	-
	Lago Ranco	<i>am</i>	-	-	-	-
	Río Bueno	<i>an</i>	-	-	-	-
Los Lagos	Mauullín	<i>añ</i>	-	-	-	-
		<i>ao</i>	-	-	-	-
		<i>ap</i>	-	-	-	-
		<i>aq</i>	-	-	-	-
		<i>ar</i>	-	-	-	-
		<i>as</i>	-	-	-	-
		<i>at</i>	-	-	-	-
		<i>au</i>	-	-	-	-
		<i>av</i>	-	-	-	-
		<i>aw</i>	-	-	-	-
	Osorno	<i>ax</i>	-	-	+	-
		<i>ay</i>	-	-	+	-
		<i>az</i>	-	-	-	-
		<i>ba</i>	-	-	-	-
		<i>bb</i>	-	-	+	-
		<i>bc</i>	-	-	-	-
		<i>bd</i>	-	-	-	-
		<i>be</i>	-	-	+	-
		<i>bf</i>	-	-	+	-
		<i>bg</i>	-	-	-	-
		<i>bh</i>	-	-	-	-
		<i>bi</i>	-	-	-	-
		<i>bj</i>	-	-	-	-
		<i>bk</i>	-	-	-	-
		<i>bl</i>	-	-	-	-
		<i>bm</i>	-	-	-	-

	<i>bn</i>	-	-	-	-
Los Muermos	<i>bñ</i>	-	-	+	-
	<i>bo</i>	-	-	+	-
	<i>bp</i>	-	-	-	-
	<i>bq</i>	-	-	-	+
	<i>br</i>	-	-	-	-
	<i>bs</i>	-	-	-	-
	<i>bt</i>	-	+	+**	-
	<i>bu</i>	-	-	-	-
	<i>bv</i>	-	-	-	-
	<i>bw</i>	-	-	-	-
	<i>bx</i>	-	-	-	-
Total	79	1	1	8	1

+: muestra con residuos detectables. T: Tetraciclinas; M: Macrólidos; A: Aminoglucósidos; B: Betalactámicos. *Muestra supera LMR de 100 µg/kg de residuos de Tetraciclinas en leche, establecido en Resolución Exenta 551/2014 del MINSAL. **Muestra supera LMR de 200 µg/kg de residuos de Aminoglucósidos en leche, establecido en Resolución Exenta 551/2014 del MINSAL (Chile, 2014b).

b. Carne Ovina

i. Antimicrobianos mediante Método de Cuatro Placas

En la Tabla 6, se observa que para un total de 14 muestras de músculo ovino analizadas, se identificaron residuos de las cuatro familias de antimicrobianos estudiadas en 4 muestras (28,6 %).

Tabla 6. Muestras con residuos de antimicrobianos en músculo ovino, detectadas por familia de antimicrobianos.

Matriz	<i>n</i>	Nº de muestras con residuos detectables (%)	Nº de muestras por tipo de antimicrobiano			
			T	M	A	B
Músculo ovino	14	4 (28,6)	1	3	-	-

T: Tetraciclinas; M: Macrólidos; A: Aminoglucósidos; B: Betalactámicos.

La muestra que presentó residuos de antimicrobianos de la familia de las tetraciclinas, proveniente de la comuna de Peralillo, en la Región de O'Higgins, sobrepasó el LMR de 200 µg/kg de alimento, establecido en Resolución Exenta 551/2014 del MINSAL para esa matriz (Chile, 2014b) (ver Tabla 7). Por otro lado, se detectaron residuos de macrólidos en 3 muestras de carne ovina, que no superaron los LMRs establecidos para dicha matriz.

Tabla 7. Resultados de análisis de antimicrobianos en músculo ovino, por comuna y familia de antibióticos detectados.

Matriz	Región	Comuna	Productor	Familia de Antimicrobianos			
				T	M	A	B
Músculo Ovino	O'Higgins	La Estrella	<i>a</i>	-	-	-	-
		Litueche	<i>b</i>	-	-	-	-
			<i>c</i>	-	+	-	-
		Marchigüe	<i>d</i>	-	+	-	-
			<i>e</i>	-	-	-	-
		Peralillo	<i>f</i>	+*	-	-	-
		Pumanque	<i>g</i>	-	-	-	-
			<i>h</i>	-	-	-	-
			<i>i</i>	-	-	-	-
			<i>j</i>	-	+	-	-
			<i>k</i>	-	-	-	-
			<i>l</i>	-	-	-	-
			<i>m</i>	-	-	-	-
			<i>n</i>	-	-	-	-
Total			14	1	3	0	0

T: Tetraciclinas; M: Macrólidos; A: Aminoglucósidos; B: Betalactámicos. +: muestra con residuos detectables; *Muestra supera LMR de 200 µg/kg de residuos de Tetraciclinas en músculo, establecido en Resolución Exenta 551/2014 del MINSAL (Chile, 2014b).

c. Miel

i. Pesticidas mediante LC-MS/MS y GC-MS/MS

Se seleccionaron 10 de las 29 muestras de miel (una de cada comuna estudiada) para la detección de residuos de pesticidas. De ellas, ninguna presentó residuos detectables de alguno de los analitos detallados en el Anexo 2.

ii. Antimicrobianos mediante LC-MS/MS

En la Tabla 7 se detalla la localidad de origen, analitos y concentración detectada en las 29 muestras de miel analizadas. Para los antimicrobianos de la familia de las sulfonamidas, se detectaron residuos del antimicrobiano Sulfametazina, perteneciente a muestras de las comunas de Arauco y Concepción (Región del Bio-Bio), en concentraciones de 0,021 µg/kg y 0,012 µg/kg respectivamente. Mientras que el analito Sulfamerazina fue detectado en una muestra de miel perteneciente a la comuna de Cañete (Región del Bio-Bio), con una concentración de 0,005 µg/kg. En el caso de las tetraciclinas, se detectaron residuos de

Oxitetraciclina (y un epímero) en 4 mieles provenientes de las comunas de Los Ángeles (2 muestras, con 0,005 µg/kg cada una), Chillán (1 muestra con 0,006 µg/kg de Oxitetraciclina y 0,040 µg/kg de un epímero) y San Carlos (1 muestra con 0,006 µg/kg), mientras que para el analito Tetraciclina, se detectó una muestra perteneciente a Chillán (con 0,006 µg/kg de Tetraciclina y 0,006 µg/kg de un epímero) y otra de San Carlos (con 0,005 µg/kg), siendo esta última correspondiente a un epímero de Tetraciclina. Cabe destacar que, de las 2 regiones muestreadas para este rubro, solo la Región del Bio-Bio presentó resultados positivos a residuos de sulfonamidas y tetraciclinas.

Tabla 8. Residuos de antimicrobianos en miel según procedencia de las muestras.

Matriz	Región	Comuna	Productor	Analito	Concentración detectada µg/kg	LMR Chile* matriz
Miel	Valparaíso	Casablanca	<i>a</i>	-	-	-
			<i>b</i>	-	-	-
			<i>c</i>	-	-	-
			<i>d</i>	-	-	-
			<i>e</i>	-	-	-
			<i>f</i>	-	-	-
		Yumbel	<i>g</i>	-	-	-
			<i>h</i>	-	-	-
		Bulnes	<i>i</i>	-	-	-
			<i>j</i>	-	-	-
		Santa Bárbara	<i>k</i>	-	-	-
			<i>l</i>	-	-	-
		<i>m</i>	-	-	-	
		<i>n</i>	-	-	-	
	Arauco	<i>ñ</i>	Sulfametazina	0,021	n.e	
		<i>o</i>	-	-	-	
	<i>p</i>	-	-	-		
	Bío Bío	Cañete	<i>q</i>	Sulfamerazina	0,005	n.e
			<i>r</i>	-	-	-
	<i>s</i>	-	-	-		
	Concepción		<i>t</i>	Sulfametazina	0,012	n.e
			<i>u</i>	-	-	-
	<i>v</i>	-	-	-		
Los Ángeles		<i>w</i>	Oxitetraciclina	0,005	n.e	
		<i>x</i>	Oxitetraciclina	0,005	n.e	
<i>y</i>	-	-	-			
Chillán	<i>z</i>		Oxitetraciclina	0,006	n.e	
			Epioxitetraciclina	0,040	n.e	
			Tetraciclina	0,006	n.e	
			Epitetraciclina	0,006	n.e	

		Oxitetraciclina	0,006	n.e
San Carlos	<i>aa</i>	Epioxitetraciclina	0,013	n.e
		Epitetraciclina	0,005	n.e
	<i>ab</i>	-	-	-
Total	29			

*n.e: no establecido.

iii. Amitraz mediante HPLC-MS/MS

Se seleccionaron 16 de las 29 muestras de miel para la detección de residuos del antiparasitario Amitraz, ya que se tenía el antecedente de su uso en pequeños productores de miel. Sin embargo, ninguna de ellas presentó residuos detectables de este analito.

DISCUSIÓN

La presencia del pesticida detectado en las muestras de leche analizadas, si bien no supera el LMR establecido para la matriz, genera preguntas sobre el posible origen de estos residuos. La permetrina es un derivado de los piretroides, que son insecticidas orgánicos sintéticos derivados de las piretrinas, que se usa, en gran parte debido a su alta actividad como insecticida y baja toxicidad para los mamíferos, ampliamente en áreas rurales y urbanas de todo el mundo. Después de entrar en el medioambiente, los piretroides circulan entre las tres fases de sólidos, líquidos y gases y entran en los organismos a través de las cadenas alimenticias, lo que genera importantes riesgos para la salud (Tang *et al.*, 2018). Los residuos de piretroides en el cuerpo humano son generalmente más altos en lugares donde se usan como repelentes de mosquitos. Además del uso de pesticidas en interiores, algunos pesticidas agrícolas pueden ingresar a las casas después de adherirse a la ropa o al calzado, lo que puede explicar los altos niveles de residuos de piretroides reportados en los hogares de los trabajadores agrícolas (Tang *et al.*, 2018). La presencia de permetrina ha sido detectada en muestras de leche materna humana, y dado que los piretroides son compuestos lipofílicos, esto podría indicar su bioacumulación en tejidos (Corcellas *et al.*, 2012). Además, otros estudios han sugerido posibles daños en el sistema reproductivo masculino y femenino, debido a acumulación anormal de ARN en el epitelio seminífero, con un descenso en las funciones de las células de Sertoli de ratones expuestos a niveles bajos y crónicos de permetrina (Saito *et al.*, 2017), y a los hallazgos de efectos degenerativos en la morfología ovárica de ratas tratadas con este producto (Kotil y Deniz Yön, 2015). También, se ha estudiado el rol de la exposición a permetrina en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Carloni *et al.*, 2012).

Respecto a los residuos de antimicrobianos en leche y carne ovina, destaca la presencia de residuos de aminoglucósidos en leche. Los aminoglucósidos son una clase de antibióticos que se han utilizado ampliamente en medicina humana y veterinaria, contra la mayoría de los microorganismos Gram positivos y negativos. Los aminoglucósidos no se absorben por vía oral, por lo que generalmente son administrados por inyección intramuscular. Los residuos de estas drogas tienden a concentrarse en el riñón ya que generalmente se excretan

a través del tracto urinario (Turnipseed y Andersen, 2008). En relación a su uso en bovinos, un estudio realizado en Argentina, acerca del uso de antimicrobianos en predios lecheros, evidenció que la mayoría de éstos fueron betalactámicos y aminoglucósidos (González *et al.*, 2015). Una de las principales enfermedades tratadas en ganado lechero es la mastitis bovina, en la cual se utilizan dispositivos intramamarios para su tratamiento. Algunos de estos contienen formulaciones de antibióticos como la estreptomicina y gentamicina (Park *et al.*, 2016), los que podrían ser la causa de la presencia de estos residuos en leche.

Por otro lado, la presencia de macrólidos en carne ovina evidencia su uso en estas producciones. Los macrólidos son un grupo de compuestos, altamente efectivos contra una amplia gama de bacterias Gram positivas, pero con poca actividad contra bacterias Gram negativas. Algunos miembros de este grupo son la eritromicina, oleandomicina, espiramicina y tilmicosina. En general, los macrólidos se administran por vía oral, pero a veces también parenteralmente Como las inyecciones subcutáneas (SC) o intramusculares (IM) pueden ser irritantes, se privilegia la vía oral (Moreno y Lanusse, 2017). Sin embargo, en la práctica de los pequeños productores, la administración de medicamentos mediante vía oral a sus animales es poco habitual.

En el caso de los medicamentos veterinarios en miel, no es posible determinar si los resultados presentados sobrepasan los LMRs establecidos para dichas matrices en Chile, dado que éstos no se encuentran establecidos en nuestro país. Esta situación es similar en otros países. Por ejemplo, las tetraciclinas no están registradas en la Unión Europea para el tratamiento de abejas, por lo que no existen niveles establecidos de residuos para este tipo de antibiótico en miel. Actualmente, la oxitetraciclina es el único antibiótico registrado para ser utilizado por los apicultores canadienses para tratar la Loque americana, una enfermedad bacteriana altamente contagiosa, difícil de erradicar, causada por *Paenibacillus larvae* (Barganska *et al.*, 2011). En nuestro país, el uso de este antibiótico no está considerado en el Programa Nacional de Control Oficial de Loque Americana del SAG (SAG, 2017b).

En el caso de los pesticidas, sí existen LMR establecidos. Cabe destacar que en otros mercados, como la Unión Europea, Estados Unidos y Reino Unido se establecen LMRs para pesticidas en esta matriz, aunque difieren en las concentraciones límite y los analitos considerados en su legislación (Souza *et al.*, 2016). Por otro lado, cabe destacar que a diferencia de otros estudios en miel y otros productos apícolas (Calatayud-Vernich *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2014)), ninguna miel analizada presentó residuos de pesticidas, aunque el pequeño número de muestras no permite asegurar que no existan en alimentos de productores que no fueron muestreados.

La presencia de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de pequeños productores es un problema global. Existe evidencia de residuos de antimicrobianos en leches de Kenia, cuyos resultados fueron significativamente mayores en productores a pequeña escala (Shitandi y Sternesjo, 2004). Además, se ha detectado la presencia de residuos de antibióticos en leches de pequeños productores de Ghana (Addo *et al.*, 2011), en donde un 3,1% de las muestras presentó niveles que superaban los LMRs de la Unión Europea. Para explicar esta situación, algunos autores sugieren que en los pequeños productores existe falta de comprensión de los riesgos relacionados a la contaminación con estos residuos, que hay registros deficientes o nulos cuando aplican los tratamientos, y que los sistemas de monitoreo fallan (Shitandi y Sternesjo, 2004). Se han realizado estudios en otros países como Perú, en los que los productores de pequeñas granjas contaban con al menos un conocimiento básico acerca del uso de estos productos en sus animales (Redding *et al.*, 2014). Sin embargo, es particularmente problemático en otras provincias subdesarrolladas y áreas remotas del mundo, donde los pequeños productores a menudo tienen dificultades para acceder a servicios veterinarios regulares y asequibles (Hu y Cheng, 2016). Por otro lado, las dificultades en la adopción de Buenas Prácticas de Producción, y en la capacitación de los productores son un problema transversal, incluso en países desarrollados (Parker *et al.*, 2016).

Además, en Chile existe poca información acerca del nivel de adopción de buenas prácticas de producción en el ámbito de la Agricultura Familiar Campesina, así como la presencia de residuos de contaminantes químicos en alimentos originados a este nivel. En

relación con esto último, si bien el alcance de este estudio es limitado, los resultados generados constituyen una línea base de la presencia de residuos de antibióticos y productos fitosanitarios en alimentos provenientes de la pequeña agricultura y su paso a la cadena alimenticia. De esta forma, constituye una base para evaluar la legislación vigente al respecto y el desarrollo de medidas que contribuyan a asegurar la inocuidad de estos productos.

CONCLUSIONES

Los hallazgos de este estudio dan cuenta de la presencia de residuos de contaminantes químicos en alimentos provenientes de la agricultura familiar campesina. Si bien, la mayoría de los productos analizados presentó concentraciones que no superan los límites máximos residuales establecidos, sí se encontraron muestras por sobre dichos límites, sustentando la hipótesis planteada.

Los residuos de los analitos detectados han sido estudiados a nivel mundial, en diversas matrices, mostrando antecedentes de que la exposición a éstos a distintas concentraciones podría resultar en riesgo para la salud humana.

Si bien los resultados presentados no pretenden ser extrapolables a otras regiones o comunas, éstos permiten establecer una línea de base para reconsiderar la transferencia, adopción y conocimiento de buenas prácticas de producción (GMP) en la agricultura familiar campesina de Chile. Estudios similares sobre residuos químicos que contemplen a estas producciones no se han realizado en nuestro país en el último tiempo, por lo que la información generada contribuye a focalizar futuros planes de vigilancia a este nivel.

En el mismo sentido, el no establecimiento de algunos LMRs de medicamentos veterinarios en matrices como la miel, plantea desafíos respecto a la legislación vigente.

Finalmente, estudios futuros sobre la presencia de estos residuos de contaminantes químicos en un mayor número de muestras y que consideren a otras matrices, aportarían al conocimiento de la situación de los pequeños agricultores, en vías de mejorar sus condiciones de producción y la inocuidad de los productos que se consumen en Chile.

BIBLIOGRAFÍA

- **ACHIPIA. AGENCIA CHILENA PARA LA CALIDAD E INOCUIDAD ALIMENTARIA.** 2014. Programa Nacional Integrado de plaguicidas de uso agrícola. Informe de Evaluación de Actividades realizadas en el período 2011–2013. [en línea]. <<http://www.achipia.cl/wp-content/uploads/2016/03/Informe-evaluacion-PNI-Plaguicidas.pdf>> [consulta: 15-04-2017].
- **ADDO, K.; MENSAH, G.; ANING, K.; NARTEY, N.; NIPAH, N.; BONSU, C.; AKYEH, M.; SMITS, H.** 2011. Microbiological quality and antibiotic residues in informally marketed raw cow milk within the coastal savannah zone of Ghana. [en línea]. *Trop Med Int Health* 16(2):227-232. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02666.x>> [consulta: 22-01-2018].
- **AGUILAR, J.; MUÑOZ, M.; RENDÓN, R.; REYES, J.** 2007. Selección de actores a entrevistar para analizar la dinámica de innovación bajo un enfoque de redes. 1ª ed. Universidad Autónoma de Chapingo-CIESTAAM/PIIAI. 48 p.
- **AL-WAILI, N.; SALOM, K.; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M.** 2012. Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. [en línea]. *SCI World J.* 2012:930849. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3477659/>> [consulta: 30-06-2017].
- **BARGANSKA, Z.; SLEBIODA, M.** 2011. Determination of antibiotic residues in honey. [en línea]. *Trends Anal. Chem.* 30(7):1035-1041. <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.014>> [consulta: 10-12-2017].
- **BOTITSI, H.; TSIPI, D.; ECONOMOU, A.** 2017. Current Legislation on Pesticides. **In:** Romero, R.; Garrido, A. (Eds). *Applications in High Resolution Mass Spectrometry.* Elsevier Science & Technology Books. USA. pp 83-130.

- **CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION.** 2003. Glosario de Términos y Definiciones para Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos (CAC/MISC 5-1993, Enmienda 2003).

- **CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION.** 2010b. Métodos de Muestreo Recomendados para la Determinación de Residuos de Plaguicidas a efectos del cumplimiento de los LMR (CAC/GL 33-1999, Enmienda 2010).

- **CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION.** 2014. Directrices para el Diseño y la Implementación de Programas Nacionales Reglamentarios de Aseguramiento de Inocuidad Alimentaria relacionados con el uso de Medicamentos Veterinarios en los Animales destinados a la Producción de Alimentos (CAC/GL 71-2009, Enmienda 2014).

- **CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION.** 2015. Maximum Residue Limits (MRLS) and Risk Management Recommendations (RMRS) for Residues of Veterinary Drugs in Foods. (CAC/MRL 2-2015). [en línea]. <http://www.fao.org/input/download/standards/45/MRL2_2015e.pdf> [consulta: 25-04-2017].

- **CALATAYUD-VERNICH, P.; CALATAYUD, F.; SIMO, E.; PICO, Y.** 2017. Occurrence of pesticides residues in Spanish beeswax. [en línea]. Sci Total Environ. 605-606:745-754. <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.174>> [consulta: 22-01-2018].

- **CARLONI, M.; NASUTI, C.; FEDELI, D.; MONTANI, M.; AMICI, A.; VADHANA, D.; GABBIANELLI, R.** 2012. The impact of early life permethrin exposure on development of neurodegeneration in adulthood. [en línea]. Exp Gerontol. 47(1):60-66. <<https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.10.006>> [consulta: 23-12-2017].

- **CHEN, G.; FANG, Y.** 2011. The LC-MS/MS Methods for the Determination of Specific Antibiotics Residues in Food Matrices. Chapter 13. **In:** Zweigenbaum, J. (Ed)

Mass Spectrometry in Food Safety. Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA. pp 309-355.

- **CHILE. MINISTERIO DE AGRICULTURA.** 1990a. Ley 18.910. Sustituye Ley Orgánica del Instituto de Desarrollo Agropecuario. 3 febrero 1990.
- **CHILE. MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES.** 1990b. Decreto 238. Promulga Protocolo de Montreal relativo a las sustancias agotadoras de la capa de ozono. 28 abril 1990.
- **CHILE. MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES.** 1992. Decreto 685. Promulga el Convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación. 13 octubre 1992.
- **CHILE. MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES.** 2005a. Decreto 37. Promulga el Convenio de Rotterdam para la aplicación del procedimiento de consentimiento fundamentado previo a ciertos plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional y sus anexos. 19 mayo 2005.
- **CHILE. MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES.** 2005b. Decreto 38. Promulga el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes y sus Anexos. 19 mayo 2005.
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD. SUBSECRETARÍA DE SALUD PÚBLICA.** 2010. Resolución Exenta 33. Fija Tolerancias Máximas de Residuos de Plaguicidas en Alimentos. 5 febrero 2010.
- **CHILE. MINISTERIO DE AGRICULTURA.** 2014a. Resolución Exenta 1557. Establece Exigencias para la Autorización de Plaguicidas y deroga Resolución N° 3.670 De 1999. 10 marzo 2014.

- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD. SUBSECRETARÍA DE SALUD PÚBLICA.** 2014b. Resolución Exenta 551. Fija Límites Máximos de Residuos de Medicamentos Veterinarios en Alimentos Para Consumo Humano. 19 agosto 2014.
- **CHILE. MINISTERIO DE AGRICULTURA.** 2016. Resolución Exenta 555. Aprueba Bases Administrativas, Técnicas y Anexos para la licitación pública denominada: "Diseño e Implementación de un Plan Nacional de Cierre de Brechas de Contaminantes Químicos en Productos Primarios". 7 noviembre 2016.
- **CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.** 2008. Manual de Normas de Bioseguridad. CONICYT. 2ª ed. Santiago, Chile. 139 p.
- **CONTRERAS, R.; KRIVONOS, E.; SÁEZ, L.** 2014. Mercados locales y ferias libres: El caso de Chile. Capítulo 21. **In:** Salcedo, S.; Guzmán, L. (Eds). Agricultura Familiar en América Latina y el Caribe: Recomendaciones de Política. Santiago de Chile. pp 369-388. [en línea]. <<http://www.fao.org/docrep/019/i3788s/i3788s.pdf>> [consulta: 10-04-2017].
- **COOPER, K.; MCHANON, C.; FAIRWEATHER, I.; ELLIOT, C.** 2015. Potential impacts of climate change on veterinary medicinal residues in livestock produce: An island of Ireland perspective. [en línea]. Trends Food Sci Tech 44:21-35. <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.007>> [consulta: 12-05-2017]
- **CORCELLAS, C.; FEO, M.; TORRES, J.; MALM, O.; OCAMPO-DUQUE, W.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D.** 2012. Pyrethroids in human breast milk: Occurrence and nursing daily intake estimation. [en línea]. Environ Int. 47:17-22. <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.05.007>> [consulta: 10-01-2018].
- **EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY.** 2015. Report for 2014 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other

substances in live animals and animal products. [en línea].
<<https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/923e>> [consulta: 12-06-2017].

- **ENSLEY, S.** 2016. Pesticides and Herbicides. **In:** Caballero, B.; Finglas, P.; Toldrá, F. (Eds) Encyclopedia of Food and Health. pp 307–310 [en línea].
<<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00534-1>> [consulta: 15-04-2017].
- **FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.** 2002. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. [en línea] <<http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf>> [consulta: 10-05-2017].
- **FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.** 2014. ¿Qué es la Agricultura Familiar? [en línea] <<http://www.fao.org/family-farming-2014/home/what-is-family-farming/es/>> [consulta: 15-04-2017].
- **FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.** 2017. La Reunión Conjunta FAO/OMS sobre residuos de plaguicidas. [en línea]. <<http://www.fao.org/agriculture/crops/mapa-tematica-del-sitio/theme/pests/jmpr/es/>> [consulta: 10-05-2017].
- **FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2015. Milk Drug Residue Sampling Survey. Department of Health and Human Services. [en línea].
<<https://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/ComplianceEnforcement/UCM435759.pdf>> [consulta: 08-07-2017].
- **GONZALEZ, V.; POL, M.; PASTORINO, F.; HERRERO, A.** 2015. Quantification of antimicrobial usage in dairy cows and preweaned calves in Argentina. [en línea]. Prev Vet Med. 122(3):273-279. <<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.10.019>> [consulta: 08-01-2018].

- **HU, Y.; CHENG, H.** 2016. Health risk from veterinary antimicrobial use in China's food animal production and its reduction. [en línea]. Environm Pollut. 219:993-997. <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.099>> [consulta: 27-12-2018].

- **HERVÉ, M.** 2013. Carne Ovina: Producción, características y oportunidades en lo que hoy demanda el consumidor nacional e internacional. Informe de experto. Agrimundo, ODEPA-FIA. [en línea]. <<http://www.agrimundo.cl/wp-content/uploads/Carnes-Rojas-Informe-experto-HerveFinal.pdf>> [consulta: 16-05-2017].

- **INDAP. INSTITUTO DE DESARROLLO AGROPECUARIO.** 2007a. Estrategia Regional De Competitividad Por Rubro: Leche VIII Región. [en línea]. <https://www.indap.gob.cl/docs/default-source/default-document-library/leche-viiiir_estrategiaregionalxrubro.pdf?sfvrsn=0> [consulta: 08-06-2017].

- **INDAP. INSTITUTO DE DESARROLLO AGROPECUARIO.** 2007b. Plan Nacional de Competitividad Ovino para la Agricultura Familiar Campesina. [en línea]. <https://www.indap.gob.cl/docs/default-source/default-document-library/plan_nacional_ovino.pdf?sfvrsn=0> [consulta: 08-06-2017].

- **INDAP. INSTITUTO DE DESARROLLO AGROPECUARIO.** 2007c. Estrategia de Competitividad por Rubro “Ovinos IX Región”. [en línea]. <https://www.indap.gob.cl/docs/default-source/default-document-library/25ovinos-ixr_estrategiaregionalxrubro.pdf?sfvrsn=0> [consulta: 08-06-2017].

- **ISP. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA.** 2014. Informe de Resultados Programa de Vigilancia de Residuos de Medicamentos de Uso Veterinario 2012-2013. [en línea]. <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2014/02/Informe%20Residuos%20Veterinarios%202012-2013.pdf> [consulta: 22-05-2017].

- **JUAN-BORRÁS, M.; PERICHE, A.; DOMENECH, E.; ESCRICHE, I.** 2014. Routine quality control in honey packaging companies as a key to guarantee consumer safety. The case of the presence of sulfonamides analyzed with LC-MS-MS. [en línea].

- Food Control. 50:243-249 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.021>> [consulta: 20-05-2017].
- **KIM, M.** 2012. Chapter 17. Chemical contamination of red meat. **In:** Schrenk, D. (Ed) Chemical contaminants and residues in foods: 1st Ed. Woodhead Publishing. pp 447-468. [en línea]. <https://www.researchgate.net/publication/282798500_Chemical_contaminants_of_red_meat> [consulta: 10-06-2017].
 - **KOTIL, T.; DENIZ YÖN, N.** 2015. The effects of permethrin on rat ovarian tissue morphology. [en línea]. Exp Toxicol Pathol. 67(3):279-285. <<https://doi.org/10.1016/j.etp.2015.01.005>> [consulta: 23-12-2018].
 - **MORENO, L.; LANUSSE, C.** 2017. Veterinary Drug Residues in Meat-Related Edible Tissues. [en línea]. **In:** Purslow, P (Ed). New Aspects of Meat Quality. pp 581-603. <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780081005934>> [consulta: 10-06-2017].
 - **ODEPA. OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS.** 2013. Mercado de la carne y lana ovina en Chile. Informe Final. [en línea]. <http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1396443669mercadoCarneLanaOvina.pdf> [consulta: 29-06-2017].
 - **ODEPA. OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS.** 2015. Informe Final Estudio Estratégico de la Cadena Apícola de Chile. [en línea]. <http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1451341146estudioCadenaApicola.pdf> [consulta: 08-06-2017].
 - **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2008. Chapter 8: Maximum Residue Limits for Pesticides and Veterinary Drugs. **In:** Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food Drugs. [en línea]. <http://www.who.int/foodsafety/chem/residue_limits.pdf> [consulta: 22-05-2017].

- **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2014. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Seventy-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. [en línea]. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/127845/1/9789241209885_eng.pdf> [consulta: 26-05-2017].

- **PARK, E.; RYU, Y.; CHA, C.; YOO, C.; KIM, S.; LEE, H.** 2016. Analysis of antibiotic residues in milk from healthy dairy cows treated with bovine mastitis ointment using ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. [en línea]. Korean J Vet Res. 56(4):233-239. <<https://doi.org/10.14405/kjvr.2016.56.4.233>> [consulta: 28-12-2018].

- **PARKER, J.; DENIRO, J.; LEWIS, M. DOOHAN, D.** 2016. Are small and medium scale produce farms inherent food safety risks? [en línea]. J Rural Stud. 44:250-260. <<https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2016.02.005>> [consulta: 28-12-2018].

- **REDDING, L.; CUBAS-DELGADO, F.; SAMMEL, M.; SMITH, G.; GALLIGAN, D.; LEVY, M.; HENNESSY, S.** 2014. The use of antibiotics on small dairy farms in rural Peru. [en línea]. Prev Vet Med.113:88-95 <<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.10.012>> [consulta: 28-11-2018].

- **RIAL. RED DE INFORMACIÓN Y ALERTAS ALIMENTARIAS.** 2016. Reporte de Notificaciones 2015. [en línea]. <<http://www.achipia.cl/wp-content/uploads/2016/03/Reporte-Notificaciones-RIAL-2015.pdf>> [consulta: 10-05-2017].

- **RODRIGUEZ, D.; AHUMADA, D.; DÍAZ, A.; GUERRERO, J.** 2014. Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. [en línea]. Food Control. 37:33-40 <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.011>> [consulta: 28-01-2018].

- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2017a. Programa Control de Residuos. Resultados año 2016. [en línea]. <http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/resultados_residuos_2016-17.pdf> [consulta: 26-06-2017].
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2017b. Manual De Procedimientos- Procedimientos Sanitarios Para El Control De Loque Americana - PSCLA/MP1. [en línea]. <http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/MP_1_CONTROL_LOQUE.pdf> [consulta: 26-12-2017].
- **SAITO, H.; HATA, K.; TANEMURA, K.** 2017. Prenatal and postnatal exposure to low levels of permethrin exerts reproductive effects in male mice. [en línea] *Reprod Toxicol.* 74:108–115 <<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.08.022>> [consulta: 12-06-2017].
- **SHANKAR, B.; MANUNATHA, B.; CHANDAN, S.; RANJITH, D.; SHIVAKUMAR, V.** 2010. Rapid Methods for detection of Veterinary Drug residues in Meat. [en línea] *Vet World.* 3(5):241-246 <<http://www.veterinaryworld.org/Vol.3/May/Rapid%20Methods%20for%20detection%20of%20Veterinary%20Drug%20residues%20in%20Meat.pdf>> [consulta: 12-06-2017].
- **SHITANDI, A.; STERNESJÖ, A.** 2004. Factors Contributing to the Occurrence of Antimicrobial Drug Residues in Kenyan Milk. [en línea] *J Food Protect.* 67(2)399-402. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14968978>> [consulta: 12-06-2017].
- **SOUZA, P.; ROCHA, L.; DE ABREU, M.; FERNANDES, C.** 2016. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. [en línea] *Talanta.* 149: 124-141. <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.045>> [consulta: 12-06-2017].
- **TANG, W.; WANG, D.; WANG, J.; WU, Z.; LI, L.; HUANG, M.; XU, S.; YAN, D.** 2018. Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. [en línea]

Chemosphere. 191:990 <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.115>> [consulta: 12-12-2017].

- **TURNIPSEED, S.; ANDERSEN, W.** 2008. Chapter 10. Veterinary Drug Residues. [en línea] Comp Anal Ch. 51:307-338. <[https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(08\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(08)00010-X)> [consulta: 12-12-2017].

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de muestreo y productores, según análisis realizado(s).

a. Mieles

Región	Comuna	Productor	Análisis			
			Pesticidas	Amitraz	AB 4 placas	LC-MS/MS
Valparaíso	Casablanca	<i>a</i>		×		×
		<i>b</i>		×		×
		<i>c</i>		×		×
		<i>d</i>				×
		<i>e</i>				×
		<i>f</i>	×	×		×
Bío Bío	Bulnes	<i>g</i>		×		×
		<i>h</i>	×			×
	Santa Barbara	<i>i</i>				×
		<i>j</i>		×		×
		<i>k</i>	×	×		×
	Yumbel	<i>l</i>				×
		<i>m</i>	×	×		×
	Los Ángeles	<i>n</i>	×			×
		<i>ñ</i>		×		×
	Arauco	<i>o</i>		×		×
		<i>p</i>				×
		<i>q</i>	×	×		×
		<i>r</i>				×
	Cañete	<i>s</i>		×		×
		<i>t</i>	×			×
	Concepción	<i>u</i>		×		×
		<i>v</i>				×
		<i>w</i>	×			×
		<i>x</i>		×		×
	Chillán	<i>y</i>	×			×
<i>z</i>			×		×	
San Carlos	<i>aa</i>				×	
	<i>ab</i>	×	×		×	

b. Leche

Región	Comuna	Productor	Análisis			
			Pesticidas	Amitraz	AB 4 placas	LC-MS/MS
Bío Bío	Arauco	<i>a</i>	×		×	
		<i>b</i>			×	
		<i>c</i>			×	
		<i>d</i>			×	
		<i>e</i>			×	
		<i>f</i>			×	
		<i>g</i>			×	
		<i>h</i>			×	
	Bulnes	<i>i</i>			×	
		<i>j</i>	×		×	
		<i>k</i>			×	
	Cañete	<i>l</i>			×	
		<i>m</i>	×		×	
		<i>n</i>			×	
		<i>ñ</i>			×	
	Concepción	<i>o</i>	×		×	
		<i>p</i>			×	
		<i>q</i>			×	
		<i>r</i>			×	
	Los Ángeles	<i>s</i>			×	
<i>t</i>		×		×		
<i>u</i>				×		
Santa Bárbara	<i>v</i>			×		
Yumbel	<i>w</i>	×		×		
	<i>x</i>			×		
	<i>y</i>			×		
	<i>z</i>			×		
La Araucanía	Pitrufquén	<i>aa</i>			×	
		<i>ab</i>	×		×	
		<i>ac</i>			×	
		<i>ad</i>			×	
		<i>ae</i>			×	
		<i>af</i>			×	
		<i>ag</i>	×		×	
		<i>ah</i>			×	
		<i>ai</i>			×	
		<i>aj</i>	×		×	
		<i>ak</i>			×	

Los Ríos	Futrono	<i>al</i>			×	
	Lago Ranco	<i>am</i>			×	
	Río Bueno	<i>an</i>	×		×	
Los Lagos	Mauñín	<i>añ</i>	×		×	
		<i>ao</i>	×		×	
		<i>ap</i>			×	
		<i>aq</i>			×	
		<i>ar</i>	×		×	
		<i>as</i>			×	
		<i>at</i>	×		×	
		<i>au</i>			×	
		<i>av</i>	×		×	
		<i>aw</i>			×	
		Osorno	<i>ax</i>			×
	<i>ay</i>				×	
	<i>az</i>				×	
	<i>ba</i>				×	
	<i>bb</i>				×	
	<i>bc</i>				×	
	<i>bd</i>				×	
	<i>be</i>				×	
	<i>bf</i>				×	
	<i>bg</i>				×	
	<i>bh</i>				×	
	<i>bi</i>				×	
	<i>bj</i>				×	
	<i>bk</i>				×	
	<i>bl</i>				×	
	<i>bm</i>				×	
	<i>bn</i>				×	
	Los Muermos	<i>bñ</i>			×	
		<i>bo</i>			×	
		<i>bp</i>			×	
		<i>bq</i>			×	
		<i>br</i>			×	
		<i>bs</i>			×	
<i>bt</i>				×		
<i>bu</i>				×		
<i>bv</i>				×		
<i>bw</i>				×		
<i>bx</i>				×		

c. Carne ovina

Región	Comuna	Productor	Análisis			
			Pesticidas	Amitraz	AB 4 placas	LC-MS/MS
O'Higgins	La Estrella	<i>a</i>			×	
	Litueche	<i>b</i>			×	
	Litueche	<i>c</i>			×	
	Marchigue	<i>d</i>			×	
	Peralillo	<i>e</i>			×	
	Pumanque	<i>f</i>			×	
	Pumanque	<i>g</i>			×	
	Pumanque	<i>h</i>			×	
	Pumanque	<i>i</i>			×	
	Pumanque	<i>j</i>			×	
	Pumanque	<i>k</i>			×	
	Pumanque	<i>l</i>			×	
	Pumanque	<i>m</i>			×	
	Pumanque	<i>n</i>			×	

Anexo 2. Listado de plaguicidas para analizar por LABSER Ltda. según metodología.

Plaguicidas LC-MS/MS	Límite de cuantificación (mg/kg)
2,4-D	0,010
Abamectina	0,010
Acequinocyl	0,010
Acetamiprid	0,010
Aldicarb	0,010
Aldicarb-sulfona	0,010
Aldicarb-sulfoxido	0,010
Azadirachtin	0,010
Azoxistrobin	0,010
BAC 12	0,010
BAC 14	0,010
BAC 16	0,010
Bentazona	0,010
Benzoato emamectina	0,010
Bifenazato	0,010
Bitertanol	0,010
Boscalid	0,010
Cadusafos	0,010
Carbaryl	0,010
Carbendazima, Benomilo	0,010
Carbofuran	0,010
Carfentrazona-etil	0,010
Cianazina	0,010
Ciazofamida	0,010
Cicloxidim	0,010
Cihexatin	0,010
Cimoxanil	0,010
Ciproconazol	0,010
Ciromazina	0,010
Cletodim	0,010
Clofentezina	0,010
Clomazon	0,010
Clopiraldid	0,010
Clorantraniliprole	0,010
Cloridazon	0,010
Clorprofan	0,010
Clortoluron	0,010
Clotianidin	0,010
DDAC 10	0,010
Desmedifam	0,010
Diclobutrazol	0,010
Diclorprop	0,010

Diclorvos	0,010
Dicrotofos	0,010
Difenoconazol	0,010
Diflubenzuron	0,010
Dimetenamid	0,010
Dimetoato	0,010
Dimetomorf	0,010
Dinocap	0,010
Dinoseb	0,010
Diuron	0,010
Dodina	0,010
Epoxiconazol	0,010
Espinetoram	0,010
Espinosad A	0,010
Espinosad D	0,010
Espirodiclofen	0,010
Espiromesifen	0,010
Espirotetramato	0,010
Espirotetramatocisenol (metabolito)	0,010
Espirotetramatocetohidroxi (metabolito)	0,010
Espiroxamina	0,010
Famoxadona	0,010
Fenbuconazol	0,010
Fenexamida	0,010
Fenmedifam	0,010
Fenoxicarb	0,010
Fenpirazamina	0,010
Fenpiroximato	0,010
Fenpropidin	0,010
Fenpropimorf	0,010
Fention	0,010
Fipronil	0,010
Flazasulfuron	0,010
Fluacinam	0,010
Flubendiamida	0,010
Fludioxonil	0,010
Flufenoxuron	0,010
Fluquinconazol	0,010
Flutolanil	0,010
Flutriafol	0,010
Forclorfenuron	0,010
Formetanato	0,010
Fostiazato	0,010
Haloxifop	0,010
Hexaconazol	0,010

Hexaflumuron	0,010
Hexitiazox	0,010
Hymexazol	0,010
Imazalil	0,010
Imazamox	0,010
Imidacloprid	0,010
Indoxacarb	0,010
Iprovalicarb	0,010
Lenacil	0,010
Linuron	0,010
Lufenuron	0,010
Mandipropamida	0,010
Mepanipirim	0,010
MeptilDinocap	0,010
Metamidofos	0,010
Metamitron	0,010
Metconazol	0,010
Metiocarb	0,010
Metomilo	0,010
Metoxifenocida	0,010
Metrafenona	0,010
Monocrotofos	0,010
Naled	0,010
Novaluron	0,010
Omethoato	0,010
Oxamil	0,010
Paclobutrazol	0,010
Pencicuron	0,010
Penconazol	0,010
Picloram	0,010
Pimetrozina	0,010
Piraclostrobina	0,010
Pirimicarb	0,010
PirimifosEtil	0,010
Propamocarb	0,010
Propargita	0,010
Propoxur	0,010
Prosulfocarb	0,010
Protioconazol	0,010
Quinoclorac	0,010
Quinoxifen	0,010
QuizalofopEtil	0,010
Rimsulfuron	0,010
Rotenona	0,010
Sulfoxaflor	0,010

Tebufenozida	0,010
Teflubenzuron	0,010
Tepraloxidim	0,010
Tiabendazol	0,010
Tiacloprid	0,010
Tiametoxam	0,010
Tidiazuron	0,010
Tiodicarb	0,010
TiofanateMetil	0,010
Triadimefon	0,010
Triadimenol	0,010
Triasulfuron	0,010
Triclorfon	0,010
Tridemorf	0,010
Trifloxistrobin	0,010
Triflumizol	0,010
FM-6-1 (Metabolito Triflumizol)	0,010
Triflumuron	0,010
Triforina	0,010
Triticonazol	0,010
Zoxamide	0,010
Dicamba	0,010

Plaguicidas GC-MS/MS	Límite de cuantificación (mg/kg)
Acefato	0,010
Acetocloro	0,010
Aclonifen	0,010
Acrinatrina	0,010
Alacloro	0,010
Aldrin	0,010
Atrazina	0,010
Azinfosetil	0,010
Azinfosmetil	0,010
Benalaxyl	0,010
Bifentrina	0,010
Bromacilo	0,010
Bromofosetil	0,010
Bromofosmetil	0,010
Bromopropilato	0,010
Bupirimato	0,010
Buprofecina	0,010
Captan	0,010
Ciflutrina (suma de isómeros)	0,010
Cipermetrina (suma de isómeros)	0,010
Ciprodinilo	0,010

Clordanocis	0,010
Clordanotrans	0,010
Clordecona	0,010
Clorfenapir	0,010
Clorfenson	0,010
Clorfenvinfos	0,010
Clorobencilato	0,010
Clortalonil	0,010
Clorpirifosetil	0,010
Clorpirifosmetil	0,010
Clortiofos	0,010
Clozolinato	0,010
Kresoximmetil	0,010
DDD o,p	0,010
DDD p,p	0,010
DDE o,p	0,010
DDE p,p	0,010
DDT o,p	0,010
DDT p,p	0,010
Deltametrina	0,010
Diazinon	0,010
Diclobenil	0,010
Diclofluamid	0,010
Dicloran	0,010
Dicofol	0,010
Dieldrin	0,010
Difenilamina	0,010
Diniconazol	0,010
Disulfoton	0,010
Endosulfan sulfato	0,010
Endosulfan, alpha	0,010
Endosulfan, beta	0,010
Endrin	0,010
Esfenvalerato	0,010
Etion	0,010
Etofenprox	0,010
Etofumesato	0,010
Etoprofos	0,010
Fenamifos	0,010
Fenarimol	0,010
Fenazaquina	0,010
Fenclorfos	0,010
Fenexamida	0,010
Fenitrotion	0,010
Fenpropatrin	0,010

Fentoato	0,010
Fenvalerato	0,010
Fluazifop-butil	0,010
Flucitrinato	0,010
Fludioxonil	0,010
Fluopiram	0,010
Flusilazol	0,010
Folpet	0,010
Forato	0,010
Formotion	0,010
Fosalon	0,010
Fosfamidon	0,010
Fosmet	0,010
HCH ALFA	0,010
HCH BETA	0,010
HCH DELTA	0,010
HCH GAMMA (Lindano)	0,010
Heptacloro	0,010
Heptenofos	0,010
Hexaclorobenceno	0,010
Imazalil	0,010
Iprodione	0,010
Isofenfos	0,010
Isopirazam	0,010
LamdaCihalotrina (suma de isomeros)	0,010
Malation	0,010
Mancozeb	0,010
Mecarban	0,010
Metalaxil	0,010
Metidation	0,010
Metolacloro	0,010
Metoxicloro	0,010
Metribucina	0,010
Mevinfos	0,010
Miclobutanil	0,010
Mirex	0,010
Napropamida	0,010
Nuarimol	0,010
Ortofenilfenol	0,010
Oxadiazon	0,010
Oxadixil	0,010
Oxifluorfen	0,010
Paration	0,010
Parationmetil	0,010
Pendimetalin	0,010

Permetrinacis-trans	0,010
Pirazofos	0,010
Piridaben	0,010
Piridafention	0,010
Pirifenox	0,010
Pirimetanil	0,010
Pirimifosmetil	0,010
Piriproxifen	0,010
Procimidona	0,010
Procloraz	0,010
Profenofos	0,010
Prometrina	0,010
Propiconazol	0,010
Propizamida	0,010
Proquinazid	0,010
Quinalfos	0,010
Qinometionato	0,010
Quintoceno	0,010
Simacina	0,010
Tau Fluvalinato	0,010
Tebuconazol	0,010
Tebufenpirad	0,010
Teflutrina	0,010
Terbacilo	0,010
Terbufos	0,010
Terbutilacina	0,010
Terbutrina	0,010
Tetraconazol	0,010
Tetradifon	0,010
Tolclofosmetil	0,010
Tolifluanida	0,010
Triazofos	0,010
Trifluralina	0,010
Uniconizol-P	0,010
Vamidation	0,010
Vinclozolina	0,010

Anexo 3. Metodología para *screening* de residuos antimicrobianos (Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos).

Este método de ensayo consta de cuatro etapas: preparación de las esporas microbianas, preparación de las placas inoculadas con los microorganismos y/o sus esporas, extracción del analito desde las muestras y finalmente la determinación de la inhibición del crecimiento (halo).

Cepas de trabajo provenientes de cepas de referencia: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Kokuria rhizophila*.

I. Esporulación de cepas *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*

Sembrar la bacteria en un tubo con medio N°1, e incubar a 30° C por 24h.

Posteriormente colocar 3 mL de agua destilada estéril al tubo y transferir a una botella Roux con 250 mL de medio N°1, incubar a 30° C durante 7 días invertidas.

Añadir a la botella Roux 25 mL de agua destilada estéril, y recolectar el crecimiento en tubos estériles de centrifuga.

El crecimiento recolectado se debe centrifugar a 3000 rpm por 20 minutos, eliminar el sobrenadante, lavar con 15 mL de agua destilada y centrifugar nuevamente a 3000 rpm por 20 minutos. Repetir ésta acción una vez más.

Luego de realizar la última centrifugación se debe eliminar el sobrenadante y colocar 10 mL de solución salina al 0,85 %, homogenizar y calentar a baño maría a 70° C durante 30 minutos.

Alicuotar en frascos estériles con sello hermético y refrigerar. Rotular con la fecha de obtención.

II. Preparación de placas de medio N°5 inoculadas con esporas de *Bacillus subtilis*.

De las esporas de *Bacillus subtilis* obtenidas anteriormente, se debe traspasar a un tubo con solución salina al 0,85%, una cantidad necesaria, con el objetivo de que quede a la misma concentración del tubo N°1 nefelómetro de Mcfarland.

Agregar 2 mL de la suspensión comparada con el tubo N°1 de McFarland a 200 ml de medio N° 5. Homogenizar.

A cada placa agregar 10 mL del medio inoculado con esporas y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Una vez solidificadas las placas, sacar al azar y realizar un control fortificado y un control con droga pura, el resto de las placas se deben embolsar colocando el número de lote y refrigerarlas.

- a. **Control fortificado:** colocar un cilindro metálico en la superficie de la placa y añadir 200 µL de la muestra control fortificada^(*) con Amikacina en una concentración de 0,5 µg/g (500 ppb), incubar a 30° C ± 1° C por 18 h a 24 h.

(*) Notas:

Preparar según instructivo DT-IT-053 Fortificación de muestras para el método de screening de residuos antimicrobianos.

La muestra control fortificada se somete al proceso de extracción como si fuera una muestra más.

Lectura de halo positivo: 1,4 ± 0,2 cm.

- b. **Control droga pura:** colocar un cilindro metálico en la superficie de la placa y añadir 200 µL de droga pura directamente, incubar a 30°C ± 1°C por 18h a 24h.

Lectura de halo para este antibiótico: 2,7 ± 0,17 cm.

Si en el control con droga pura y del fortificado se obtiene un halo dentro del rango, las placas de ese lote se pueden ocupar (mantener refrigeradas).

Si en el control con droga pura y del fortificado no se obtiene un halo dentro del rango, las placas de ese lote se deben desechar.

Nota: Las placas refrigeradas se pueden mantener hasta 5 días.

III. Preparación de placas de medio N°8 inoculadas con esporas de *Bacillus cereus*

De las esporas de *Bacillus cereus* obtenidas anteriormente, se debe traspasar a un tubo con solución salina al 0,85%, una cantidad necesaria, con el objetivo de que quede a la misma concentración del tubo N°1 nefelómetro de Mcfarland.

Agregar 2 ml de la suspensión comparada con el tubo N°1 de Mcfarland a 200 ml de medio N°8. Homogenizar.

A cada placa agregar 10 mL del medio inoculado con esporas y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Una vez solidificadas las placas, sacar al azar y realizar un control fortificado y un control con droga pura, el resto de las placas se deben embolsar colocando el número de lote y refrigerarlas.

- a. **Control fortificado:** colocar un cilindro metálico en la superficie de la placa y añadir 200 µL de una muestra control fortificada^(*) con Oxitetraciclina en una concentración de 0,24 µg/g (240 ppb), incubar a 30° C ± 1° C por 18h a 24h.

(*) **Notas:**

Preparar según instructivo DT-IT-053 Fortificación de muestras para el método de screening de residuos antimicrobianos.

La muestra control fortificada se somete al proceso de extracción como si fuera una muestra más.

Lectura de halo positivo: $1,4 \pm 0,2$ cm.

- b. Control droga pura:** colocar un cilindro metálico en la superficie de la placa y añadir 200 µl de la droga pura directamente, incubar a $30^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 18 h a 24 h.

Lectura de halo para este antibiótico: $2,79 \pm 0,11$ cm.

Si en el control de droga pura y del fortificado se obtiene un halo dentro del rango, las placas de ese lote se pueden ocupar (mantener refrigeradas).

Si en el control con droga pura y del fortificado no se obtiene un halo dentro del rango, las placas de ese lote se deben desechar.

Nota: Las placas refrigeradas se pueden mantener hasta 5 días.

IV. Preparación de placas de medio N°5 inoculadas con *Kokuria rhizophila*

La cepa de *Kokuria rhizophila* se debe activar traspasándola a caldo común tres veces, incubar a 35°C por 24 hrs cada vez, ocupar el tercer traspaso de caldo común para inocular el medio.

Agregar 3 ml de la suspensión de caldo común comparada con el tubo N° 0,5 de Mcfarland a 200 ml de medio N°5. Homogenizar.

A cada placa agregar 10 mL del medio inoculado con la cepa y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Una vez solidificadas las placas, sacar al azar y realizar un control fortificado y un control con droga pura, el resto de las placas se deben embolsar colocando el número de lote y refrigerarlas.

- a. Control fortificado:** colocar un cilindro metálico en la superficie de la placa y añadir 200 µL de una muestra control fortificada (*) con Ampicilina en una concentración de $0,025 \mu\text{g/g}$ (25 ppb), incubar a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18h a 24h.

(*) **Notas:**

Preparar según instructivo DT-IT-053 Fortificación de muestras para el método de screening de residuos antimicrobianos.

La muestra control fortificada se somete al proceso de extracción como si fuera una muestra más.

Lectura de halo positivo: $1,4 \pm 0,2$ cm.

- b. Control droga pura:** colocar un cilindro metálico en la superficie de la placa y añadir 200 µl de la droga pura directamente, incubar a 30°C ± 1°C por 18h a 24h.

Lectura de halo para este antibiótico: 2,8 ± 0,38 cm.

Si en el control con droga pura y fortificado se obtiene un halo dentro del rango, las placas de ese lote se pueden ocupar (mantener refrigeradas).

Si en el control con droga pura y fortificado no se obtiene un halo dentro del rango, las placas de ese lote se deben desechar.

Nota: Las placas refrigeradas se pueden mantener hasta 5 días.

V. Preparación de placas de medio N°8 inoculadas con *Kokuria rhizophila*

La cepa de *Kokuria rhizophila* se debe activar traspasándola a caldo común tres veces, incubar a 35° C por 24hr cada vez, ocupar el tercer traspaso de caldo común para inocular el medio.

Agregar 3 ml de la suspensión de caldo común comparada con el tubo N° 0,5 de Mcfarland a 200 ml de medio N° 8. Homogenizar.

A cada placa agregar 10 ml del medio inoculado con la cepa y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Una vez solidificadas las placas, sacar al azar y realizar un control fortificado y un control con droga pura, el resto de las placas se deben embolsar colocando el número de lote y refrigerarlas.

- a. Control fortificado:** colocar un cilindro en la superficie de la placa y añadir 200 µl de una muestra control fortificada (*) con Eritromicina en una concentración de 0,2 µg/g (200 ppb), incubar a 30°C ± 1°C por 18 h a 24 h.

(*)Notas:

Preparar según instructivo DT-IT-053 Fortificación de muestras para el método de screening de residuos antimicrobianos.

La muestra control fortificada se somete al proceso de extracción como si fuera una muestra más.

Lectura de halo positivo: 1,4 ± 0,2 cm.

- b. Control droga pura:** colocar un cilindro en la superficie de la placa y añadir 200 µl de la droga pura directamente, incubar a 30°C ± 1°C por 18 h a 24 h.

Lectura de halo para éste antibiótico: 4,03 ± 0,06 cm.

Si en el control con droga pura y del fortificado se obtiene un halo dentro del rango, las placas de ese lote se pueden refrigerar.

Si en el control con droga pura y del fortificado no se obtiene un halo dentro del rango, las placas de ese lote se deben desechar.

Nota: Las placas refrigeradas se pueden mantener hasta 5 días.

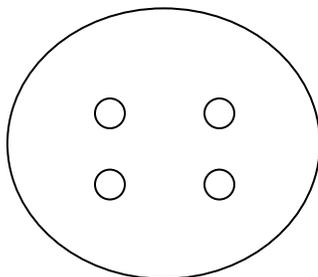
VI. Extracción de muestras

- a. Mezclar en tubos Falcon (de 50 ml para centrifuga) protegidos de la luz, con papel metálico, 20 ml de Buffer Cítrico Acetona con 5 g de riñón/hígado molido.

Se debe homogeneizar la mezcla durante 15 minutos y sonicar por 15 minutos. Luego homogeneizar durante 10 minutos y sonicar por última vez por 15 minutos.

Finalmente la muestra se debe someter a una centrifugación de 3000 rpm por 15 minutos. Se debe extraer el sobrenadante para trabajar.

Cada placa se debe marcar por debajo con el código de la muestra, posteriormente, colocar, según esquema, 4 cilindros metálicos.



Nota 1: Los cilindros metálicos se colocan en la superficie de la placa, no se deben enterrar en el agar.

Nota 2: Como alternativa, en vez de utilizar cilindros metálicos, también se pueden ocupar discos de papel estéril, de 10 mm diámetro y 1,1 mm de espesor. (3 discos, uno sobre otro)

Cada cilindro representa una muestra diferente.

Añadir 200 µl del sobrenadante de la muestra a cada cilindro metálico, si se usan los discos de papel estéril, se debe añadir 150 µl del sobrenadante de la muestra.

Posteriormente se deben refrigerar las placas durante 30 minutos, y pasado éste tiempo se deben incubar a 30° C por 18 h. Registrar el tiempo en DT-For-049 Resultado *Screening* de residuos antimicrobianos.

La lectura se realiza midiendo el diámetro de cada halo utilizando un pie de metro, el resultado será positivo si el halo de inhibición de crecimiento es igual o mayor a 1,2 cm.

b. Verificación del proceso de extracción

Cada vez que se realice éste método, se debe analizar un blanco, que corresponde a una muestra sin antibiótico; una muestra fortificada (**ver preparación en instructivo DT-IT-053 Fortificación de muestras para el método de screening de residuos antimicrobianos**) a una

concentración conocida de antibiótico (DT-IT- 009) y un control con las drogas puras utilizadas (Ver tabla N°1), lo que debe quedar registrado en DT-For-049 Resultado *Screening* de residuos antimicrobianos.

Tabla N°1 Diámetro y rangos de halos de inhibición (cm) del control de drogas puras.

	Concentración de droga	Placa 1 (cm)	Placa 2 (cm)	Placa 3 (cm)	Placa 4 (cm)
Eritromicina	0,2 µg	4,03 ±0,06	-----	-----	-----
Oxitetraciclina	0,25 µg	-----	2,79±0,11		-----
Amikacina	0,5 µg	-----	-----	2,7±0,17	-----
Ampicilina	0,025 µg	-----	-----	-----	2,8±0,38

c. Expresión de resultados

Los resultados son expresados como “Detectado” o “No Detectado” a la presencia de inhibidores bacterianos en la o las placas correspondientes.

Toda muestra, independiente de la placa, que presente un halo de inhibición de crecimiento igual o mayor a 1,2 cm se considerará positiva y se informará como “Detectado”.

Anexo 4. Metodología analítica para la extracción de Sulfonamidas en Miel, por LC-MS/MS. (Laboratorio de Farmacología Veterinaria).

1. Pesar $5 \pm 0,5$ g de muestra en tubo falcon de 50 mL. Agregar estándar interno SMZ 13C6 a todas las muestras y fortificados.
2. Disolver en caso de miel, con 1 ml de agua y ayudarse con temperatura (en caso de miel).
3. Fortificar y agregar estándar interno.
4. Agregar 15 mL de agua.
5. Agitar 10 min en vórtex.
6. Agregar 500 μ L de NaOH 1M.
7. Agitar 15 minutos y sonicar 5 minutos.
8. Ajustar a pH 7,5-8,0 con HCl 10% V/V
9. Agregar 10 ml Acetato de Etilo.
10. Agitar 10 minutos y centrifugar 2 minutos a 5000 rpm.
11. Agitar suavemente con la mano, para disolver el gel.
12. Centrifugar 10 min a 5000 rpm.
13. Guardar fase superior en tubo falcon de 50 mL.
14. Agregar 10 ml Acetato de Etilo.
15. Agitar 10 min y centrifugar 2 minutos a 5000 rpm.
16. Agitar suavemente con la mano, para disolver el gel.
17. Centrifugar 10 min a 5000 rpm.
18. Guardar fase superior en el tubo falcon de 50 mL.
19. Secar con suave flujo de nitrógeno 40-50° C y tener precaución de no sumergir las puntas amarillas en la solución.
20. Reconstituir con 0,5 mL de solución 15:85 Fase A y Fase B.
21. Sonicar y agitar.
22. Filtrar con filtros Millex, guardar en viales de inyección para LC-MS/MS.

NaOH 1M: Para 50 ml. Pesar 2g de NaOH y disolver en agua. Luego llevar a volumen

HCl 10% V/V: Para 50 mL, diluya 10 mL de Ácido Clorhídrico 37% en 40 mL de agua

Robustez:

Se considera como medida precautoria la centrifugación en Ependorf, por ser el factor que más afectaría a la robustez del método.

Anexo 5. Metodología analítica para la extracción de Tetraciclinas en Miel, por LC-MS/MS. (Laboratorio de Farmacología Veterinaria).

1. Pesar $5 \pm 0,5$ g de miel, disolver con 1 mL de agua y fortificar. Agregar estándar interno a todas las muestras y fortificados.
2. Agregar 25 mL de buffer oxalato (50 mM pH4)
3. Agitar 10 minutos y sonicar 5 minutos.
4. Centrifugar 10 min a 4500 rpm, filtrar con lana de vidrio si es necesario.
5. Transferir sobrenadante, filtrar con lana de vidrio si es necesario.
6. Reextraer con 10 mL de buffer oxalato (50 mM pH4).
7. Centrifugar 10 minutos a 4500 rpm. Filtrar lana de vidrio
8. Acondicionar una SPE Oasis HLB con 3 ml de Metanol y 3 ml de agua.
9. Pasar la muestra con ayuda de vacío si es necesario.
10. Lavar columna con 3 ml de agua.
11. Secar con vacío.
12. Eluir con 10 ml de Metanol, secar bajo flujo de nitrógeno 40-50° C.
13. Reconstituir con 500 μ L buffer oxalato (10 mM pH 2.5), conteniendo 25% acetonitrilo.
14. Centrifugar.
15. Filtrar con filtro Millex de 0, 22 μ m y transferir a viales para LC-MS/MS Sol. Extracción.

Buffer Oxalato 50 mM pH 4: Para 250 ml de solución, pesar 1,6 g de Ácido Oxálico y disolver en 200 ml de agua, ajustar a pH 4,0 y llevar a volumen.

Buffer Oxalato 10 mM pH 2.5: Para 100 ml de solución, pesar 0,126 g de Ácido Oxálico y disolver en 80 ml de agua, ajustar a pH 2,5 y llevar a volumen.

Robustez:

Se considera como medida precautoria el tiempo de ebullición, por ser el factor que más afecta la robustez del método.