



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

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA
ANALÍTICA PARA LA DETECCIÓN DE LINCOMICINA EN
PLUMAS Y TEJIDOS COMESTIBLES DE POLLOS**

Francisca Natalia Yantén Isla

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

PROFESORA GUÍA: DRA. JAVIERA CORNEJO KELLY
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT DE INICIACIÓN EN INVESTIGACIÓN 11140530

SANTIAGO, CHILE
2018



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

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA
ANALÍTICA PARA LA DETECCIÓN DE LINCOMICINA EN
PLUMAS Y TEJIDOS COMESTIBLES DE POLLOS**

Francisca Natalia Yantén Isla

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

NOTA FINAL:.....

PROFESOR GUÍA : JAVIERA CORNEJO KELLY

PROFESOR CORRECTOR: LISETTE LAPIERRE

PROFESOR CORRECTOR: DANIELA IRAGÜEN

SANTIAGO, CHILE
2018

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Industria Avícola.....	3
Uso de antimicrobianos y sus consecuencias	3
Lincomicina: origen, espectro de acción, forma de administración, efectos adversos y farmacocinética.....	4
Límites máximos residuales para Lincomicina	5
Estudios de bioacumulación de antimicrobianos en plumas y depleción en tejidos comestibles en aves.....	6
Estudios de segmentación de plumas de aves.....	8
Estudio de harina de plumas.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Implementación del método analítico.....	11
Procedencia de las muestras	11
Reactivos y Estándares	11
Proceso de extracción de Lincomicina desde las matrices biológicas.....	12
Cálculo del límite de detección y límite de cuantificación	13
Parámetros para la validación de metodologías analíticas.....	13
Análisis Instrumental	14

Bioseguridad	15
RESULTADOS	16
Implementación de la metodología analítica.	16
Cálculo del límite de detección y límite de cuantificación de la metodología analítica...	20
Determinación de los parámetros de validación para la metodología analítica.....	22
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIÓN.....	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Masas de ion precursor, iones producto y tiempo de retención promedio de Lincomicina.	17
Tabla 2. Masas de ion precursor e ion producto del estándar interno Lincomicina d-3.	17
Tabla 3. Promedio, desviación estándar, y CV% de las 20 repeticiones fortificadas con 20 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ de Lincomicina en las matrices de músculo, hígado y plumas.	20
Tabla 4. Cálculo de LC para las matrices de músculo, hígado y plumas.	21
Tabla 5. Tiempos de retención de las seis inyecciones de droga pura y CV%.	22
Tabla 6. R^2 y CV% de las tres curvas de calibración en las matrices de músculo, hígado y plumas, en las siguientes concentraciones: 20, 40, 80, 120 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	24
Tabla 7. Pendientes y CV% de las tres curvas de calibración, en las matrices de músculo, hígado y plumas, en las siguientes concentraciones: 20, 40, 80, 120 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	24
Tabla 8. Promedio, Des. Est. y CV% de la recuperación de Lincomicina en la matriz de músculo a concentraciones de 20, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	25
Tabla 9. Promedio, Des. Est. y CV% de la recuperación de Lincomicina en la matriz de hígado a concentraciones de 20, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	25
Tabla 10. Promedio, Des. Est. y CV% de la recuperación de Lincomicina en la matriz de plumas a concentraciones de 20, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	25
Tabla 11. Promedio, Des. Est. y CV de la repetitividad para los tres niveles de fortificación de Lincomicina en las matrices de músculo, hígado y plumas.	27
Tabla 12. Promedio, Des. Est. y CV de la reproducibilidad para los tres niveles de fortificación de Lincomicina en las matrices de músculo, hígado y plumas.	28
Tabla 13. Comparación de los CV de la repetitividad y reproducibilidad intralaboratorio, en las matrices de músculo, hígado y plumas.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión cromatográfica de Lincomicina en la matriz de músculo. (A) Muestra blanco de músculo de pollo. (B) Muestra control de músculo de pollo.	17
Figura 2. Expresión cromatográfica de Lincomicina en la matriz de hígado. (A) Muestra blanco de hígado de pollo. (B) Muestra control de hígado de pollo.....	18
Figura 3. Expresión cromatográfica de Lincomicina en la matriz de plumas. (A) Muestra blanco de plumas de pollo. (B) Muestra control de plumas de pollo.	18
Figura 4. Curva de calibración fortificada a cinco concentraciones de la matriz de músculo.	18
Figura 5. Curva de calibración fortificada a cinco concentraciones de la matriz hígado. ...	19
Figura 6. Curva de calibración fortificada a cinco concentraciones de la matriz de plumas.	19
Figura 7. (A) Cromatograma de muestra blanco de músculo de pollo, representativa de 20 análisis, no existe interferente en el tiempo de retención del analito Lincomicina. (B) Inyección de droga pura de Lincomicina.....	22
Figura 8. (A) Cromatograma de muestra blanco de hígado de pollo, representativa de 20 análisis, no existe interferente en el tiempo de retención del analito Lincomicina. (B) Inyección de droga pura de Lincomicina.....	23
Figura 9. (A) Cromatograma de muestra blanco de plumas de pollo, representativa de 20 análisis, no existe interferente en el tiempo de retención del analito Lincomicina. (B) Inyección de droga pura de Lincomicina.....	23

RESUMEN

Se ha demostrado en estudios anteriores el traspaso de antibióticos a las plumas de pollos, presentando un comportamiento de eliminación más lento que en otros tejidos comestibles, como hígado y músculo, encontrándose en altas concentraciones, incluso después de respetar los periodos de resguardo establecidos para otros tejidos. Esto cobra relevancia debido a que las plumas son luego incorporada como una fuente de proteína en las dietas de animales de producción. Dado este escenario, es necesario un método analítico que permita la extracción de manera confiable, precisa, y reproducible en laboratorio para el analito Lincomicina en tejidos comestibles y plumas, dando paso posteriormente a un estudio de depleción en estas matrices, ya que no existen estudios anteriores para este antibiótico. Por lo que el objetivo de este estudio fue el desarrollo de una metodología analítica mediante LC-MS/MS, para la detección de Lincomicina en músculo, hígado y plumas, la cual se implementó y validó en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET). Se escogió como estándar interno Lincomicina d-3, metanol como solvente para la extracción y la columna SPE Florisil como paso de limpieza. Los resultados obtenidos indican que la metodología analítica implementada es válida, ya que cumple con los criterios de aceptación de los parámetros establecidos por la Comisión de decisión 2002/657/CE y por la FDA: VICH GL49, siendo específica, lineal, con recuperación adecuada y precisa. Se determinó un límite de detección de $20 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, y se calcularon límites de cuantificación entre 20,7 y $23,6 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para las tres matrices. Para la linealidad, todas las curvas de calibración mostraron un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0,99. Los rangos de recuperación estuvieron entre 98% y 101% para todas las concentraciones estudiadas. Basándose en estos resultados, es posible la utilización de esta metodología analítica como base para realizar estudios a futuro de depleción de Lincomicina en tejidos comestibles y plumas.

Palabras Claves: Validación de Metodología Analítica, Residuos, Lincomicina, Plum, LC-MS/MS.

ABSTRACT

The transfer of antibiotics to chicken feathers has been demonstrated in previous studies, showing a slower elimination than in other edible tissues such as liver and muscle, being found in high concentrations, even after respecting the established withdrawal times for other tissues. This becomes relevant because the feathers are incorporated as a source of protein in the diets of farm species. Given this scenario, an analytical method that allows the reliable, accurate and reproducible extraction in laboratory of Lincomycin analyte in edible tissues and feathers is needed, providing an analytical methodology to study the depletion in these matrices, since there are no previous studies for this antibiotic available in the literature. Therefore, the objective of this study was the development an analytical methodology through LC-MS/MS, for the detection of Lincomycin in muscle, liver and feathers, which was implemented and validated in the Veterinary Pharmacology Laboratory (FARMAVET). Lincomycin d-3 was used as the internal standard, methanol as drug solvent and Florisil SPE column for matrix clean up step. The results indicated that the analytical methodology implemented is valid, since it fulfills the acceptance criteria of the parameters established by Commission Decision 2002/657/CE and by FDA: VICH GL49, being specific, linear, with an adequate recovery and precise. A detection limit of $20 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ and a quantification limits between 20.7 and $23.6 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ were determined for the three matrices. For linearity, all calibration curves showed a coefficient of determination (R^2) higher than 0.99 . Recovery ranges were between 98% and 101% for all studied concentrations. Based on these results, it is possible to use this analytical methodology as a basis for future studies of depletion of Lincomycin in edible tissues and feathers.

Keywords: Validation of Analytical Methodology, Residues, Lincomycin, Feathers, LC-MS/MS.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos han sido una herramienta fundamental para el tratamiento de enfermedades en la industria avícola durante las últimas décadas. Si bien, estos son eficaces en el control y tratamiento de diferentes patologías bacterianas, su uso no está exento de riesgo cuando no son utilizados de la forma adecuada. De esta manera, el uso incorrecto de estas drogas en animales productivos puede derivar en la presencia de residuos de antimicrobianos en los productos o subproductos de origen animal, causando reacciones adversas, reacciones de hipersensibilidad, carcinogénesis, y cambios en la flora bacteriana normal.

Estudios recientes han demostrado que a pesar de que los límites máximos residuales (LMR) establecidos para tejidos comestibles sean respetados, altas concentraciones de antibióticos pueden permanecer en tejidos no comestibles tales como las plumas de aves.

Esto cobra relevancia ya que las plumas son usadas para la fabricación de harina de plumas, la cual es utilizada posteriormente para la alimentación de otros animales que van a consumo humano, como peces, cerdos, rumiantes e incluso aves de corral. De esta forma, se ha comprobado que la harina de plumas se transforma en una ruta de reingreso de antibióticos a la cadena alimenticia.

La Lincomicina es un antibiótico producido por *Streptomyces linconesis*, y pertenece a la familia de las Lincosamidas, junto con la Clindamicina. Es utilizada comúnmente en la industria avícola para el tratamiento de enfermedades entéricas. Además, en combinación con Espectinomicina puede ser utilizada para la artritis causada por *Staphylococcus aureus*.

A la fecha, no existen estudios que evalúen el comportamiento de las concentraciones de Lincomicina en subproductos de la industria avícola. Dada esta situación, es interesante estudiar su depleción en plumas y compararla con tejidos comestibles como hígado y músculo. Para poder realizar esto es necesario, en primer lugar, implementar una metodología analítica adecuada que permita la detección y cuantificación de Lincomicina en distintas matrices, entregando resultados precisos.

De esta forma, el objetivo de esta memoria es implementar y validar una metodología analítica que permita determinar la concentración de Licomicina en hígado, músculo y

plumas en pollos, obteniendo resultados confiables y que puedan ser reproducidos a posterioridad.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Industria Avícola

Actualmente, la industria avícola ha cobrado una gran importancia en el total de carnes producidas globalmente, alcanzando un 35% de la producción mundial. Con respecto a la situación nacional, se observa que la mayor cantidad de aves faenadas en el país corresponde a pollos, y la cantidad de toneladas han ido aumentando en los últimos veinte años, con algunos altibajos, pero la tendencia es positiva, siendo de 119% el aumento en la producción, en estas dos décadas (ODEPA, 2015).

La carne de pollo representa el 43% de todas las carnes consumidas en el país en el año 2014, esto se debe a que es la proteína animal más económica y accesible. Por otra parte, el valor de las exportaciones ha aumentado en 8,8% promedio anual entre los años 2005 y 2014. En 2012, se logró una cifra histórica de 100.714 toneladas exportadas desde el sector avícola. En el periodo de enero-febrero de 2015 se registró la exportación de 18.720 toneladas de carne de ave, donde el 76,5% corresponde a carne de pollo (ODEPA, 2015).

La industria avícola debido a su gran crecimiento se caracteriza por tener un sistema de producción intensiva, esto significa que el foco fundamental de un médico veterinario debe ser el control de enfermedades y la prevención de éstas (Landoni y Albarelllos, 2015).

Uso de antimicrobianos y sus consecuencias

Los antimicrobianos se comenzaron a utilizar por la medicina veterinaria en la década de 1950, y actualmente son usados frecuentemente en la producción animal en todo el mundo para el tratamiento de enfermedades con una morbilidad y mortalidad significativa (Mensah *et al.*, 2014; Gouvêa *et al.*, 2015; Landoni y Albarelllos, 2015).

El uso de estos fármacos, en particular en la producción animal, puede comprometer la salud humana a través de la selección de bacterias resistentes en animales y su transmisión a humanos mediante alimentos de origen animal y su dispersión en el medio ambiente (Gouvêa *et al.*, 2015). Basándose en estos antecedentes, es que la Unión Europea determinó en el año 2006, que los beneficios del uso de promotores de crecimiento en la producción no son lo suficientemente justificados, en comparación con el riesgo que puede producir en

la población, por lo que se prohíbe su uso como promotores del crecimiento en los alimentos para animales (EC, 2003; Anadón, 2006). Por el contrario, en Estados Unidos aún está autorizado el uso de un gran número de antimicrobianos en bajas dosis como promotores del crecimiento (Mensah *et al.*, 2014).

La presencia de residuos de antimicrobianos en los productos de origen animal puede ser perjudicial para la salud humana. Dentro de los efectos adversos se encuentran reacciones de hipersensibilidad, efectos carcinogénicos, efectos mutagénicos, efectos teratogénicos, cambios en la flora bacteriana normal y efectos tóxicos directos como la anemia aplásica producida por cloranfenicol (Gouvêa *et al.*, 2015; Beyene, 2016). Las causas más comunes de la presencia de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal son no respetar los periodos de resguardo, sobredosis de antibióticos y uso de antibióticos no permitidos para tratamiento en animales (Babapour *et al.*, 2012; Mensah *et al.*, 2014).

Lincomicina: origen, espectro de acción, forma de administración, efectos adversos y farmacocinética.

La Lincomicina es un antibiótico producido por *Streptomyces lincolnesis*, y pertenece a la clase de Lincosamidas, junto con la Clindamicina, que son los dos exponentes más importantes de este grupo. La molécula se caracteriza por incluir un aminoácido y un azúcar, unidos por un enlace amida (Röstel *et al.*, 2004). Este antimicrobiano actúa inhibiendo la síntesis proteica a nivel de la subunidad 50s del ribosoma, y dentro de su espectro de acción se encuentran bacterias Gram-positivas, como algunos *Streptococcus spp.* y *Staphylococcus*, y también actúa contra algunas bacterias anaerobias como es el caso de *Bacteroides spp.* No tienen efecto contra bacterias Gram-negativas (Stahl, 2009; Vardanyan y Hruby, 2016).

En la producción avícola la Lincomicina es usada comúnmente de forma oral en la comida y agua, para el tratamiento de enfermedades entéricas. Además, se encuentran formulaciones combinadas con Espectinomicina (Röstel *et al.*, 2004). En combinación con Espectinomicina puede ser utilizada para el tratamiento de artritis causada por *S. aureus* (Agunos *et al.*, 2012).

Algunos efectos adversos de la Lincomicina son reacciones de hipersensibilidad que normalmente son inespecíficas como eritema e hipertermia entre otras, causando muy rara vez anafilaxia; también son comunes las diarreas. (Stahl, 2009).

Existe escasa información con respecto a la farmacocinética de la Lincomicina en medicina veterinaria.

Con respecto a la farmacocinética en humanos, el único representante estudiado de este grupo es la Clindamicina, ya que es el antibiótico más utilizado debido a que su peak de concentración sérica obtenido es mucho más precoz y al menos dos veces más elevado que en el caso de la Lincomicina, siendo más eficiente (Stahl, 2009). La absorción digestiva de la Clindamicina es de aproximadamente 90% y esto es retardado por la alimentación, no siendo afectado el peak de concentración. En el caso de la Lincomicina la absorción es rápida, se puede detectar en plasma a los 15-30 minutos, pero al contrario de lo que sucede con la Clindamicina, si se afecta el peak de concentración sérica con la alimentación (Stahl, 2009). La Lincomicina se distribuye ampliamente en el organismo, y tiene una alta unión a proteínas plasmáticas. Su metabolismo es principalmente hepático (75-80%) y el restante es metabolizado en riñón (Röstel *et al.*, 2004).

En animales las Lincosamidas al igual que los macrólidos tienen buena biodisponibilidad después de la administración oral en el alimento o agua de bebida, sobre todo en el caso de animales monogástricos. Son eliminados mayormente por hígado, con una cantidad variable excretada por bilis (Pyörälä *et al.*, 2014; Landoni y Albarelllos, 2015).

Con respecto a los pollos específicamente, la Lincomicina tiene una vida media de 8,3 horas en bilis, y el metabolito más excretado es la Lincomicina entre 60%-80% (Röstel *et al.*, 2004).

Límites máximos residuales para Lincomicina

Los límites máximos residuales (LMR) para Lincomicina dispuestos por la Unión Europea en pollos son: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para músculo, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para hígado y 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para riñón (EMEA, 2002). Con respecto a los LMR establecidos en Chile en el caso de aves de corral, se rigen por la Resolución Exenta N° 551 de 2014, la cual se basa en el *Codex*

Alimentarius, siendo para músculo $200 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, para hígado $500 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ y para riñón $500 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ (Minsal, 2014).

En la actualidad existen estudios de depleción en tejidos comestibles de pollos, como músculo e hígado, para establecer los periodos de resguardo de los antibióticos y así no exceder los LMR definidos para ellos (Reyes-Herrera y Donoghue, 2008; Donoghue, 2003). En el caso de los subproductos de la industria avícola hay escasa información disponible en la literatura. Estos subproductos luego son incorporados a la cadena alimenticia de diferentes formas.

Específicamente, la harina de plumas es comercializada como fertilizante, como materia prima para la fabricación de biodiesel, como ingrediente en la elaboración de bioplásticos y como ingrediente en la comida de animales. Se puede utilizar en la alimentación de aves de corral, cerdos, rumiantes y peces. El reciclaje de éstas y su uso en la alimentación de animales cobra importancia por su potencial como una fuente alternativa y económica de proteína, lo que ayudaría a reducir el uso de soya y harina de pescado en las dietas. La harina de plumas añade palatabilidad, aumenta la cantidad de nutrientes y favorece la ganancia de peso (Bertsch y Coello, 2005; Love *et al.*, 2012). Sin embargo, diferentes autores han planteado que la harina de plumas es una potencial fuente de residuos de antibióticos que pueden pasar a través de la cadena alimenticia, cuando es utilizada para la alimentación de animales de producción (San Martín *et al.*, 2007).

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

San Martín *et al.* (2007), estudiaron la depleción de Enrofloxacino (ENR) y su metabolito Cirpofloxacino (CIP), en tejidos comestibles y no comestibles, como hígado, músculo, riñón y plumas, basándose en los LMR establecidos por la Unión Europea y Japón, planteando la posibilidad de que ENR y CIP pueden alcanzar tejidos no comestibles como plumas, debido a sus características farmacocinéticas. Los resultados arrojaron que las plumas tuvieron las más altas concentraciones de ENR y CIP comparados con las otras matrices.

Cornejo *et al.* (2010) realizaron un experimento similar al anterior, pero esta vez con el antimicrobiano Flumequina, en el cual la concentración en plumas era más elevada que en los otros tejidos comestibles (músculo e hígado). La posible explicación de la presencia de quinolonas en las plumas, es que podría deberse a las propiedades farmacocinéticas de éstas, ya que tienen un gran volumen de distribución, baja afinidad a proteínas plasmáticas y son altamente lipofílicas. Por eso pueden alcanzar grandes concentraciones en tejidos periféricos como piel y plumas. Además, a esto se le suma la lenta eliminación de Flumequina desde las plumas, que se explica por la reabsorción desde la pulpa vascularizada que rellena el eje de la pluma a lo largo de su maduración (Cornejo *et al.*, 2010).

Posteriormente Cornejo *et al.* (2012) realizaron otro estudio de depleción de Enrofloxacino y su metabolito Ciprofloxacino en plumas y tejidos comestibles (hígado y músculo). Se llegó a la conclusión de que éstos se mantuvieron en concentraciones más altas en plumas que en tejidos comestibles, y que estas concentraciones elevadas persistieron hasta el día 6 post tratamiento. La explicación respecto a que se encontraran las concentraciones más elevadas en las plumas se expone de la misma manera que en el estudio anterior de Cornejo *et al.* (2010), ya que el antimicrobiano Enrofloxacino y Ciprofloxacino también pertenecen a la familia de las Quinolonas, por lo tanto, su comportamiento es similar.

Publicaciones más recientes de Cornejo *et al.* (2016) y Cornejo *et al.* (2017), se realizaron estudios de depleción para Florfenicol y su metabolito Florfenicol amina y para Oxitetraciclina y su metabolito 4-epi-Oxitetraciclina. En ambos estudios se encontraron los mismos resultados mencionados anteriormente, viéndose una alta concentración en plumas en comparación a los otros tejidos estudiados. Para la explicación de los resultados obtenidos, también se exponía en los dos estudios la farmacocinética de las drogas, lo cual les permite a ambas llegar a las plumas. En el caso particular de la Oxitetraciclina, se describió que esta droga posee afinidad con la queratina, lo cual sería un factor que se suma para facilitar su llegada a las plumas.

Estudios de segmentación de plumas de aves.

Por su parte, Berendsen *et al.* (2013) realizaron un estudio de depleción con Oxitetraciclina, y al igual que en los estudios anteriores llegaron a la conclusión de que la acumulación en las plumas era mayor a la de los tejidos comestibles. Aparte de esto, sostuvieron que la acumulación del antimicrobiano en las diferentes partes del raquis de la pluma se relacionaba con el momento en que se le administraba el antimicrobiano al pollo.

Jansen *et al.* (2016) realizaron un experimento que buscaba determinar el tipo y extensión del tratamiento de pollos con Enrofloxacino y su metabolito Ciprofloxacino, mediante el análisis de las plumas en seis diferentes segmentos de longitud equitativa, y cierta cantidad de lavados para determinar si era contaminación externa o interna, separando en cantidades de residuos extraíbles y no extraíbles. Se crearon distintos grupos, donde cambiaban la forma de administración del Enrofloxacino, la duración del tratamiento y la edad en la cual se administraba. En conclusión, ellos sugirieron que es posible distinguir la contaminación externa de la interna comparando las cantidades relativas de residuos extraíbles y no extraíbles de Enrofloxacino. Además, pueden ser determinadas la duración y fecha aproximadas del tratamiento basándose en la distribución del antibiótico extraíble y no extraíble, en los diferentes segmentos de la pluma. Se propuso que, si se combinan ambos resultados, se puede determinar un estimado del tipo de tratamiento y su duración.

Estudio de harina de plumas.

Love *et al.*, (2012) analizaron harinas de plumas comercializadas en USA, obtenidas de diferentes estados y también de China. Se estudiaron 46 distintos antimicrobianos, y más de un tercio de éstos fueron detectados. En todas las muestras se encontró de dos a diez antimicrobianos, detectándose seis clases de drogas. Entre éstos se encontraron antimicrobianos que están prohibidos en USA. Por otra parte, realizaron un experimento de simulación del proceso de *rendering*, utilizando un autoclave a 121°C por 30 min en plumas fortificadas previamente con 17 tipos de antimicrobianos, donde se concluyó que solo existía una degradación parcial de algunos antimicrobianos, lo cual indica la persistencia de algunos de ellos. Además, se detectó que existía gran variabilidad de la estabilidad térmica dentro de las familias para sulfonamidas y tetraciclinas, sugiriendo que

las familias de antibióticos no serían necesariamente buenos predictores para la estabilidad térmica.

Considerando estos antecedentes, es interesante estudiar la depleción de Lincomicina, ya que en la actualidad no existe información disponible. Para poder llevar a cabo este estudio es necesario contar con un método analítico que sea confiable, preciso y adecuado para su uso en el laboratorio. Por lo tanto, en la presente memoria de título se implementará y validará una metodología analítica para la detección de Lincomicina en plumas y tejidos comestibles de pollos.

OBJETIVO GENERAL

Implementar y validar una metodología analítica para detectar Lincomicina en plumas y tejidos comestibles de pollos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar una metodología analítica para detectar Lincomicina en las matrices músculo, hígado y plumas.
2. Calcular el límite de detección y límite de cuantificación del método implementado para detectar Lincomicina en tejidos comestibles (músculo e hígado) y plumas.
3. Determinar los parámetros de validación de una metodología analítica para detectar Lincomicina en tejidos comestibles (músculo e hígado) y plumas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Implementación del método analítico

El trabajo de implementación y validación del método analítico se realizará en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, acreditado bajo la norma ISO 17025, Of 2005.

Para la detección de Lincomicina en tejidos comestibles y plumas se utilizará una metodología analítica para Lincomicina por LC-MS/MS, la cual será desarrollada en el laboratorio basándose en las características químicas de la Lincomicina y en lo establecido por Rocco *et al.* (2012) y Naveed *et al.* (2014).

Procedencia de las muestras

Para la validación del método se utilizarán muestras de hígado y músculo comerciales, que son analizadas previamente para asegurar que no exista presencia de Lincomicina. Las plumas provendrán de aves no tratadas con Lincomicina, las cuales serán previamente analizadas para asegurar la ausencia del antibiótico.

Reactivos y Estándares

Para el análisis y cuantificación de la Lincomicina en hígado, músculo y plumas serán utilizados estándares con pureza certificada Dr. Ehrenstorfer GmbH (98% de pureza). El estándar interno (EI) será Lincomicina isotópica d-3 de pureza certificada y adquirida de Toronto Research Chemicals (95% de pureza). El objetivo del estándar interno es corregir la señal y permitir cuantificar de la manera correcta. Lo ideal es que el estándar sea lo más similar posible al analito, es por esto que se ocupa un deuterado del mismo.

Para la determinación de Lincomicina en las matrices músculo, hígado y plumas se utilizarán los siguientes reactivos y solventes: agua destilada, desionizada generada en el laboratorio con el sistema Milli-Q (Milli-pore; resistencia $\geq 18,2$ M Ω), metanol grado HPLC (J.T. Baker o similar), hexano grado HPLC, etilacetato grado HPLC y columnas de extracción en fase sólida (SPE) FLORISIL Waters ®.

Proceso de extracción de Lincomicina desde las matrices biológicas

Las muestras como hígado y músculo serán procesadas en una picadora de alimentos, en particular el músculo se limpiará de la piel y grasa. En el caso de las plumas, previo a ser molidas en la picadora de alimentos, se les hará un tratamiento criogénico con nitrógeno líquido, para facilitar su trituración. En total se utilizarán dos procesadoras de alimento, una destinada a músculo e hígado, y otra para las plumas, con el fin de que no ocurra contaminación cruzada entre las distintas matrices.

Para la extracción de Lincomicina desde hígado y músculo, se pesará 1 gr. de muestra en un tubo Falcon de 50 ml., al cual se le añadirá el EI Lincomicina d-3 (20ng/g). Posteriormente para la extracción se agregará 20 ml de metanol HPLC y agitará por 15 min., se sonicará 10 min y finalmente se centrifugará por 10 min a 2790 g. El sobrenadante será filtrado por una columna de SPE FLORISIL (12cc) que será acondicionada con 10 ml. de hexano HPLC, y luego con una solución de metanol HPLC y etilacetato HPLC (8:2). Este filtrado se recibirá en un tubo falcon de 50 ml. que será evaporado bajo un flujo de nitrógeno entre 40-50 °C. Para reconstituir se utilizará 500 µl de una solución de metanol HPLC– agua Milli-Q (9:1), nuevamente será agitado (5 min.), sonicado (5 min.) y centrifugado en tubo eppendorf (10 min. a 17136 g). Finalmente se traspasará a un vial para lectura del equipo, mediante una jeringa de 1 ml. con filtro millex.

Para la extracción de Lincomicina en la matriz de pluma se pesará 1 gr. de muestra en un tubo falcon de 50 ml., al cual se le añadirá el EI Lincomicina d-3 (20ng/g). Luego se agregarán 40 ml. de metanol HPLC para la extracción, posterior a esto se agitará por 15 min., se sonicará por 10 min. y finalmente se centrifugará por 10 min. a 2790 g. El sobrenadante será transferido a otro tubo falcon de 50 ml. a través de un filtro de lana de vidrio, para luego ser filtrado por una columna de SPE FLORISIL (12cc) que será acondicionada previamente con 10 ml. de hexano HPLC, y luego con una solución de metanol HPLC – etilacetato HPLC (8:2). Este filtrado se recibirá en un tubo Falcon de 50 ml. que será evaporado bajo un flujo de nitrógeno entre 40-50° C. Para reconstituir se utilizará 500 µl de una solución de metanol HPLC– agua Milli-Q (9:1), nuevamente será agitado (5 min.), sonicado (5 min.) y centrifugado en tubo eppendorf (10 min. a 17136 g).

Finalmente se traspasará a un vial para lectura del equipo, mediante una jeringa de 1 ml. con filtro Millex.

Cálculo del límite de detección y límite de cuantificación

- i. **Límite de detección (LD):** para determinar el LD se fortificarán muestras a distintas concentraciones y se seleccionará la concentración en que la relación señal ruido es a lo menos 2 ó 3:1. Esta concentración seleccionada se repetirá 20 veces.
- ii. **Límite de cuantificación (LC):** al LD se le suma 1,64 veces la desviación estándar de los resultados obtenidos en las 20 muestras fortificadas analizadas previamente. Se aceptará si éste cumple con que la relación señal ruido sea como mínimo 10:1.

Parámetros para la validación de metodologías analíticas

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

- i. **Tiempo de retención del analito:** se analizarán seis repeticiones de droga pura, dentro de un mismo set de muestra (muestras que se analizan en un mismo momento). Se aceptará un coeficiente de variación (CV) de un 5% de variación.
- ii. **Especificidad:** se analizarán 20 muestras blanco de cada matriz, para visualizar si existe interferencia en la región de interés, en la cual se espera elusión de la Lincomicina.
- iii. **Linealidad de la curva de calibración:** se utilizarán cinco concentraciones siendo la concentración más baja igual al LD, se realizarán tres curvas y un análisis de sus pendientes. Se aceptarán los rangos de concentración si $R^2 \geq 0,95$ y el CV entre las pendientes sea $\leq 25\%$.

- iv. **Recuperación:** se realizarán seis curvas a tres concentraciones. Los niveles deben estar entre un 70-110%.
- v. **Precisión:** se obtiene mediante la repetitividad y la reproducibilidad intralaboratorio.
 - a. **Repetitividad:** se elegirán 18 muestras blancos de diferentes fuentes y se fortificarán al nivel de tres puntos de la curva de calibración (seis muestras fortificadas a cada nivel).
 - b. **Reproducibilidad intralaboratorio:** se realizarán seis curvas fortificadas de diferentes fuentes, a los mismos tres niveles que en el caso de la repetitividad, pero en días diferentes y operado por diferentes analistas.

Análisis Instrumental

El análisis de las muestras de hígado, músculo y plumas de aves se llevará a cabo mediante el uso de cromatografía líquida (bomba binaria Agilent 1260, autosampler Agilent 1290 y horno TCC Agilent 1290), acoplada a un espectrómetro de masas API 5500 de Applied Biosystems Sciex, que ofrece una respuesta rápida, de alta sensibilidad y una separación eficiente de todos los análogos de una familia o grupo de antibióticos.

Los valores obtenidos desde la cromatografía acoplada al espectrómetro de masas se expresan mediante un cociente entre el área bajo el pico obtenida desde el analito con el área bajo el pico obtenida desde el estándar interno, denominándose este resultado como área ratio, expresada en la siguiente formula:

$$\text{Área Ratio} = \frac{\text{Área de Analito}}{\text{Área de EI}}$$

Bioseguridad

Con respecto al manejo de agentes químicos de riesgo, se tomarán en consideración las indicaciones expuestas en el Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT (2008), adjuntándose en el anexo 1 el certificado del comité de bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

RESULTADOS

Objetivo Específico N°1:

Implementación de la metodología analítica.

La implementación del método analítico se desarrolló en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, de acuerdo a las características químicas que posee la Lincomicina, escogiéndose solventes que permitieran su extracción de manera adecuada y así tener una recuperación aceptable.

La Lincomicina tiene coeficiente de partición octanol/agua de LogP:0,56, que demuestra que tiene la capacidad de disolverse mejor en agua que en octanol (particularidad de simular bien el material lipídico). Por lo tanto, la Lincomicina es un analito hidrofílico (Rocco *et al.*, 2012). Por otra parte, según lo establecido en el estudio de Naveed *et al.* (2014), la Lincomicina no se degrada fácilmente frente a la exposición al calor, permitiendo la utilización de baño maría bajo flujo de nitrógeno.

En el estudio de Sollicec *et al.* (2014) se describió una metodología de extracción para cuatro antibióticos, entre ellos la Lincomicina, ocupando como matriz el estiércol, en la cual se utilizaba metanol en conjunto con buffer McIlvaine y Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) para la extracción de los analitos. En el caso del método implementado para Lincomicina en esta memoria de título, se ha escogido el metanol solamente, ya que es sólo un analito de interés, además de que el metanol tiene una polaridad alta, lo que permite que tenga afinidad con el analito Lincomicina (Basile y Dalena, 2018).

La columna SPE Florisil contiene gel de silicato de magnesio. Tiene la capacidad de absorber esteroides, esteres, lactonas, glicéridos, alcaloides y algunos carbohidratos. Es principalmente utilizada para la limpieza en extracciones desde matrices altas en grasas, porque retiene preferencialmente lípidos. Por lo tanto, es usada en esta metodología con el objeto de la limpieza de la muestra, en un paso conocido como *clean up* de la muestra (Zhang *et al.*, 2006; Zwir-Ferenc y Biziuk, 2006; Sigma Aldrich, 2003).

A partir de estos antecedentes se formularon dos cartas de trabajo con la metodología analítica para la extracción de los analitos; una carta para tejidos comestibles (músculo e hígado) y otra para plumas (Anexos 2 y 3), esto debido principalmente a que las plumas ocupan un mayor volumen dentro del tubo falcon y también porque quedan partículas de pluma en suspensión, aún después de la centrifugación, que entorpecen el paso por una columna directamente.

Finalmente, para determinar si el método analítico implementado extrae de forma adecuada el analito de interés a partir de las tres matrices trabajadas, se determinó su expresión cromatográfica mediante las masas y tiempo de retención específico para Lincomicina (Tabla 1), que se realizó con dos controles y un blanco (Figura 1, 2 y 3). Las masas del EI Lincomicina d-3 se pueden observar en la Tabla 2. Además, se determinó la linealidad del método ($R^2 > 0,95$) con una curva de calibración fortificada a cinco concentraciones: 20, 40, 80, 120 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, para cada una de las tres matrices (Figura 4, 5 y 6). Esto fue realizado bajo las condiciones cromatográficas descritas en el anexo 4.

Tabla 1. Masas de ion precursor, iones producto y tiempo de retención promedio de Lincomicina.

Analito	Ion Precursor	Iones producto	Tiempo de retención
Lincomicina	407	126	2,25 min
		359	

Tabla 2. Masas de ion precursor e ion producto del estándar interno Lincomicina d-3.

Analito	Ion Precursor	Iones producto	Tiempo de retención
Lincomicina	410	129	2,24 min

Figura 1. Expresión cromatográfica de Lincomicina en la matriz de músculo. (A) Muestra blanco de músculo de pollo. (B) Muestra control de músculo de pollo.

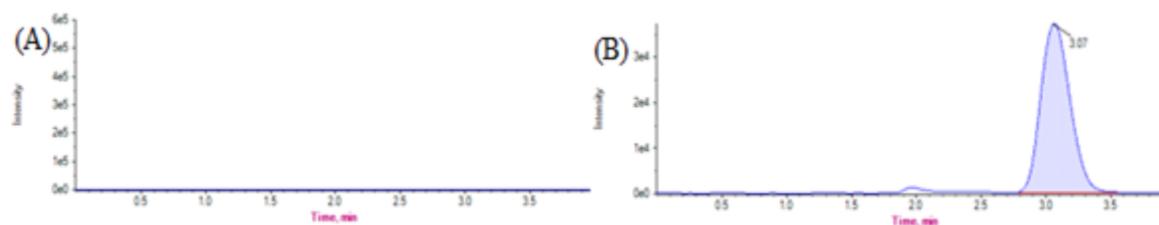


Figura 2. Expresión cromatográfica de Lincomicina en la matriz de hígado. (A) Muestra blanco de hígado de pollo. (B) Muestra control de hígado de pollo.

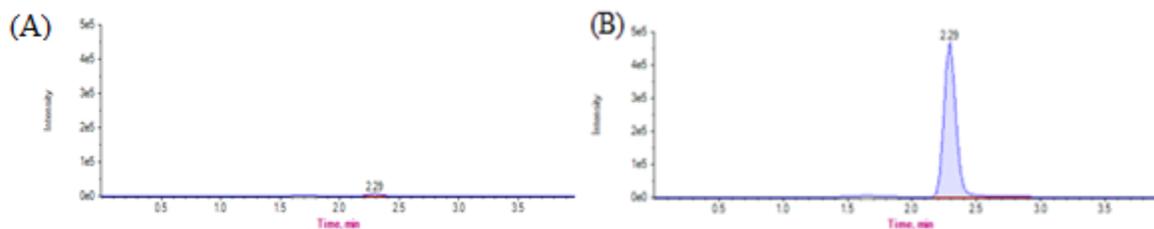


Figura 3. Expresión cromatográfica de Lincomicina en la matriz de plumas. (A) Muestra blanco de plumas de pollo. (B) Muestra control de plumas de pollo.

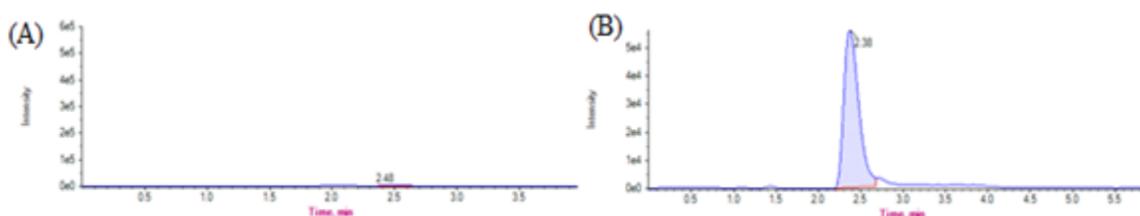


Figura 4. Curva de calibración fortificada a cinco concentraciones de la matriz de músculo.

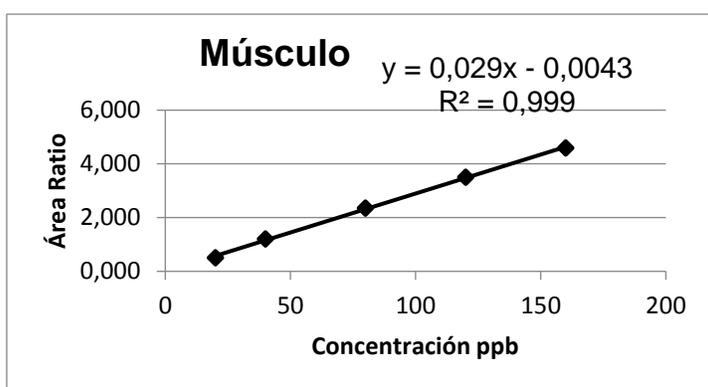


Figura 5. Curva de calibración fortificada a cinco concentraciones de la matriz hígado.

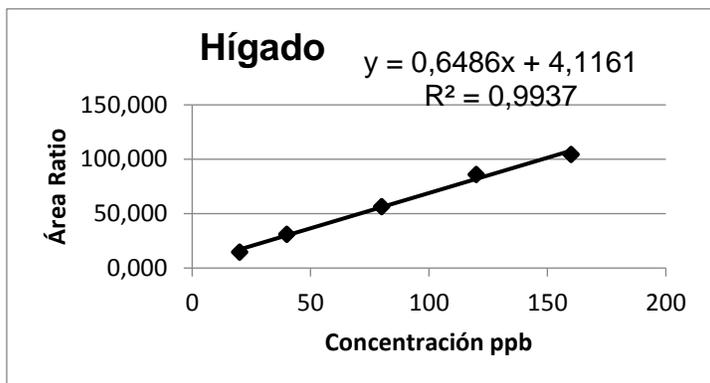
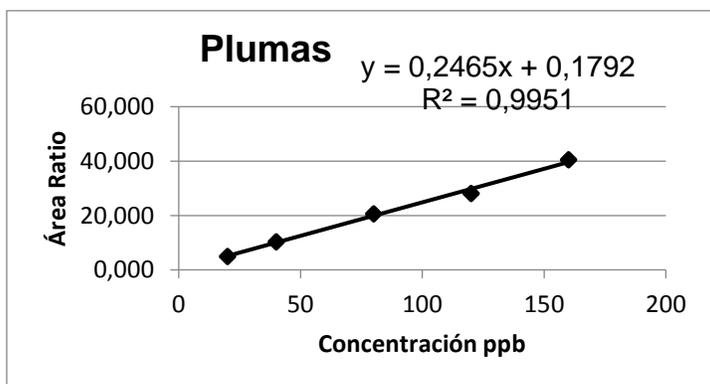


Figura 6. Curva de calibración fortificada a cinco concentraciones de la matriz de plumas.



Objetivo Específico N°2:

Cálculo del límite de detección y límite de cuantificación de la metodología analítica

Para el cálculo del límite de detección se realizaron curvas a distintas concentraciones, seleccionándose la concentración en donde la relación señal ruido fuese a lo menos 2 o 3:1, bajo este precepto se determinó que el límite de detección es de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ en las matrices de músculo, hígado y plumas. Establecido este límite de detección para las tres matrices se determinaron las concentraciones de trabajo de 20, 40, 80, 120 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, con el fin de realizar la validación de las metodologías analíticas según las recomendaciones de La Unión Europea: decisión de la comisión 2002/657/CE (EC, 2002) y la FDA: *VICH GL49 validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011).

Se realizaron 20 repeticiones a la concentración seleccionada de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para la validación del LD, en cada matriz. Los resultados mostrados en la Tabla 3 demostraron cumplir con los criterios establecidos, con un CV% menor al 25%.

Tabla 3. Promedio, desviación estándar, y CV% de las 20 repeticiones fortificadas con 20 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ de Lincomicina en las matrices de músculo, hígado y plumas.

Matriz	Promedio concentraciones 20 repeticiones ($\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$)	Desv. Est.	CV%
Músculo	21,298	0,405	1,90
Hígado	20,597	2,170	10,54
Plumas	20,023	1,517	7,58

El cálculo del LC se realizó mediante la suma de 1,64 veces la desviación estándar a la concentración promedio definida para el LD. El parámetro se aceptó bajo el precepto de que la relación señal ruido fue mayor a 10:1. Estos resultados por matriz se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Cálculo de LC para las matrices de músculo, hígado y plumas.

Matriz	Cálculo LC (LD + 1,64 DS de las 20 repeticiones)	LC ($\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$)
Músculo	$20 + 1,64 * 0,405$	20,7
Hígado	$20 + 1,64 * 2,170$	23,6
Plumas	$20 + 1,64 * 1,517$	22,5

Objetivo Específico N°3:

Determinación de los parámetros de validación para la metodología analítica

Tiempo de retención del analito

Se determinó el tiempo de retención para las tres matrices, mediante seis inyecciones de droga pura del analito Lincomicina, en donde se mantuvo constante presentando un CV menor a 5%. El tiempo de retención fue de 2,2 minutos en promedio con un CV de 0,24%. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Tiempos de retención de las seis inyecciones de droga pura y CV%.

Analito	Tiempo de retención (min)						Promedio	Desv. Est.	CV
	1	2	3	4	5	6			
Lincomicina	2,26	2,26	2,26	2,25	2,25	2,25	2,255	0,0055	0,24%

Especificidad

La especificidad de la metodología fue establecida mediante el análisis de 20 muestras blancas (libres de Lincomicina) para las matrices de músculo, hígado y plumas. Para las muestras realizadas, los resultados demostraron que no se encontraron interferentes en la zona de interés para las tres matrices. En las figuras 7, 8 y 9 se muestran los cromatogramas de muestras libres de Lincomicina de las matrices de músculo, hígado y plumas respectivamente, donde no se observan interferentes en el tiempo de retención del analito Lincomicina.

Figura 7. (A) Cromatograma de muestra blanco de músculo de pollo, representativa de 20 análisis, no existe interferente en el tiempo de retención del analito Lincomicina. (B) Inyección de droga pura de Lincomicina.

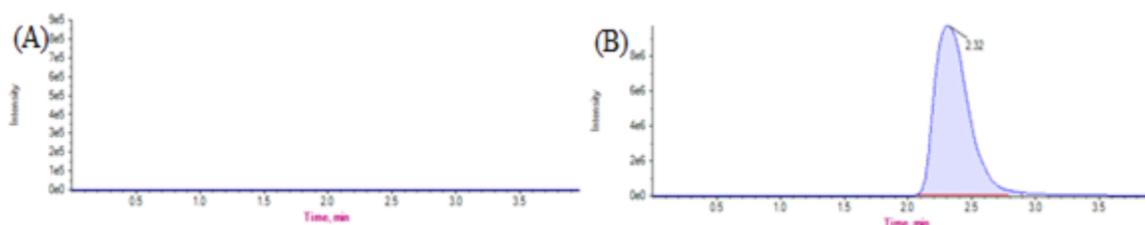


Figura 8. (A) Cromatograma de muestra blanco de hígado de pollo, representativa de 20 análisis, no existe interferente en el tiempo de retención del analito Lincomicina. (B) Inyección de droga pura de Lincomicina.

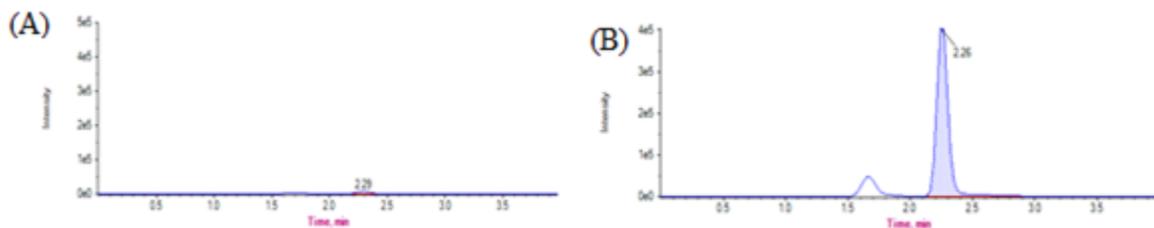
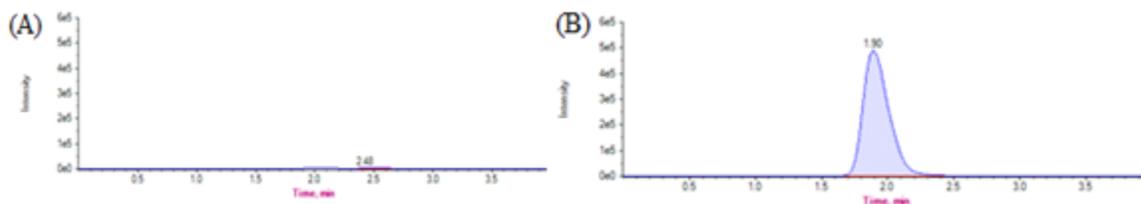


Figura 9. (A) Cromatograma de muestra blanco de plumas de pollo, representativa de 20 análisis, no existe interferente en el tiempo de retención del analito Lincomicina. (B) Inyección de droga pura de Lincomicina.



Linealidad de la curva

Para determinar la linealidad de la curva se realizaron tres curvas de calibración a cinco concentraciones para cada matriz, con las siguientes concentraciones: 20, 40, 80, 120 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$. Este parámetro fue aceptado ya que el coeficiente de determinación (R^2) en las tres matrices fue mayor o igual a 0,95. Sumado a esto, el CV entre las pendientes de las curvas de calibración fue menor a 25%, confirmando la aceptabilidad del parámetro. Los valores del R^2 y el CV de las pendientes para las tres curvas por cada matriz se muestran en la Tabla 6 y 7 respectivamente.

Tabla 6. R² y CV% de las tres curvas de calibración en las matrices de músculo, hígado y plumas, en las siguientes concentraciones: 20, 40, 80, 120 y 160 µg/kg⁻¹.

R ² de las curvas de calibración						
Matriz	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Prom.	Des. Est.	CV%
Músculo	0,9997	0,9997	0,9995	0,9996	0,0001	0,01
Hígado	0,9937	0,9966	0,9952	0,9952	0,0015	0,15
Plumas	0,9972	0,9983	0,9998	0,9984	0,0014	0,14

Tabla 7. Pendientes y CV% de las tres curvas de calibración, en las matrices de músculo, hígado y plumas, en las siguientes concentraciones: 20, 40, 80, 120 y 160 µg/kg⁻¹.

Pendientes de las curvas de calibración						
Matriz	Pendiente 1	Pendiente 2	Pendiente 3	Prom.	Des. Est.	CV%
Músculo	0,029	0,029	0,029	0,029	0,0003	1,04
Hígado	0,649	0,622	0,678	0,649	0,023	3,54
Plumas	0,239	0,246	0,239	0,242	0,003	1,33

Recuperación

La recuperación se calculó mediante la fortificación de muestras blanco a tres niveles de concentración 20, 80 y 160 µg/kg⁻¹. En la matriz de músculo el analito de Lincomicina tuvo una recuperación promedio entre 99% y 101%, con un CV de 4% y 2% respectivamente. Para la matriz de hígado el promedio de recuperación varió entre 98% y 101%, con un CV de 9% y 4% respectivamente. En el caso de las plumas el promedio de recuperación fue de un 100% para las tres matrices, con un CV entre 1% y 6%.

Según la Decisión 657/2002 de la Unión Europea y la FDA: VICH GL49, los rangos aceptables de recuperación para la concentración de trabajo son entre 70 a 110%. De

acuerdo con esto, las recuperaciones obtenidas son aceptadas, ya que cumplen con este parámetro.

En las Tablas 8, 9 y 10 se muestran los promedios, desviación estándar y CV% para el analito de Lincomicina en las distintas concentraciones y matrices trabajadas.

Tabla 8. Promedio, Des. Est. y CV% de la recuperación de Lincomicina en la matriz de músculo a concentraciones de 20, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$.

Matriz Músculo			
Concentración	Promedio recuperación	Des. Est.	CV%
20 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	98,78%	0,04	4
80 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	100,53%	0,02	2
160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	99,89%	0	0

Tabla 9. Promedio, Des. Est. y CV% de la recuperación de Lincomicina en la matriz de hígado a concentraciones de 20, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$.

Matriz Hígado			
Concentración	Promedio recuperación	Des. Est.	CV%
20 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	98,47%	0,09	9
80 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	100,67%	0,04	4
160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	99,86%	0,01	1

Tabla 10. Promedio, Des. Est. y CV% de la recuperación de Lincomicina en la matriz de plumas a concentraciones de 20, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$.

Matriz Plumas			
Concentración	Promedio recuperación	Des. Est.	CV%
20 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	100,02%	0,06	6
80 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	99,99%	0,03	3
160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	100,00%	0,01	1

Precisión

La precisión fue evaluada mediante dos parámetros, que son la repetitividad y la reproducibilidad intralaboratorio. En el caso de la repetitividad se realizaron seis curvas a tres concentraciones (20, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$), por un analista, el mismo día, con el mismo lote de reactivos y solventes, siendo analizadas el mismo día. La Tabla 11 muestra el cálculo del promedio, la desviación estándar y el CV para los tres niveles de fortificación para la repetitividad. En la Tabla 12 se puede observar los resultados de la reproducibilidad intralaboratorio, siendo al igual que en el caso de la repetitividad, efectuadas a los mismos niveles de concentración (20, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$), pero por dos analistas, en días diferentes y con lotes de reactivos y solventes distintos. Ambos resultados son comparados posteriormente.

Para las concentraciones de fortificación 20 y 80 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, los CV fueron menores a 35% para la reproducibilidad intralaboratorio, y en el caso de la concentración de 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ fue menor a un 23% de CV en el mismo parámetro, para el analito de Lincomicina, como está especificado en los criterios de validación de la FDA: VICH GL49 *validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011) y de la Decisión 657/2002 de la unión europea (EC, 2002). Por otra parte, los CV de la repetitividad fueron menores a los CV de la reproducibilidad intralaboratorio (Tabla 13). De acuerdo con este criterio los parámetros son aceptados, por ende, el método implementado es preciso.

Tabla 11. Promedio, Des. Est. y CV de la repetitividad para los tres niveles de fortificación de Lincomicina en las matrices de músculo, hígado y plumas.

Repetitividad				
Matriz	Concentración $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	Promedio	Des. Est.	CV%
Músculo	20	20	1,38	6,90
	80	80	2,42	3,02
	160	160	1,04	0,65
Hígado	20	19,2	2,40	12,51
	80	81,5	4,18	5,13
	160	159,4	1,78	1,12
Plumas	20	20,0	1,32	6,58
	80	79,8	2,33	2,92
	160	160,1	1,01	0,63

Tabla 12. Promedio, Des. Est. y CV de la reproducibilidad para los tres niveles de fortificación de Lincomicina en las matrices de músculo, hígado y plumas.

Reproducibilidad				
Matriz	Concentración $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	Promedio	Des. Est.	CV%
Músculo	20	19,8	2,21	11,18
	80	80,4	3,87	4,81
	160	157,6	1,66	1,04
Hígado	20	19,1	3,95	20,66
	80	81,6	6,91	8,47
	160	159,3	2,97	1,86
Plumas	20	20,0	1,82	9,08
	80	79,9	3,18	3,98
	160	160,0	1,36	0,85

Tabla 13. Comparación de los CV de la repetitividad y reproducibilidad intralaboratorio, en las matrices de músculo, hígado y plumas.

COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)							
Analito	Concentración $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	Músculo		Hígado		Plumas	
		Repetitividad	Reproducibilidad Intralaboratorio	Repetitividad	Reproducibilidad Intralaboratorio	Repetitividad	Reproducibilidad Intralaboratorio
Lincomicina	20	6,9	11,2	12,5	20,7	6,6	9,1
	80	3,0	4,8	5,1	8,5	2,9	4,0
	160	0,6	1,0	1,1	1,9	0,6	0,8

DISCUSIÓN

Si bien se han descrito metodologías analíticas para la detección de Lincomicina en otros estudios, como en los de Sin *et al.* (2004), Sin *et al.* (2004), Adams *et al.* (2009) y Kim *et al.* (2012), en distintas matrices, como músculo de pollo y de cerdo, leche, huevos, entre otras, el método analítico descrito en esta memoria de título no fue basado en ninguna publicación previa. Éste fue desarrollado en el laboratorio FARMAVET, de acuerdo a las características químicas de la Lincomicina y basándose en ello se escogieron los solventes a utilizar y los pasos incluidos en la metodología. De esta forma, se obtuvieron resultados que han permitido la validación de esta metodología de forma exitosa, con un método preciso, confiable y reproducible en laboratorio. Además, es la primera metodología analítica descrita que permite la detección de Lincomicina en plumas de pollos.

En primera instancia, se tuvo dos cartas de trabajo donde en el paso tres de los anexos 2 y 3, se agregaba como solvente metanol/agua en una proporción de 8:2, en vez de metanol, en las tres matrices que serían validadas. La modificación de este paso sucedió debido al tiempo de trabajo que significaba el mismo, ya que al agregar agua a la muestra se demoraba un aproximado de cinco horas el secado bajo flujo de nitrógeno, lo cual enlentecía el proceso en su totalidad, haciendo que el desarrollo de la metodología no fuera factible de realizar en un día de trabajo.

La validación de la metodología analítica fue llevada a cabo bajo las condiciones del laboratorio FARMAVET, necesarias para certificación bajo la norma ISO 17025, Of 2005, descritas en dicho documento. Con respecto al límite de detección, que corresponde a la concentración mínima que puede ser detectada del analito, en este caso Lincomicina, fue establecido en $20 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, mediante la realización de pruebas a distintas concentraciones, donde para las tres matrices se determinó una relación señal/ruido mayor a 3:1. El coeficiente de variación (expresado en %) para las 20 repeticiones a la concentración de $20 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, fue menor a 25% en las tres matrices, lo cual cumple con el criterio de aceptación determinado en la decisión 657/2002 de la Unión Europea (EC, 2002), indicando de esta manera que la media es representativa de los datos, por lo tanto los datos son homogéneos. El límite de cuantificación por otra parte, corresponde a la concentración mínima que puede ser cuantificable de manera confiable, que en el caso de esta metodología analítica se

determinó concentraciones para el LC de Lincomicina que variaron entre 20,7 y 23,6 para las matrices de músculo, hígado y plumas. En el caso de que la concentración de una muestra positiva sea menor al LC, pero mayor al $20 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ (LD), se puede determinar la presencia del analito, no así el valor de su concentración.

Las curvas de calibración fueron realizadas de acuerdo a los siguientes intervalos de trabajo: 20, 40, 80, 120, 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, con un promedio de $R^2 > 0,99$ para las tres matrices, superando el mínimo establecido de 0,95 como criterio de aceptación. El modelo matemático obtenido de las curvas de calibración se condice con una regresión lineal, donde la variable dependiente (y) corresponde al área ratio y la variable independiente (x) corresponde a la concentración. Esto implica que la respuesta entregada por el espectrómetro de masas (área ratio), es directamente proporcional a la concentración de analito detectada en la muestra.

La recuperación indica cual es la cantidad de analito extraída a partir de una matriz biológica, después de ser aplicada la metodología. Para las tres matrices trabajadas en esta memoria, la recuperación se encuentra dentro de los rangos establecidos por la decisión 657/2002 de la Unión Europea y la FDA: VICH GL49, donde fijan el rango de aceptación para las concentraciones trabajadas entre 70 y 110%. Los resultados reflejan una variación entre 98% y 101% para las matrices de músculo, hígado y plumas, demostrando que la metodología es capaz de extraer el analito de manera adecuada a partir de estas matrices.

La precisión expresa la cercanía de acuerdo entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestras de una muestra homogénea bajo las condiciones prescritas. Está conformada por dos parámetros, que son la repetitividad y la reproducibilidad intralaboratorio. Donde la repetitividad fue realizada con seis curvas a tres concentraciones (20, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) por el mismo analista, el mismo día y con el mismo lote de reactivos, pero en el caso de la reproducibilidad intralaboratorio, con la misma cantidad de muestra, se realizó por distintos analistas, en días distintos y con distintos lotes de reactivos. Los criterios de aceptación para la repetitividad es que su CV sea menor o igual al de la reproducibilidad y en el caso de la reproducibilidad es que el CV sea menor a 35% en concentraciones menores o iguales a $99 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ y menor a 23% en concentraciones mayores o iguales a $100 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, cumpliendo los dos parámetros en las tres matrices con

estos criterios de aceptación. Basándose en estos resultados, se concluye que la metodología analítica es repetitiva y reproducible, por ende, precisa, debido a la invariabilidad de la metodología bajo ciertas condiciones distintas.

La relevancia del desarrollo de una metodología analítica que permita la detección de Lincomicina en tejidos comestibles y plumas de pollo, radica en primer lugar, por la inexistencia de un método similar publicado en algún estudio anterior, lo cual permitiría realizar un estudio de depleción de Lincomicina en estas tres matrices. Por otra parte, se podría determinar si existe bioacumulación de Lincomicina en plumas, que es lo que ha sucedido en el caso de otros antibióticos, como Enrofloxacino, Flumequina, Florfenicol y Oxitetraciclina, que describen estudios realizados anteriormente por San Martin *et al.* (2007), Cornejo *et al.* (2010), Cornejo *et al.* (2012), Cornejo *et al.* (2016), Cornejo *et al.* (2017), que han demostrado una concentración de estos antibióticos mayor en plumas que en concentraciones detectadas en tejidos comestibles. Como existe esta bioacumulación de distintos antibióticos en las plumas, estudios de Berendsen *et al.* (2013) y Jansen *et al.* (2016) demuestran la importancia de las plumas como herramienta para en análisis de residuos de antibióticos registrados o de sustancias que estén prohibidas, debido a la lenta eliminación que ocurre en ellas, además, actuando como una fuente de matriz para muestreo no invasiva para pollos.

Sumado a lo anterior, en el estudio de Love *et al.* (2012) se estudiaron distintas muestras de harina de plumas, donde se detectaron en todas ellas residuos de antibióticos, en cantidades variables (de dos a diez familias de antibióticos), e incluso detectándose antibióticos que estaban prohibidos en ciertos países, como es el caso del Enrofloxacino en Estados Unidos. Por otra parte, realizaron un experimento de simulación de rendering, que les permitió determinar que, a pesar de este proceso, existía sólo degradación parcial de los antibióticos, permaneciendo en la harina de plumas.

Esto demuestra que puede existir la presencia de residuos antimicrobianos a través de la cadena alimenticia, ya que la harina de plumas es utilizada posteriormente en la alimentación de animales productivos, que finalmente van a consumo humano, transformándose en una problemática para la salud pública, ya sea por reacciones adversas en la población o por el desarrollo de la resistencia, siendo este último un tema de

relevancia mundial, provocando altos costos económicos y muertes para los países, estimados en el caso de la Unión Europea de aproximadamente €1.500 millones, con 25.000 muertes al año (ECDC, 2009).

Los LMR están diseñados con el objetivo de proteger a la población de efectos adversos que puedan producir, por ejemplo, residuos de medicamentos de uso veterinario en animales de producción. Existe un estudio de Gullberg *et al.* (2011), que habla sobre el desarrollo de la resistencia bacteriana a concentraciones muy bajas, concentraciones que pueden ser encontradas incluso en el medio ambiente, como en el agua o la tierra. Si bien, los LMR no están hechos con este fin, debiese ser considerado este antecedente para futuras investigaciones, ya que, aunque los alimentos de origen animal puedan estar dentro de los LMR, podría de todas formas desarrollarse una presión de selección de resistencia bacteriana, que finalmente termine afectando a la salud pública.

Dado todos estos antecedentes expuestos, es de gran relevancia poder realizar estudios posteriores que permitan comparar la depleción entre tejidos comestibles y plumas de pollos para el antibiótico de Lincomicina, siendo requerido una metodología analítica que lo permita, que es lo que en esta memoria de título se logró implementar con una validación que demostró que el método expuesto aquí es específico, lineal, con recuperación adecuada y preciso.

CONCLUSIÓN

El método analítico fue validado para las matrices de músculo, hígado y plumas bajo los parámetros establecidos por la Unión Europea: decisión de la comisión 2002/657/CE (EC, 2002) y la FDA: VICH GL49 *validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011). La validación fue desarrollada en su totalidad en el laboratorio FARMAVET siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 17025, Of 2005.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la validación, se puede determinar que la metodología analítica planteada en esta memoria de título es específica, lineal, con recuperación adecuada y precisa para el analito de Lincomicina en las matrices estudiadas, ya que cumplió con todos los criterios de aceptación establecidos, con un LD de $20 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, que permite la detección del analito por debajo de los LMR establecidos para las matrices de músculo e hígado.

El equipo utilizado para la identificación y cuantificación de Lincomicina en las muestras fue un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas API 5500, que brinda, a diferencia de otras técnicas que se pueden acoplar a cromatografía líquida, alta sensibilidad que permite la detección del analito a bajas concentraciones, alta selectividad, además de ser un método confirmatorio, siendo la elección de preferencia.

El método analítico implementado y validado para la detección de Lincomicina en las matrices de músculo, hígado y plumas en pollos, puede contribuir a posterioridad para el desarrollo de un estudio de depleción en estos tejidos, que demuestren si efectivamente en plumas se bioacumula este antibiótico, actuando finalmente las plumas como una ruta de reingreso de este mediante la cadena alimenticia, causando efectos negativos en la salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

- **ADAMS, S.; FUSELL, R.; DICKINSON, M.; WILKINS, S.; SHARMAN, M.** 2009. Study of the depletion of lincomycin residues in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies and the effect of the shook swarm procedure. *Anal. Chim. Acta* 637: 315-320.
- **AGUNOS, A.; LÉGER, D.; CARSON, C.** 2012. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. *Can Vet J* 53: 1289-1300.
- **ANADÓN, A.** 2006. The EU ban of antibiotics as feed additives (2006): alternatives and consumer safety. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 29(1): 41-46.
- **BABAPOUR, A.; AZAMI, L.; FARTASHMEHR, J.** 2012. Overview of antibiotic residues in beef and mutton in Ardebil, North West of Iran. *World Appl. Sci. J.* 19(10): 1417-1422.
- **BASILE, A.; DALENA, F.** 2018. Chapter 10: Methanol to Dimethyl Eter. **In:** *Methanol: Science and Engineering.* Elsevier. Massachusetts, USA. pp. 281–311.
- **BERENDSEN, B.; BOR, G.; GERRITSEN, H.; JANSEN, L.; ZUIDEMA, T.** 2013. The disposition of oxytetracycline to feathers after poultry treatment. *Food Addit. Contam.A*, 30(12): 2102-2107.
- **BERTSCH, A.; COELLO, N.** 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *J. Biortech.* 96: 1703-1708.
- **BEYENE, T.** 2016. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. *J. Veterinar. Sci. Technol.* 7(1).
- **CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.** 2008. Manual de Normas de Bioseguridad. CONICYT. 2ª ed. Santiago, Chile.
- **CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGÜEN, D.; PIZARRO, N.; HIDALGO, H.; SAN MARTÍN, B.** 2010. Depletion study of three formulations of flumequine in edible tissues and drug transfer into chicken feathers. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 34: 168–175.

- **CORNEJO, J.; GONZÁLEZ, P.; ARAYA, C.; MADDALENO, A.; SAN MARTÍN, B.** 2012. Transfer and depletion of enrofloxacin and its metabolite Ciprofloxacin in feathers of treated broiler chickens. Proceedings of the EuroResidue VII Conference Egmond aan Zee, The Netherlands.
- **CORNEJO, J.; POKRANT, E.; KROGH, M.; BRICEÑO, C.; HIDALGO, H.; MADDALENO, A.; ARAYA-JORDÁN, C.; SAN MARTÍN, B.** 2017. Determination of Oxytetracycline and 4-Epi-Oxytetracycline residues in feathers and edible tissues of broiler chickens using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Food Prot.* 80 (4): 619-625.
- **CORNEJO, J.; POKRANT, E.; RIQUELME, R.; BRICEÑO, C.; MADDALENO, A.; ARAYA-JORDÁN, C.; SAN MARTÍN, B.** 2016. Single-laboratory validation of an LC-MS/MS method for determining florfenicol (FF) and florfenicol amine (FFA) residues in chicken feathers and application to a residue-depletion study. *Food Addit. & Contam. A.* 34: 469-476.
- **DONOGHUE, D.** 2003. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? *Poult. Sci.* 82(4): 618-21.
- **EC. EUROPEAN COMMISSION.** 2002. Comisión 2002/657/EC of Journal European Communication (221): 8-36.
- **EC. EUROPEAN COMMISSION.** 2003. Regulation (CE) N° 1831/2003 of the European parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition.
- **ECDC. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL.** 2009. Latest Europe-wide data on antibiotic resistance. [en línea]. <http://ecdc.europa.eu/en/aboutus/organisation/director%20speeches/111117_marc_sprenger_eaad-2011.pdf>. [consulta: 02-01-2018].
- **EMEA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY.** 2002. Lincomycin: summary report. EMEA/MRL/824/02. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS. [en línea]

<http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014754.pdf > [consultado: 12-08-2016]..

- **FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2011. VICH GL49 validation of analytical methods used in residue depletion studies. 22 p.
- **GOUVÊA, R.; DOS SANTOS, F. F.; DE AQUINO, M.H.C.; PEREIRA, A.** 2015. Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a review. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 17(1): 1-10.
- **GULLBERG, E.; CAO, S.; BERG, O.; ILBÄCK, C.; SANDEGREN, L.; HUGHES, D.; ANDERSSON, D.** 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* 7 (7).
- **JANSEN, L.; BLOCK, Y.; BERENDSEN, B.** 2016. Feather segmentation to discriminate between different Enrofloxacin treatment in order to monitor off-label use in the poultry sector. *Anal. Bioanal. Chem.* 408: 495-502
- **LANDONI, M.; ALBARELLOS, G.** 2015. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *Vet. J.* 205: 21-27.
- **KIM, E.; BAHN, K.; KANG, E.; KIM, M.** 2012. Quantitative analysis of lincomycin and nasarin in poultry, milk and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 132: 1063-1070.
- **LOVE, D.; HALDEN, R.; DAVIS, M.; NACHMAN, K.** 2012. Feather meal: a previously unrecognized route of reentry into the food supply of multiple pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). *Environ. Sci. Technol.* 46: 3795-3802.
- **MENSAH, S.E.; KOUDANDÉ, O.D.; SANDERS, P.; LAURENTIE, M.; MENSAH, G.A.; ABIOLA, F.A.** 2014. Antimicrobial residues in foods of animal origin in Africa: public health risks. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 33(3): 987-96.

- **MINISTERIO DE SALUD. CHILE.** 2014. Reglamento sanitario de los alimentos. [en línea] <<http://web.minsal.cl/portal/url/item/e5170b805db7f7a4e040010165016226.pdf>> [consultado: 03-08-2016].
- **NAVEED, S.; NAZEER, S.; WAHEED, N.; QAMAR, F.** 2014. Degradation study of lincomycin by UV spectroscopy. African J. Basic & Appl. Sci. 6(5): 131-134.
- **OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS.** 2015. Actualización del mercado agrícola. [en línea] http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1428415820Aves201503.pdf [consultado: 23-07-2016].
- **PYÖRÄLÄ, S.; BAPTISTE, K.; CATRY, B.; DUIJKEREN, E.; GREKO, C.; MORENO, M.; FERREIRA, C.; RANTALA, M.; RAZAUSKAS, M.; SANDERS, P.; THREFALL, E.; TORREN-EDO, J.; TÖRNEKE, K.** 2014. Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance. Vet. J. 200: 230-239.
- **REYES-HERRERA, I.; DONOGHUE, D.** 2008. Antibiotic residues distribute uniformly in broiler chicken breast muscle tissue. J. Food Prot. 71(1): 223-225.
- **ROCCO, L.; PELUSO, C.; STINGO, V.** 2012. Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebrafish genomic damage induced by erythromycin and lincomycin. Environ. Toxicol. 10: 598-604.
- **RÖSTEL, B.; ZMUDZKI, J.; MACNELL, J.** 2004. Lincomycin. [en línea] <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-13-lincomycin.pdf> [consultado: 10-07-2016].
- **SAN MARTÍN, B.; CORNEJO, J.; IRAGÜEN, D.; HIDALGO, H.; ANADÓN, A.** 2007. Depletion study of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in edible tissues and feathers of white leghorn hens by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. J. Food Prot. 70(8): 1952-7.
- **SIGMA ALDRICH.** 2003. Florisil ®. [en línea] <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma->

2017].

- **SIN, D.; HO, C.; WONG, Y.; HO, S.; IP, A.** 2004. Simultaneous determination of lincomycin and virginiamycin M₁ in swine muscle, liver and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 517: 39-45
- **SIN, D.; WONG, Y.; IP, A.** 2004. Quantitative analysis of lincomycin in animal tissues and bovine milk by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. of Pharma. And Biomed. Anal.* 34: 651-659.
- **SOLLIEC, M.; MASSÉ, D.; SAUVÉ, S.** 2014. Analysis of trimethoprim, lincomycin, sulfadoxin and tylosin in swine manure using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Talanta* 128: 23-30.
- **STAHL, J.** 2009. Lincosamidas. *EMC – Tratado de Medicina* 13: 1-4.
- **VARDANYAN, R.; HRUBY, V.** 2016. Antibiotics. **In:** *Synthesis of Best-Seller Drugs*. Elsevier. Estados Unidos, Arizona. pp. 573-643.
- **ZHANG, W.; CHU, X.; CAI, H.; AN, J.; LI, C.** 2006. Simultaneous determination of 109 pesticides in unpolished rice by a combination of gel permeation chromatography and florisil column purification, and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 609-617.
- **ZWIR-FERENC, A.; BIZIUK, M.** 2006. Solid phase extraction technique-trends, opportunities and applications. *Polish J. of Environ. Stud.* 15(5): 677-690.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado del comité de bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.



CERTIFICADO N° 40

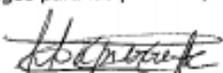
Santiago 21 de Noviembre 2014

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

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

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

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


LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

Coordinadora
Comité de Bioseguridad



Anexo 2. Metodología analítica para extracción de lincomicina a partir de las matrices de hígado y músculo.

Detección de lincomicina en hígado y músculo mediante HPLC-MS/MS
Metodología de extracción:
<ol style="list-style-type: none">1. Pesar $1 \pm 0,02$ gr. de muestra en tubo tipo Falcon de 50 ml.2. Agregar estándar interno (Lincomicina D3) a todas las muestras y fortificados.3. Agregar 20 ml de Metanol.4. Agitar por 15 min en vórtex.5. Sonicar 10 min.6. Centrifugar por 10 min a 5000 rpm.7. Pasar por columna SPE FLORISIL, previamente acondicionada con:<ol style="list-style-type: none">a) 10 ml de Hexanob) 10 ml de Metanol/Etilacetato (8:2)8. Recuperar en tubo falcon de 50 ml.9. Dejar secar bajo flujo de nitrógeno en baño de agua a 40-50°C.10. Reconstituir con 500 μl de solución Metanol/Agua (9:1).11. Agitar por 5 min en vórtex.12. Sonicar 5 min.13. Traspasar a microtubo Eppendorf de 1,5 ml.14. Centrifugar por 10 min a 13500 rpm.15. Pasar a un vial rotulado utilizando una jeringa de 1 ml con filtro millex.

Anexo 3. Metodología analítica para extracción de lincomicina a partir de la matriz de pluma.

Detección de lincomicina en plumas mediante HPLC-MS/MS
Metodología de extracción:
<ol style="list-style-type: none">1. Pesar $1 \pm 0,02$ gr. de muestra en tubo tipo Falcon de 50 ml.2. Agregar estándar interno (Lincomicina D3) a todas las muestras y fortificados.3. Agregar 40 ml de Metanol.4. Agitar por 15 min en vórtex.5. Sonicar 10 min.6. Centrifugar por 10 min a 5000 rpm.7. Filtrar el contenido a otro tubo falcon de 50 ml, mediante la utilización de un filtro de lana de vidrio en una jeringa de 10 ml.8. Pasar por columna SPE FLORISIL, previamente acondicionada con:<ol style="list-style-type: none">c) 10 ml de Hexanod) 10 ml de Metanol/Etilacetato (8:2)9. Recuperar en tubo falcon de 50 ml.10. Dejar secar bajo flujo de nitrógeno en baño de agua a 40-50°C.11. Reconstituir con 500 μl de solución Metanol/Agua (9:1).12. Agitar por 5 min en vórtex.13. Sonicar 5 min.14. Traspasar a microtubo Eppendorf de 1,5 ml.15. Centrifugar por 10 min a 13500 rpm.16. Pasar a un vial rotulado utilizando una jeringa de 1 ml con filtro millex.

Anexo 4. Condiciones cromatográficas del método analítico para la extracción de lincomicina a partir de las matrices de hígado, músculo y plumas.

**Condiciones cromatográficas para el método de extracción de lincomicina en hígado,
músculo y plumas mediante
HPLC-MS/MS**

- **Fases móviles:**
 - Fase móvil A (65%): Acetato de amonio 0,02% (pH 4,5).
 - Fase móvil B (35%): Ácido acético 0,1% en Acetonitrilo.
- **Flujo Bomba:**
 - 200µl/min
- **Columna:**
 - SunFire C18
- **Volumen de Inyección:**
 - 5 µl desde la muestra.
- **Temperatura horno:**
 - 30°C.