



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

**EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE FLORFENICOL Y
FLORFENICOL AMINA EN PLUMAS, GARRAS Y DEYECCIONES
DE POLLOS BROILER**

Ricardo Andrés Riquelme Fernández

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

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

PROYECTO FONDECYT DE INICIACIÓN EN INVESTIGACIÓN 11140530

SANTIAGO, CHILE
2016



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

**EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE FLORFENICOL Y
FLORFENICOL AMINA EN PLUMAS, GARRAS Y DEYECCIONES
DE POLLOS BROILER**

Ricardo Andrés Riquelme Fernández

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

NOTA FINAL:

PROFESORA GUÍA : JAVIERA CORNEJO KELLY

PROFESORA CORRECTORA : PILAR OVIEDO HANNIG

PROFESORA CORRECTORA : BETTY SAN MARTÍN NÚÑEZ

SANTIAGO, CHILE
2016

MEMORIA DE TÍTULO

“EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE FLORFENICOL Y FLORFENICOL AMINA EN PLUMAS, GARRAS Y DEYECCIONES DE POLLOS BROILER”

“EVALUATION OF CONCENTRATIONS OF FLORFENICOL AND FLORFENICOL AMINE IN FEATHERS, CLAWS AND FAECES OF BROILER CHICKENS”.

Ricardo Andrés Riquelme Fernández *

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

Financiamiento

Proyecto FONDECYT de Iniciación en Investigación 2014 (11140530) “Evaluación de la bioacumulación de residuos antimicrobianos en plumas de pollos broiler tratados con formulaciones farmacéuticas comerciales y su relación con la concentración de estos residuos en tejidos comestibles”.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Muchas gracias a mi familia (incluyendo a todas las mascotas), por su cariño, preocupación y apoyo incondicional. Siempre han sido un pilar fundamental en mi vida, y de no ser por ustedes, jamás habría llegado hasta este punto, los quiero mucho.

Gracias a mis amigos, que siempre están, con quienes siempre salen palabras de ánimo y risas que mejoran incluso momentos que ya son buenos. ¡Son grandes!

Gracias a la profe, por darme la oportunidad de trabajar en su proyecto, y por su apoyo, preocupación y compromiso con el desarrollo y consolidación de mi futuro como profesional.

Gracias a los tributos tesistas, con los que fue un gusto formar equipo, animándonos y acompañándonos entre todos; mención especial a Katia, quien siempre tuvo la disposición y la paciencia, para explicar cualquier duda que se me ocurría.

Muchas gracias a todos aquellos que de alguna u otra forma estuvieron presentes durante todo mi proceso académico, a la mami Adriana, Emilia, Lucy, y mi tía Dina y mi tío Juan, todos siempre pendientes de mí; a mi otra familia en Viña, con mención honrosa al Nonno, que me encomendaba en sus rosarios; a la Pauli y el equipo del LIA y a los chiquillos de FARMAVET.

Finalmente, muchas gracias a mi amor, por estar siempre, por aconsejarme y guiarme, por apoyarme, por calmarme, por animarme, por las alegrías y tristezas, y por ayudarme a ser mejor persona cada día; eres el otro pilar fundamental de mi vida, y sin ti, estaría cojo. Gracias por ser tú, cosa, te amo.

Richi

Dedicado a mi Tata Benja, a la tía Olga, y a la Nonna, que no pudieron estar, pero que con seguridad tienen un palco especial en el Cielo.

Always

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
HIPÓTESIS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Formulación farmacéutica	8
Animales experimentales	8
Grupos experimentales y muestreos	8
Reactivos y estándares	9
Metodología Analítica	9
Análisis instrumental	10
Cuantificación de los residuos de antimicrobiano en las muestras	10
Estudio de Depleción	10
Bioseguridad	11
RESULTADOS	12
Objetivo específico 1: Evaluar la depleción de FF y FFa en plumas de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de florfenicol.	12
Objetivo específico 2: Evaluar la depleción de FF y FFa en garras de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de florfenicol.	14
Objetivo específico 3: Evaluar la depleción de FF y FFa en deyecciones de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de florfenicol.	16
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	23

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXOS	29
Anexo 1: Certificado del Comité de Bioética FAVET.....	29
Anexo 2: Metodología analítica para la detección de florfenicol y florfenicol amina en plumas, por LC-MS/MS.....	30
Anexo 3: Metodología analítica para la extracción de florfenicol y florfenicol amina en garras, por LC-MS/MS	31
Anexo 4: Metodología analítica para la extracción de florfenicol y florfenicol amina en deyecciones, por LC-MS/MS.....	32
Anexo 5: Certificado Comité de Bioseguridad FAVET.....	33
Anexo 6: Datos de validación para la metodología analítica de extracción de florfenicol y florfenicol amina en plumas, por LC-MS/MS	34
Anexo 7: Datos de validación para la metodología analítica de extracción de florfenicol y florfenicol amina en garras, por LC-MS/MS	35
Anexo 8: Datos de validación para la metodología analítica de extracción de florfenicol y florfenicol amina en deyecciones, por LC-MS/MS	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nro. 1: Iones parentales y productos según analito.....	10
Tabla Nro. 2: Depleción de FF y FFa en plumas de pollos broiler	12
Tabla Nro. 3: Depleción de FF y FFa en garras de pollos broiler.....	14
Tabla Nro. 4: Depleción de FF y FFa en deyecciones de pollos broiler	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nro. 1: Depleción de FF y FFa en plumas de pollos broiler	13
Figura Nro. 2: Depleción de FF y FFa en garras de pollos broiler	15
Figura Nro. 3: Depleción de FF y FFa en deyecciones de pollos broiler	17

RESUMEN

El uso de antimicrobianos en sistemas de producción avícola es una herramienta eficaz para el control de enfermedades infecciosas. Sin embargo, residuos de estos fármacos pueden permanecer en productos y subproductos destinados a consumo humano o alimentación animal. A pesar de su uso en la industria avícola, no existen actualmente estudios de depleción de florfenicol en plumas, garras o deyecciones de pollos broiler. De esta manera, en la presente memoria de título se evaluaron las concentraciones de florfenicol (FF) y su metabolito activo, florfenicol amina (FFa), en dichas matrices.

Para evaluar la depleción de FF y FFa, se utilizaron tres metodologías analíticas por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), que permitieron detectar y cuantificar los analitos de interés. Las metodologías fueron previamente validadas. Las concentraciones de los analitos fueron calculadas a través de la ecuación del análisis de regresión lineal de las curvas de calibración, construidas en matriz fortificada con estándar certificado ($r \geq 0,95$).

El estudio de depleción del fármaco se realizó en un grupo de 80 pollos broiler criados bajo condiciones controladas, a los que se les administró un tratamiento con una formulación comercial de florfenicol al 10%, vía oral por cinco días. Para plumas, garras y deyecciones, se estableció un tiempo de depleción de 99, 45 y 28 días, respectivamente.

Palabras clave: Depleción, Residuos antimicrobianos, Florfenicol, Plumas, Garras, Deyecciones, LC-MS/MS.

ABSTRACT

The use of antimicrobials in poultry production systems is an effective tool for the control of infectious diseases. However, antimicrobial residues may remain in products and byproducts designated for human consumption or animal feed. Despite its use in poultry, depletion researches of florfenicol in feathers, claws and faeces of broiler chickens are lacking. Thus, in the present study, concentrations of florfenicol (FF) and its active metabolite, florfenicol amine (FFa), in feathers, claws and faeces of treated broiler chickens were evaluated.

To assess depletion of FF and FFa, three previously validated analytical methodologies by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS), to detect and quantify the analytes of interest, were implemented. The analyte concentrations were calculated by the equation from the linear regression analysis of calibration curves ($r \geq 0.95$), which were fortified using certified internal standard.

The drug depletion study was conducted in a group of 80 broiler chickens raised under controlled conditions, which were given a treatment with an oral commercial formulation of florfenicol 10%, for five days. In feathers, claws and faeces, a depletion-time of 99, 45 and 28 days, respectively, was established.

Keywords: Depletion, Antimicrobial residues, Florfenicol, Feathers, Claws, Faeces, LC-MS/MS.

INTRODUCCIÓN

La industria avícola se ha caracterizado por ser uno de los rubros del sector pecuario con mayor crecimiento, por sus importantes volúmenes de producción y alta demanda de productos. Además, a nivel global, la carne de ave se ha transformado en una fuente de proteína animal asequible, debido a los altos precios que poseen otras carnes. De hecho, en 2014, de los 311,8 millones de toneladas de carne producidos a nivel mundial, la carne de ave dio cuenta de alrededor un 35%, lo que equivale a 108,7 millones de toneladas. La industria avícola nacional ha evolucionado notablemente en las últimas décadas, alcanzando un beneficio de 22.365.329 aves en enero de 2015, lo que representa un 0,3% más que enero de 2014, y un 3,3% más que el promedio de enero de los últimos cinco años (ODEPA, 2015). En cuanto a exportación nacional, en 2012, Chile alcanzó la cifra histórica de 100.714 toneladas de carne, de las cuales el 79,8% correspondió a carne y subproductos de pollo, y un 20%, a carne y subproductos de pavo, siendo los principales destinos China, México, Estados Unidos (EEUU), Reino Unido, Perú y Puerto Rico, que en 2012 representaban el 72% del volumen total de exportación (ODEPA, 2013).

Los subproductos de origen animal pueden ser considerados como materia prima, o bien, como productos tradicionales de mayor valor agregado (Almeida *et al.*, 2012). En la industria avícola, estos residuos o subproductos poseen un alto valor nutricional (Herrera, 2008). Relevantes subproductos avícolas son las harinas, que pueden obtenerse a partir de plumas y garras, y que pueden ser utilizadas como ingredientes en dietas de animales de producción o mascotas. Las plumas además pueden ser utilizadas como fertilizante, mientras que, por su parte, las garras pueden ir a consumo directo. La cama de broiler, que incluye deyecciones, sustrato y restos de alimento y de plumas, puede ser utilizada como fertilizante en agricultura o como alimento de ganado (Bolan *et al.*, 2010).

Los agentes antimicrobianos se han empleado en aves de corral desde la década de los 50's como tratamiento de enfermedades bacterianas, mejorando la eficiencia de los sistemas productivos. Si bien son una eficaz herramienta en el control y tratamiento de diversas patologías de origen bacteriano, tanto para humanos como para animales, su uso en animales de abasto puede derivar en la presencia de residuos antimicrobianos en sus productos o subproductos. La presencia de residuos antibióticos en estos subproductos

representa un riesgo potencial para la salud pública, debido a los diversos efectos que pueden presentarse en humanos y animales, además de contribuir con el desarrollo de resistencia bacteriana.

Florfenicol es un antimicrobiano de la familia de los fenicoles, congénere de cloranfenicol y tiamfenicol, utilizado en aves de corral. Sin embargo, a la fecha no existe información sobre sus concentraciones en plumas, garras o deyecciones de pollos broiler, de modo que es necesario realizar estudios de depleción de este fármaco en las matrices señaladas.

En la presente memoria de título, se determinaron las concentraciones de florfenicol y su metabolito activo, florfenicol amina, en plumas, garras y deyecciones de pollos broiler tratados con dosis terapéuticas de florfenicol 10%. Esto permitió estudiar la transferencia de este fármaco a las matrices mencionadas, y así evaluar su rol como potenciales fuentes de reingreso de antimicrobianos a la cadena alimenticia y al medioambiente.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la cría intensiva de aves de corral, el retraso en el crecimiento de las aves se traduce en pérdidas económicas para el productor, por lo que se hace necesario el uso de agentes antimicrobianos con fines terapéuticos (Mestorino *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso de estos fármacos no está exento de riesgo, ya que se pueden generar residuos de medicamentos, tanto en tejidos comestibles como no comestibles (subproductos). La toxicidad potencial y efectos adversos dependen de factores como la frecuencia, vía y grado de exposición a ellos. Así, pueden producirse efectos tóxicos directos, inmunológicos (reacciones alérgicas), mutagénesis, carcinogénesis, teratogénesis y efectos a nivel de microflora intestinal, ya que bajas concentraciones de estas drogas generan una continua presión de selección en bacterias resistentes, que colonizan tejidos animales y alteran la flora normal (Martínez y Baquero, 2002; Anadón y Martínez-Larrañaga, 2012).

En el pasado, un antibiótico utilizado en animales productores de alimentos era cloranfenicol (CAF), por sus características farmacocinéticas, como su excelente distribución orgánica y amplio espectro de acción antimicrobiano, siendo altamente efectivo para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias en aves. Sin embargo, debido principalmente a que, en humanos, producía anemia aplásica irreversible, dosis independiente, y depresión de la médula ósea, su uso en animales productores de alimentos se prohibió en EEUU, la Unión Europea y otros países (Switała *et al.*, 2007; Mestorino *et al.*, 2011), incluyendo Chile (Chile, Ministerio de Agricultura, 1996). De hecho, la Comisión del Códex Alimentarius (2012) recomienda evitar la presencia de residuos de cloranfenicol o sus metabolitos en los alimentos, prohibiendo su uso en animales de producción, ya que no existe un nivel seguro que represente un riesgo aceptable para los consumidores. De este modo, surgió interés terapéutico por otros antimicrobianos de la misma familia, que presentaran un efecto terapéutico similar sin los efectos adversos descritos, como el florfenicol.

Florfenicol (FF) es un antibiótico sintético, de amplio espectro, desarrollado específicamente para uso veterinario (Chang *et al.*, 2010). Es activo a menores concentraciones que sus análogos estructurales, cloranfenicol y tiamfenicol (Anadón *et al.*, 2008), siendo un derivado de este último. Más aún, su estructura previene la acción de la

enzima bacteriana cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), la cual es el mecanismo más importante de resistencia antimicrobiana a cloranfenicol y tiamfenicol (Shen *et al.*, 2003). De este modo, florfenicol es especialmente efectivo contra bacterias entéricas resistentes a ellos, como *Enterobacter cloacae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Proteus vulgaris* y *Escherichia coli* (Park *et al.*, 2007). Dado que es un antimicrobiano con buena efectividad terapéutica, amplio espectro bacteriano y bajo riesgo de toxicidad, cada vez se vuelve más importante su uso en animales destinados a consumo humano (Chang *et al.*, 2010). La farmacocinética del florfenicol se ha caracterizado para acuicultura, ganado bovino, equinos, cerdos y pollos broiler, describiéndose que este fármaco posee una alta biodisponibilidad, alto volumen de distribución, buena penetración tisular (al fijarse a proteínas tisulares), presentando reabsorción a nivel de túbulos renales la fracción no unida a proteínas, y una vida media de eliminación corta a moderada en pollos broiler (Park *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2010; Mestorino *et al.*, 2011). Florfenicol es utilizado para el tratamiento de enfermedades infecciosas en avicultura, presentando alta biodisponibilidad oral e intramuscular (Shen *et al.*, 2003; Khalil *et al.*, 2012). En Chile, existen tres formulaciones comerciales registradas para su uso y comercialización en pollos broiler, una solución oral de florfenicol 10%, un polvo oral de florfenicol 50%, y una solución oral de florfenicol 2%; también hay fórmulas disponibles para salmonicultura, ganadería bovina y producción porcina (SAG, 2015).

Luego de su administración, florfenicol es metabolizado en florfenicol amina (FFa), ácido florfenicol oxámico y florfenicol alcohol. Aunque la relación de éstos puede variar entre especies, en la mayoría de los animales destinados a consumo, el principal metabolito en tejidos es florfenicol amina, por lo que está definido como un marcador de residuo de florfenicol (Xie *et al.*, 2011). A su vez, en Chile, el Ministerio de Salud (2014) estableció los siguientes límites máximos residuales (LMR) para florfenicol en aves destinadas a consumo: 100 µg/Kg en músculo, 200 µg/Kg en piel y grasa, 750 µg/Kg en riñón y 2500 µg/Kg en hígado, siendo iguales a los establecidos por la Unión Europea (CE, 2009a).

Dentro de la industria avícola, la harina de plumas es un subproducto de las plumas de aves de corral, y se utiliza como fertilizante, materia prima para biodiesel, ingrediente de

bioplásticos, y como ingrediente de piensos, siendo evaluada por palatabilidad, contenido nutricional y ganancia de peso animal (Love *et al.*, 2012). Las garras de pollo (porción de las patas debajo del espolón) se han convertido en un subproducto de exportación altamente rentable para la industria avícola (Bilgili *et al.*, 2005), pudiendo obtenerse gelatina comestible a partir de ellas (Almeida *et al.*, 2012). Así, las garras pueden ser destinadas a consumo directo o rendering (Jayathilakan *et al.*, 2012). Particularmente, el mercado chino presenta una alta demanda, tanto de carne como de subproductos provenientes de aves, que años atrás eran de bajo valor comercial (ODEPA, 2013). Por otra parte, la cama de broiler es una buena fuente de proteína, energía y minerales, por lo que se utiliza como alimento de ganado bovino, especialmente para cría y engorda, economizando la producción, ya que su uso como alimento cuadruplica su uso como fertilizante (Gadberry, 2014). Sin embargo, en Chile, los productores que desean entrar al Nivel A del programa de Planteles Animales Bajo Certificación Oficial (PABCO A) no pueden realizar esa práctica; más aún, importantes mercados de exportación para el país, como la Unión Europea, prohíben la comercialización de rumiantes alimentados con desechos avícolas (Rojas y Catrileo, 2006).

Existe escasa información en la literatura sobre el comportamiento de las concentraciones de antimicrobianos en subproductos no comestibles de aves. Estudios realizados por San Martín *et al.* (2007) y Cornejo *et al.* (2012) evaluaron la depleción de enrofloxacino y ciprofloxacino en tejidos comestibles y plumas de aves ponedoras, y en plumas de pollos broiler. Además, Cornejo *et al.* (2011) estudiaron la depleción de tres formulaciones de flumequina en tejidos comestibles y plumas de pollos. En dichos estudios, se describieron concentraciones en plumas más altas y por periodos de tiempo más prolongados que en tejidos comestibles. Berendsen *et al.* (2013) evidenciaron la bioacumulación de residuos farmacológicos en plumas de pollos tratados, incluso cuando las concentraciones en tejidos comestibles (músculo e hígado) no eran detectables, o eran menores a los límites máximos residuales (LMR), habiéndose respetado los períodos de carencia respectivos. Heinrich *et al.* (2013), por su parte, evidenciaron la bioacumulación de ceftiofur en plumas, un compuesto de matrices que incluía garras, y deyecciones de pollos tratados con este antimicrobiano. De esta forma, el uso de estos subproductos puede contribuir al reingreso de residuos antimicrobianos a la cadena alimenticia (Love *et al.*, 2012). A la fecha, existen escasos estudios de depleción antimicrobiana en garras de aves, a pesar de que también

pueden ser reincorporadas a la cadena alimenticia como ingrediente de harinas de carne y hueso, o bien, destinadas a consumo humano de forma directa. Cornejo *et al.* (2016) evaluaron la depleción de oxitetraciclina (OTC) y su metabolito (4-epímero) en garras de pollos broiler tratados en dosis terapéuticas, evidenciando concentraciones por tiempos más prolongados al período de resguardo definido para el fármaco.

Una gran cantidad de antibióticos usados en animales productores de alimentos destinados a consumo humano tienen una pobre absorción, pudiendo excretarse hasta el 90% en orina y un 75% en heces, por lo que es probable que, cuando los desechos animales se usan como fertilizante, una importante cantidad de antimicrobiano pueda presentarse en el medioambiente en forma de compuestos activos (Sarmah *et al.*, 2006). De este modo, la principal importancia del estudio de antibióticos en heces radica en que brinda información sobre su diseminación en el medioambiente; además, permite monitorear tendencias de uso, así como su uso indebido, y brinda información sobre la posible formación de resistencia bacteriana en la flora normal de los animales. Al respecto, se estudiaron muestras de heces en granjas de cerdos y bovinos, detectándose antibióticos en el 80% y 95%, respectivamente, con un 34% del total de las muestras conteniendo dos o más antibióticos, y en algunos casos, hasta ocho (Berendsen *et al.*, 2015). Por su parte, Berge *et al.* (2005) estudiaron los patrones de resistencia bacteriana en *Escherichia coli* de muestras fecales, luego de una dosis única de florfenicol en ganado bovino, en donde se observó un claro, pero transitorio, cambio a un número mayor de bacterias fecales resistentes. A la fecha, no hay estudios publicados de depleción de florfenicol en deyecciones de pollos broiler; dichos estudios debieran realizarse bajo condiciones de uso terapéutico (Khalil *et al.*, 2012).

En consecuencia, en la presente memoria de título, se evaluaron las concentraciones de florfenicol y su metabolito, florfenicol amina, en garras, plumas y deyecciones de pollos broiler, tratados terapéuticamente, con una formulación comercial de florfenicol 10%, estudiando la transferencia y depleción de este fármaco en esas matrices, para poder evaluar su rol en el reingreso del fármaco en la cadena alimenticia y el medioambiente.

HIPÓTESIS

“Los residuos de florfenicol y florfenicol amina, permanecen en plumas, garras, y deyecciones de pollos broiler tratados con este antimicrobiano, en concentraciones mayores a los límites máximos residuales establecidos para tejidos comestibles y por más tiempo que el período de resguardo definido para el fármaco”.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las concentraciones de florfenicol y florfenicol amina, durante la fase de depleción, en subproductos de pollos broiler tratados con dicho antimicrobiano de forma terapéutica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Evaluar la depleción de florfenicol y florfenicol amina en plumas de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de florfenicol.
- 2.** Evaluar la depleción de florfenicol y florfenicol amina en garras de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de florfenicol.
- 3.** Evaluar la depleción de florfenicol y florfenicol amina en deyecciones de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de florfenicol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta memoria de título se encuentra inserta en el marco del proyecto FONDECYT de Iniciación en Investigación 11140530 “Evaluación de la bioacumulación de residuos antimicrobianos en plumas de pollos broiler tratados con formulaciones farmacéuticas comerciales y su relación con la concentración de estos residuos en tejidos comestibles”.

Formulación farmacéutica

Se utilizó un polvo comercial para administración oral de florfenicol 10%, con un período de resguardo de 30 días, y cuyo uso se encuentra disponible para aves de corral.

Animales experimentales

Se utilizaron 80 pollos broiler de genética Ross 308, los cuales fueron mantenidos desde el día 1 en baterías de crianza bajo condiciones ambientales controladas ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ de temperatura; 50 - 60% de humedad relativa), agua *ad libitum*, y alimento libre de medicación, el cual se preparó de acuerdo a los requerimientos nutricionales de la raza. Las jaulas contaron con un piso elevado de alambre, para prevenir contaminación fecal. Las aves fueron criadas y monitoreadas a lo largo de todo el experimento en las dependencias del Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La mantención y el sacrificio de los animales experimentales cumplieron con las regulaciones de Bienestar Animal, aprobadas por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Ver certificado en el Anexo 1). El protocolo de manejo y supervisión se basó en la Ley N°20.380 “Sobre Protección de Animales” (Chile, Ministerio de Salud, 2009) y en la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (CE, 2010). Además, para el sacrificio de las aves, se acató el Reglamento N°1099/2009 sobre la protección de animales en el momento de la matanza (CE, 2009b).

Grupos experimentales y muestreos

Siguiendo las indicaciones de EMEA (1996), se consideró un total de 80 aves, las cuales fueron separadas aleatoriamente en 2 grupos experimentales. El grupo A contó con 64 aves, las cuales fueron tratadas con la formulación comercial de florfenicol 10%. El grupo B contó con 16 aves, y fue mantenido como grupo control sin tratamiento. Para asegurar la

ingestión completa de la dosis, los animales fueron tratados individualmente, administrando una dosis terapéutica de 30 mg/kg PO una vez al día, durante cinco días consecutivos. Debido al amplio período de resguardo, el tratamiento debió realizarse entre los días 6 y 10 de vida de los animales experimentales. Se efectuaron 8 muestreos en los días 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, y 40 post-tratamiento, sacrificando 8 aves del grupo A y 2 aves del grupo B en cada uno de ellos. Se obtuvieron muestras de las plumas y garras de las aves. En el caso de las deyecciones, se obtuvo una muestra de la jaula del grupo A y otra del grupo B. Las muestras fueron almacenadas a -20°C, para su posterior procesamiento, extracción y subsecuente análisis cromatográfico.

Reactivos y estándares

Para el análisis y la cuantificación de los analitos, se utilizaron estándares de pureza certificada, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Sigma Aldrich o equivalentes. Como estándar interno, se utilizó un estándar isotópico de pureza certificada: cloranfenicol-d5 (Dr. Ehrenstorfer GmbH o equivalente). Todos los solventes utilizados fueron de grado HPLC, mientras que los reactivos, de grado analítico (Fisher, Merck o equivalentes).

Metodología Analítica

Para la determinación de florfenicol y florfenicol amina en plumas, garras y deyecciones de pollos broiler, no existían métodos analíticos descritos a la fecha en la literatura, por lo que se implementaron y validaron tres métodos de extracción por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (LC-MS/MS), detallados en los Anexos 2, 3 y 4. El desarrollo de estas metodologías se realizó en base a las publicaciones de Hormazábal *et al.* (1993), Li *et al.* (2006) y Zhang *et al.* (2008), en las cuales se detecta florfenicol y florfenicol amina en músculo e hígado de peces; músculo, hígado y riñones de cerdo; y músculo de pollos, respectivamente.

Previa extracción de los analitos, las muestras de plumas fueron molidas en una picadora de alimento, y luego en otra, de nivel industrial, a la que se le agregó nitrógeno líquido. Las garras, por otra parte, fueron trozadas y posteriormente molidas en una picadora de alimento. Las deyecciones fueron homogeneizadas dentro de la misma bolsa en la que fueron recolectadas.

Análisis instrumental

El análisis instrumental de las muestras se llevó a cabo por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masa API 5500 de AB Sciex. Como criterio de identificación de los analitos, se utilizaron los iones parentales y los iones productos cuantitativos y cualitativos, especificados en la tabla nro. 1.

Tabla Nro. 1: Iones parentales y productos según analito.

Analito	Ión Parental	Iones Productos
Florfenicol (FF)	356,0	336,0 y 185,0
Florfenicol amina (FFa)	248,0	230,0 y 130,0

(Zhang *et al.*, 2008)

Cuantificación de los residuos de antimicrobiano en las muestras

Las concentraciones de florfenicol y florfenicol amina fueron evaluadas en plumas, garras y deyecciones de aves tratadas, cuantificando los residuos presentes en las matrices en los días de muestreo escogidos, utilizando la ecuación del análisis de regresión $y = a + bx$ (donde y es el área, a es el intercepto en y , b es la pendiente y x es la concentración) de las curvas de calibración de matrices fortificadas. Las plumas, garras y deyecciones del grupo B de aves se utilizaron como muestras blanco para controles positivos y fortificados, requeridos en cada lote de análisis, para la construcción de dichas curvas de calibración. Las muestras blanco fueron fortificadas a concentraciones diferentes y equidistantes, con un coeficiente de determinación $R^2 \geq 0,95$. El análisis de los datos se realizó según las indicaciones de EMEA (1996).

Estudio de Depleción

Los resultados de las muestras se llevaron a una gráfica en escala semilogarítmica de concentración versus tiempo, a la cual se le realizó un análisis de regresión lineal, considerando un nivel de confianza del 95%. A partir de esta gráfica, se logró definir el día en que las concentraciones fueron iguales o menores al límite de detección (LD) establecido para las técnicas.

Bioseguridad

La extracción de las muestras, y su respectivo análisis cromatográfico, se realizó en las dependencias del Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, el cual se encuentra acreditado bajo la norma ISO 17025 Of.2005. Además, en cuanto al trabajo con animales experimentales y manejo de agentes químicos de riesgo, se consideraron las indicaciones del Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT (2008) (Ver certificado en Anexo 5).

RESULTADOS

Previa extracción de los analitos, se realizó una validación *in-house* de los métodos analíticos utilizados para cada matriz, generando un protocolo interno, de acuerdo a las recomendaciones de la Comisión Europea (2002) y la FDA (2011). Los parámetros evaluados fueron Tiempo de Retención (TR), Especificidad, Límite de Detección (LD), Límite de Cuantificación (LC), Linealidad de la Curva de Calibración, Recuperación y Precisión (Repetitividad y Reproducibilidad Intralaboratorio). Los datos obtenidos en la validación de las metodologías utilizadas para plumas, garras y deyecciones de pollos broiler, se encuentran en los Anexos 6, 7 y 8, respectivamente.

Objetivo específico 1: Evaluar la depleción de florfenicol y florfenicol amina en plumas de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de florfenicol.

Las concentraciones de FF y FFa en plumas de pollos broiler fueron cuantificadas mediante un análisis de regresión lineal a las curvas de calibración de matriz fortificada ($r \geq 0,95$). Se evidenció una tendencia a la disminución en las concentraciones de florfenicol y florfenicol amina, especificadas en la tabla nro. 2.

Tabla Nro. 2: Depleción de florfenicol y florfenicol amina en plumas de pollos broiler

Número de Muestreo	Días Post Tratamiento	Edad Pollos (Días)	Concentración FF Promedio ($\mu\text{g/Kg}$)	Concentración FFa promedio ($\mu\text{g/Kg}$)	Promedio Final FF + FFa ($\mu\text{g/Kg}$)
1	5	15	3701,86	459,46	4161,32
2	10	20	1922,28	72,84	1976,91
3	15	25	1872,95	26,96	1876,80
4	20	30	588,79	ND*	588,79
5	25	35	432,19	36,42	459,50
6	30	40	221,79	28,78	228,98
7	35	45	172,80	ND*	172,80
8	40	50	116,23	ND*	116,23

*No detectado (Bajo el Límite de Detección)

El tiempo de depleción para plumas se estableció siguiendo las indicaciones de EMEA (1996). Los resultados se llevaron a una gráfica en escala semi-logarítmica de concentración versus tiempo (Figura nro. 1), y se les realizó un análisis de regresión lineal, considerando un nivel de confianza del 95%. A partir de esta gráfica, se definió el día en que las concentraciones fueron iguales o menores al LD establecido para la técnica. En el caso de las plumas, el LD se alcanzó a los 98,930 días. Debido a que este valor coincide con una fracción de un día, el tiempo de depleción se considera adicionando otro día, por lo que finalmente sería de 99 días.

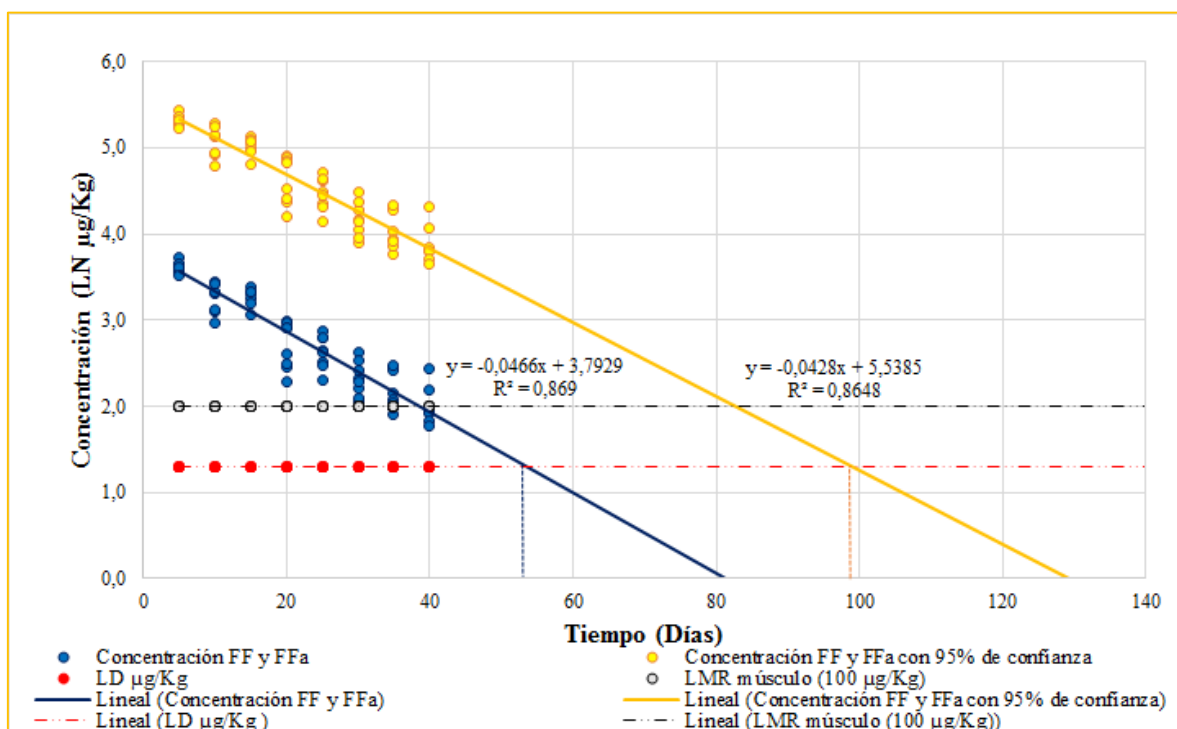


Figura Nro. 1: Depleción de florfenicol y florfenicol amina en plumas de pollos broiler

Objetivo específico 2: Evaluar la depleción de florfenicol y florfenicol amina en garras de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de florfenicol.

Se evaluaron las concentraciones de FF y FFa en garras de pollos broiler, usando un análisis de regresión lineal en las curvas de calibración de matriz fortificada ($r \geq 0,95$). En la tabla nro. 3, se aprecian las concentraciones obtenidas a lo largo del estudio.

Tabla Nro. 3: Depleción de florfenicol y florfenicol amina en garras de pollos broiler

Número de Muestreo	Días Post Tratamiento	Edad Pollos (Días)	Concentración FF Promedio ($\mu\text{g/Kg}$)	Concentración FFa promedio ($\mu\text{g/Kg}$)	Promedio Final FF + FFa ($\mu\text{g/Kg}$)
1	5	15	484,37	ND*	484,37
2	10	20	241,83	ND*	241,83
3	15	25	83,11	ND*	83,11
4	20	30	ND*	ND*	ND*
5	25	35	ND*	ND*	ND*
6	30	40	ND*	ND*	ND*
7	35	45	ND*	ND*	ND*
8	40	50	ND*	ND*	ND*

*No detectado (Bajo el Límite de Detección)

Se estableció el período de resguardo para garras, siguiendo las indicaciones de EMEA (1996). Las concentraciones se llevaron a una gráfica en escala semi-logarítmica de concentración versus tiempo (Figura nro. 2), y se les realizó un análisis de regresión lineal, considerando un nivel de confianza del 95%. Esto permitió definir el momento en que las concentraciones alcanzaron el LD establecido para la técnica. En el caso de las garras, el LD se alcanzó a los 44,841 días. Del mismo modo que para plumas, este valor coincide con una fracción de un día, por lo que el período de resguardo se considera adicionando otro día, siendo finalmente de 45 días.

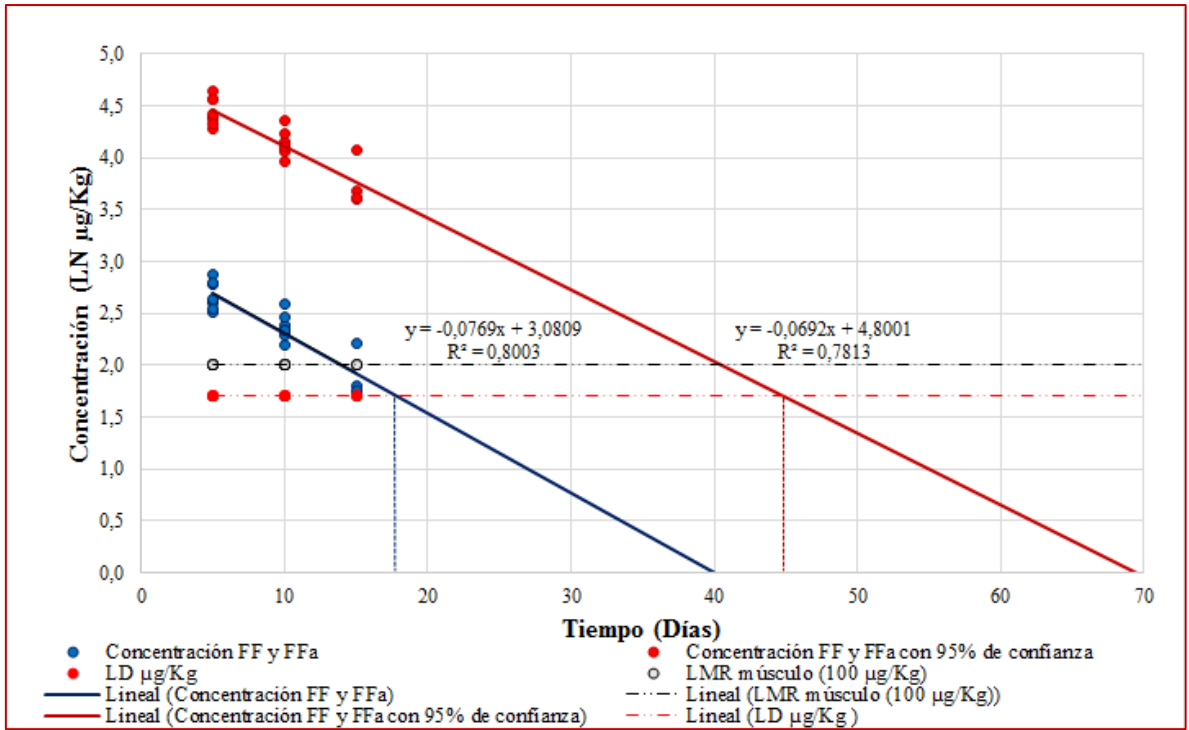


Figura Nro. 2: Depleción de florfenicol y florfenicol amina en garras de pollos broiler

Objetivo específico 3: Evaluar la depleción de florfenicol y florfenicol amina en deyecciones de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de florfenicol.

Las concentraciones de FF y FFa en deyecciones de pollos broiler se evaluaron con el análisis de regresión lineal en las curvas de calibración de matriz fortificada ($r \geq 0,95$). La tabla nro. 4 denota las concentraciones de los analitos obtenidas en cada muestreo.

Tabla Nro. 4: Depleción de florfenicol y florfenicol amina en deyecciones de pollos broiler

Número de Muestreo	Días Post Tratamiento	Edad Pollos (Días)	Concentración FF Promedio ($\mu\text{g/Kg}$)	Concentración FFa promedio ($\mu\text{g/Kg}$)	Promedio Final FF + FFa ($\mu\text{g/Kg}$)
1	5	15	455,63	112,72	568,35
2	10	20	71,61	64,62	136,23
3	15	25	ND*	ND*	ND*
4	20	30	ND*	ND*	ND*
5	25	35	ND*	ND*	ND*
6	30	40	ND*	ND*	ND*
7	35	45	ND*	ND*	ND*
8	40	50	ND*	ND*	ND*

*No detectado (Bajo el Límite de Detección)

Se determinó el tiempo de depleción para deyecciones, siguiendo las indicaciones de EMEA (1996). En la figura nro. 3 puede apreciarse la gráfica en escala semi-logarítmica de concentración versus tiempo, en la que se ingresaron los resultados, y a la cual se le realizó un análisis de regresión lineal, considerando un nivel de confianza del 95%. Gracias a esto, se definió el día en que las concentraciones alcanzaron el LD establecido para la técnica. Para las deyecciones, el LD se alcanzó a los 26,392 días, por lo que el tiempo de depleción, finalmente, es de 27 días.

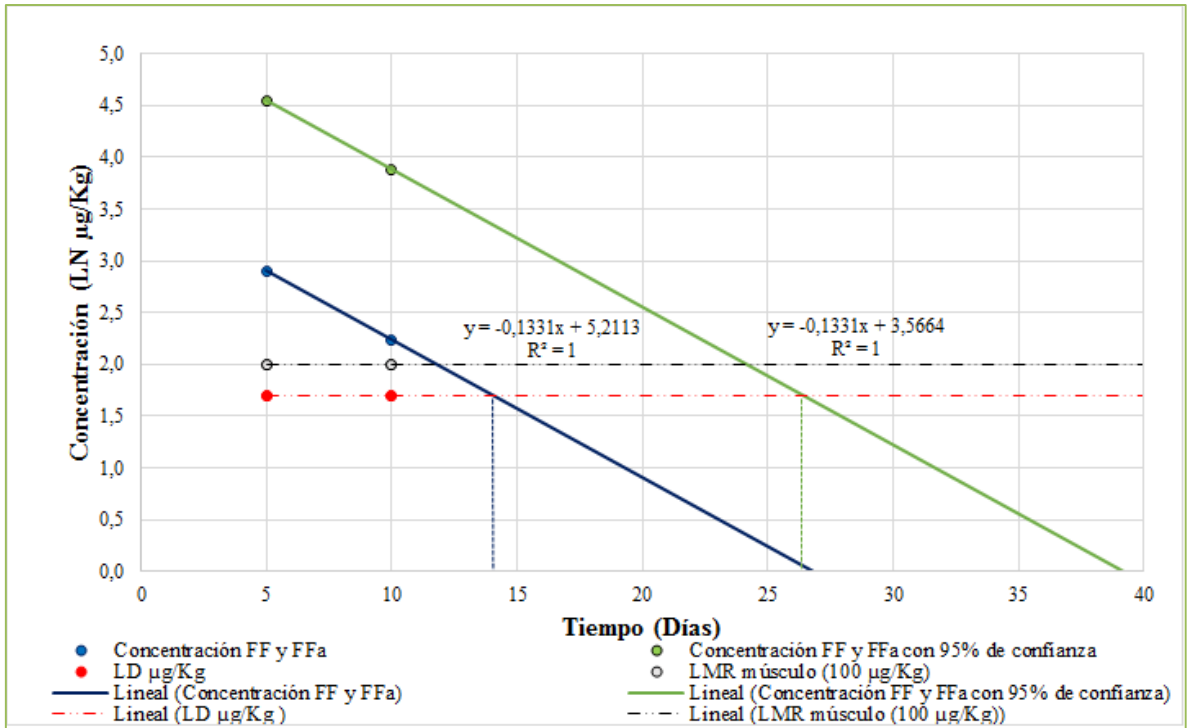


Figura Nro. 3: Depleción de florfenicol y florfenicol amina en deyecciones de pollos broiler

DISCUSIÓN

Antes de evaluar las concentraciones de FF y FFa, su metabolito activo, en las distintas matrices escogidas (plumas, garras y deyecciones de pollos broiler), se realizó una validación *in-house*, generando un protocolo interno, basado en las normativas de la Comisión Europea (2002) y la FDA (2011). Las tres metodologías analíticas implementadas fueron validadas, para comprobar que dichos métodos eran aptos para su uso. Los resultados obtenidos confirmaron que los parámetros evaluados, para cada método (tiempo de retención, especificidad, LD, LC, linealidad de la curva de calibración, recuperación y precisión), cumplían con los criterios de aceptación estipulados en el protocolo de validación. De esta forma, las metodologías analíticas implementadas en este estudio demostraron ser aptas para la detección y cuantificación de los analitos en cuestión, en las matrices respectivas.

Para el análisis instrumental de las muestras de la presente memoria de título, se utilizó cromatografía líquida de alta eficacia, asociada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), debido a que es altamente selectiva y específica, y es un método confirmatorio, lo cual permitió la determinación de FF y FFa en las matrices utilizadas para este estudio. Del mismo modo, la detección y la cuantificación por LC-MS/MS ya fueron utilizadas antes, para fines similares, por San Martín *et al.* (2007) y Cornejo *et al.* (2011, 2012, 2016).

Se utilizaron pollos broiler de genética Ross 308, ya que es una raza que presenta una rápida tasa de crecimiento y buena eficiencia de conversión alimenticia (Aviagen, 2016). La crianza y el sacrificio de estas aves cumplieron con las normativas vigentes de bienestar en animales de experimentación, la Ley N° 20.380 “Sobre Protección de Animales” (Chile, Ministerio de Salud, 2009), la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos (CE, 2010) y el Reglamento N° 1099/2009 sobre protección de animales en el momento de la matanza (CE, 2009b).

El período de resguardo es el intervalo de tiempo que debe transcurrir entre la última administración de un producto farmacéutico de uso exclusivamente veterinario, en las condiciones recomendadas en su rotulado, y la obtención, desde dicho animal, de productos alimenticios destinados a consumo humano, asegurando que las concentraciones de residuos antimicrobianos no superen los LMR permitidos. Para las plumas y deyecciones,

como no son productos que van a consumo humano directo, no puede hablarse de período de resguardo propiamente tal (no así las garras, que sí son consumidas directamente), por lo que se habla de tiempo de depleción. En esta memoria de título, para el cálculo de los tiempos de depleción, en el caso de plumas y deyecciones, y del período de resguardo, en el caso de las garras, se utilizaron las concentraciones de los residuos, expresadas como la sumatoria de las concentraciones de FF y FFa, y se siguieron las directrices de EMEA (1996). Las concentraciones de FFa también fueron evaluadas, debido a que es el principal metabolito de FF, y que además posee actividad antimicrobiana. Ahora, sólo para dar una idea aproximada de las concentraciones en cada matriz, se tabularon los valores promedio obtenidos en cada muestreo. No obstante, es importante destacar que las concentraciones de la columna “Promedio Final FF + FFa ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)” no representan necesariamente la suma directa de los promedios indicados en las columnas “Concentración FF promedio ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)” y “Concentración FFa promedio ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)”, debido a que el número de observaciones pudo variar en cada una, al tener que considerar sólo los valores superiores al LC de cada técnica. Debido a esto, primero se sumaron las concentraciones individuales de FF y FFa obtenidas en un mismo animal, para calcular posteriormente el promedio de cada muestreo.

Aunque no se habían realizado estudios de depleción de FF y FFa en plumas de pollos broiler a la fecha, la bioacumulación de residuos de otros antimicrobianos en esta matriz sí había sido evidenciada anteriormente. Se evaluó la depleción de enrofloxacino y ciprofloxacino en plumas y tejidos comestibles de aves ponedoras, y plumas de pollos broiler, en los estudios de San Martín *et al.* (2007) y Cornejo *et al.* (2012), respectivamente. Por otra parte, la depleción de tres formulaciones de flumequina fue estudiada por Cornejo *et al.* (2011) en tejidos comestibles y plumas de pollos. Más aún, los estudios de Berendsen *et al.* (2013) y Heinrich *et al.* (2013) describieron la bioacumulación de residuos farmacológicos en plumas de pollos tratados, incluso cuando las concentraciones en tejidos comestibles eran menores a los LMR, y habiendo respetado los períodos de resguardo respectivos.

En ese sentido, los resultados obtenidos en esta memoria de título siguen la tendencia que han descrito los autores mencionados, ya que la depleción de FF y FFa, en plumas de pollos broiler, fue considerablemente lenta, evidenciándose concentraciones por sobre los 100

$\mu\text{g/Kg}$ (LMR establecido para músculo), durante todo el estudio. Es más, al día 30 post tratamiento (día correspondiente al final del período de resguardo establecido para florfenicol 10%) las concentraciones fueron superiores al doble del LMR de músculo. De hecho, de las tres matrices estudiadas, el tiempo de depleción en plumas fue el más alto.

Las altas concentraciones obtenidas en plumas no pueden ser atribuidas a contaminación externa, ya que las aves fueron criadas en jaulas cuyo piso se encontraba elevado del suelo. Sin embargo, podrían explicarse por las características farmacocinéticas de FF, ya que es rápida y eficientemente absorbido en el tracto gastrointestinal, es ampliamente distribuido a tejidos extravasculares, y presenta buena penetración tisular, con reabsorción a nivel tubular (Anadón *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2010). San Martín *et al.* (2007), por su parte, mencionan a la glándula uropigial de las aves como mecanismo alternativo de contaminación, ya que residuos antimicrobianos presentes en su secreción aceitosa podrían llegar a las plumas, por el comportamiento de acicalamiento de las aves. Cornejo *et al.* (2011), por otra parte, sugieren que concentraciones de antimicrobiano llegarían a las plumas durante su maduración, ya que, en ese período, las plumas presentan una pulpa irrigada que llena el raquis. Dicha pulpa es reabsorbida posteriormente, lo cual explicaría que concentraciones de fármaco se detecten en las plumas. Ambas hipótesis de traspaso de antimicrobiano a plumas son apoyadas por los resultados obtenidos por Berendsen *et al.* (2013).

De este modo, la harina de plumas podría representar potencialmente una fuente de reingreso a la cadena alimenticia de residuos de antimicrobianos, y una fuente de liberación de dichos residuos al medioambiente, ya que es incorporada en dietas de animales productivos, por su contenido de aminoácidos (Divakala *et al.*, 2009), siendo utilizada además como fertilizante (Love *et al.*, 2012).

Por otra parte, el estudio de depleción en garras evidenció que esta matriz puede representar, al igual que la harina de plumas, una potencial fuente de reingreso de antimicrobianos a la cadena alimenticia, ya que se evidenciaron concentraciones por sobre el LMR establecido para músculo, hasta 10 días post tratamiento. Sin embargo, aunque las concentraciones de FF y FFa no se mantuvieron tan altas como ocurrió con la matriz

plumas, de todos modos, el tiempo de depleción obtenido superó el período de resguardo establecido para la formulación comercial de florfenicol 10% utilizada.

Los resultados obtenidos en este estudio, son similares a los encontrados por Odore *et al.* (2015), quienes analizaron muestras de músculo y hueso de pollos broiler tratados terapéuticamente con una formulación de OTC 20%, evidenciando una alta bioacumulación de OTC en los huesos. De forma análoga, Cornejo *et al.* (2016) evaluaron la depleción en garras de pollos broiler de una formulación comercial de OTC, obteniendo altas concentraciones por tiempos más prolongados que el período de resguardo establecido para el fármaco. La bioacumulación de FF en esta matriz se explicaría por las características farmacocinéticas del fármaco, las cuales, como ya se mencionó, le brindan la capacidad de alcanzar incluso tejidos poco irrigados.

Finalmente, en el caso de las deyecciones, los resultados obtenidos en esta memoria de título evidencian que esta matriz es capaz de eliminar residuos de FF y FFa en concentraciones superiores al LMR establecido para músculo. Sin embargo, y a diferencia de las otras dos matrices, plumas y garras, los 30 días de período de resguardo, definidos para la formulación farmacéutica utilizada, sí fueron suficientes para que la depleción del fármaco alcanzara concentraciones por debajo del LMR establecido para músculo.

En Chile, se estima una producción anual del orden de las 200.612 toneladas de cama de broiler (SAG, 2006), por lo que la bioacumulación de altas concentraciones de residuos farmacológicos de FF en deyecciones, evidenciada en este estudio, es importante, si se tiene en consideración que dicho subproducto puede ir destinado a consumo de ganado en plantales sin certificación, representando una vía de reingreso de este antimicrobiano en la cadena alimenticia; o ser utilizado como fertilizante, por lo que residuos de FF pueden ser liberados al medio ambiente en altas concentraciones.

Para los estudios de depleción llevados a cabo en esta memoria de título, se siguieron las indicaciones de EMEA (1996). Ahí se estipula un mínimo de tres puntos de muestreo, con tres animales siendo sacrificados en cada uno, como mínimo. En términos de planificación, en esta memoria de título, se llevaron a cabo 8 muestreos, sacrificando 2 aves control y 8 aves tratadas en cada uno. En ese sentido, en el caso de las plumas, se obtuvieron concentraciones cuantificables en todos los muestreos realizados; mientras que, para garras,

se obtuvieron concentraciones cuantificables a los días 5, 10 y 15 post tratamiento, correspondientes a los primeros tres muestreos realizados. Sin embargo, en el caso del estudio de depleción en deyecciones, el análisis de los residuos sólo permitió graficar dos puntos de muestreo con concentraciones cuantificables, a los días 5 y 10 post tratamiento, correspondientes a los primeros dos muestreos. El diseño de este estudio no pudo prever esta situación, debido a que, a la fecha, no existían datos que permitieran conocer el comportamiento de residuos antimicrobianos en esa matriz.

La presencia de estos residuos antimicrobianos implica un riesgo para la Salud Pública, debido al potencial reingreso a la cadena alimenticia de subproductos contaminados, y a la liberación de dichos residuos al medioambiente, al ser utilizadas como fertilizante, como es el caso de la harina de plumas y la cama de broiler. Los efectos de los residuos sobre la salud humana incluyen reacciones alérgicas, carcinogénesis, y mutagénesis, entre otras, y además contribuyen al desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. En este sentido, y considerando que, en 2014, se produjeron en Chile aproximadamente 209.791,55 toneladas de subproductos de aves (APA, 2015a), y se exportaron 14.990 toneladas de garras para consumo humano (APA, 2015b), el tiempo de depleción de una droga, cuando es administrada en forma terapéutica a animales productores de alimentos, es un aspecto clave desde el punto de vista de salud pública, y resalta el hecho de que FF y FFa puedan bioacumularse en plumas y garras, y eliminarse en altas concentraciones en deyecciones.

Es indispensable que se sigan desarrollando investigaciones sobre las vías de reingreso de antimicrobianos en la cadena alimenticia, ya sea a través de estas u otras matrices alternativas. Al respecto, esta memoria de título constituye un precedente fundamental para realizar futuros estudios de depleción en matrices de plumas, garras y deyecciones de pollos broiler. Además, sienta las bases para el establecimiento de una normativa legal sobre límites máximos residuales permisibles, y de un sistema de vigilancia de residuos antimicrobianos, de modo de asegurar la inocuidad de los productos en el consumidor final, y prevenir la liberación de residuos antimicrobianos al medioambiente.

CONCLUSIONES

1. La cromatografía líquida de alta eficacia asociada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), es un método altamente selectivo, específico, y confirmatorio, que permite la detección y cuantificación de FF y FFa en las matrices de plumas, garras y deyecciones utilizadas para este estudio.
2. Plumas y garras de pollos broiler, tratados terapéuticamente con una formulación farmacéutica de florfenicol 10%, son matrices capaces de bioacumular residuos farmacológicos.
3. Residuos de antimicrobianos pueden eliminarse en altas concentraciones en deyecciones de pollos broiler, tratados terapéuticamente con una formulación farmacéutica de florfenicol 10%, hasta 27 días post tratamiento.
4. El período de resguardo establecido para la formulación farmacéutica de florfenicol 10%, utilizada en este estudio, no garantiza la ausencia de residuos de este fármaco en concentraciones menores al LMR establecido para tejidos comestibles, en plumas y garras de pollos broiler.
5. Es necesario que se monitoree y fiscalice el uso de piensos que contengan derivados de plumas, garras y deyecciones de pollos broiler, para así evitar el reingreso de residuos farmacológicos en la cadena alimenticia. Del mismo modo, el uso de fertilizantes derivados de la industria avícola también debe ser monitoreado y fiscalizado, para evitar la liberación de residuos antimicrobianos al medioambiente.
6. Esta memoria de título sustenta la hipótesis de un posible traspaso de residuos antimicrobianos a la cadena alimenticia, mediante las matrices estudiadas. Asimismo, sienta las bases para nuevos estudios de depleción de FF en otras matrices, o bien, de otros antimicrobianos, en plumas, garras y deyecciones de pollos broiler.
7. La hipótesis planteada en este estudio se acepta para las matrices plumas y garras de pollos broiler, ya que el período de resguardo definido para la fórmula utilizada no es suficiente, para que las concentraciones de los residuos sean menores a los límites máximos residuales establecidos para tejidos comestibles.

8. Considerando los datos obtenidos en el presente estudio, un futuro estudio de depleción en deyecciones de pollos broiler, tratados con florfenicol, debería considerar un mayor número de muestreos durante los primeros diez días post tratamiento, o bien, establecer un límite de detección más bajo para la técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P.; SALLES, J.; FARIAS, T.; CURVELO, J. 2012. Aprovechamiento de patas de pollos como alternativa para disminuir residuos generados en los mataderos. *Inf. Tecnol.* 23 (4): 45-52.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. 2012. Residuos de medicamentos de uso veterinario. **In:** Cameán, A.; Repetto, M. *Toxicología alimentaria*. 5ª Ed. Díaz de Santos. Madrid, España. pp. 394-412.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ, M.; RÍOS, A.; CABALLERO, V.; ARES, I.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. 2008. Plasma and tissue depletion of florfenicol and florfenicol-amine in chickens. *J. Agric. Food Chem.* 56: 11049-11056.

APA. Asociación de productores avícolas de Chile A.G. 2015a. Estadísticas. [en línea] <<http://www.apa.cl/estadísticas>> [consulta: 20-04-2016]

APA. Asociación de productores avícolas de Chile A.G. 2015b. Análisis de exportaciones de garras de pollos, período anual 2014. APA. Santiago, Chile. 1 p.

AVIAGEN. 2016. Ross 308 [en línea] <<http://es.aviagen.com/ross-308/>> [consulta: 20-03-2016]

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.

BERENDSEN, B.; WEGH, R.; MEMELINK, J.; ZUIDEMA, T.; STOLKER, L. 2015. The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta.* 132: 258-268.

BERGE, A.; EPPERSON, W.; PRITCHARD, R. 2005. Assessing the effect of a single dose florfenicol treatment in feedlot cattle on the antimicrobial resistance patterns in faecal *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 36 (5-6): 723-734.

BILGILI, S.; ALLEY, M.; HESS, J.; MORAN, E. 2005. Influence of strain-cross, sex, and feeding programs on broiler chicken paw (feet) yield and quality. **In:** World's poultry science association (WPSA) proceedings of the XVI European symposium on the quality of poultry meat. Doorwerth, The Netherlands. 23-26 mayo 2005. pp. 342-349.

BOLAN, N.; SZOGI, A.; CHUASAVATHI, T.; SESHADRI, B.; ROTHROCK, M.; PANNEERSELVAM, P. 2010. Uses and management of poultry litter. *World Poultry Sci J.* 66: 673-698

CE. COMISIÓN EUROPEA. 2002. Decisión de la comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario oficial de la Unión Europea.* L 221: 8-36.

CE. COMISIÓN EUROPEA. 2009a. Regulación N° 37/2010 de 22 de diciembre de 2009 sobre sustancias farmacológicamente activas y su clasificación respecto de los límites máximos residuales en productos alimenticios de origen animal. *Diario oficial de la Unión Europea.* L 15: 1-72.

CE. COMISIÓN EUROPEA. 2009b. Reglamento (CE) N° 1099/2009 del Consejo de 24 de septiembre de 2009 relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza. Diario oficial de la Unión Europea. L 303: 1-30.

CE. COMISIÓN EUROPEA. 2010. Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Diario oficial de la Unión Europea. L 276: 33-79.

CHANG, S.; DAVIS, J.; CHENG, C.; SHIEN, R.; HSIEH, M.; KOH, B.; CHOU, C. 2010. Pharmacokinetics and tissue depletion of florfenicol in Leghorn and Taiwan Native chickens. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 33: 471-479.

CHILE. MINISTERIO DE AGRICULTURA. 1996. Resolución exenta N° 3599 Prohíbe el uso de fármacos que contengan cloranfenicol o cualquiera de sus sales en animales cuyos productos y subproductos sean destinados a la alimentación humana. 10 diciembre 1996.

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

CHILE. MINISTERIO DE SALUD. 2014. Resolución exenta N° 551 Fija límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos para consumo humano. 01 agosto 2014.

COMISIÓN DEL CÓDEX ALIMENTARIUS. 2012. Petición de observaciones e información sobre: Parte A: Observaciones en el Trámite 6 sobre el Proyecto de Límites Máximos de Residuos (LMR) para el Monepantel (tejidos de oveja) Parte B: Observaciones en el Trámite 3 sobre el anteproyecto de Recomendaciones para la Gestión de Riesgos para Cloranfenicol y Malaquita Verde (N10-2012). [en línea] <ftp://ftp.fao.org/codex/Circular_Letters/CxCL2012/cl12_23s.pdf> [consulta: 28-06-2015].

CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA. 2008. Manual de Normas de Bioseguridad. CONICYT. 2ª ed. Santiago, Chile.

CORNEJO, J.; POKRANT, E.; ARAYA, D.; MADDALENO, A.; ARAYA, C.; HIDALGO, H.; SAN MARTÍN, B. 2016. Depletion study of oxytetracycline (OTC) and 4-epi-oxytetracycline (4-epi-OTC) residues in claws of broiler chickens by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **In:** EuroResidue VIII Conference on residues of veterinary drugs in food. Egmond aan Zee, The Netherlands. 23-25 mayo 2016. pp 112-118.

CORNEJO, J.; GONZÁLEZ, P.; ARAYA, C.; MADDALENO, A.; SAN MARTIN, B. 2012. Transfer and depletion of enrofloxacin and its metabolite Ciprofloxacin in feathers of treated broiler chickens. **In:** Residues of veterinary drugs in food: proceedings of the EuroResidue VII conference. Egmond aan Zee, The Netherlands. 14-16 mayo 2012. pp. 683-688.

CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGÜEN, D.; PIZARRO, N.; HIDALGO, H.; SAN MARTÍN, B. 2011. Depletion study of three formulations of flumequine n edible tissues and drug transfer into chicken feathers. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 34: 168-175.

- EMEA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY.** 1996. Note for guidance: Approach towards harmonization of withdrawal periods, EMEA/CVMP/036/95.
- DIVAKALA, K.; CHIBA, L.; KAMALAKAR, R.; RODNING, S.; WELLES, E.; CUMMINS, K.; SWANN, J.; CESPEDES, F.; PAYNE, R.** 2009. Amino acid supplementation of hydrolyzed feather meal diets for finished pigs. *J. Anim. Sci.* 87: 1270-1281.
- FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2011. VICH GL49 Validation of analytical methods used in residue depletion studies. 22 p.
- GADBERRY, S.** 2014. Feeding broiler litter to beef cattle. [En línea] <<http://www.uaex.edu/publications/pdf/FSA-3016.pdf>> [consulta: 20-05-15]
- HEINRICH, K.; CHAN, D.; FUSSELL, R.; KAY, J.; SHARMAN, M.** 2013. Can the unauthorized use of ceftiofur be detected in poultry? *Food Addit. Contam. A.* 30 (10): 1733-1738.
- HERRERA, M.** 2008. Aprovechamiento de los subproductos o residuos en la industria avícola para la producción de harinas de origen animal. *Rev. Virtual Pro.* 82: 1-16.
- HORMAZÁBAL, V.; STEFFENAK, I.; YNDESTAD, M.** 1993. Simultaneous determination of residues of florfenicol and florfenicol amine in fish tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 616 (1): 161-165.
- JAYATHILAKAN, K.; SULTANA, K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A.** 2012. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J. Food Sci. Technol.* 49 (3): 278-293.
- KHALIL, S.; HAMED, S.; HASSANIN, O.** 2012. Residue withdrawal of florfenicol from the serum and edible tissues of broiler chickens. *J. Am. Sci.* 8 (12): 514-524.
- LI, J.; DING, S.; ZHANG, S.; LI, C.; LI, X.; LIU, Z.; LIU, J.; SHEN, J.** 2006. Residue depletion of florfenicol and florfenicol amine in swine tissues after intramuscular administration. *J. Agric. Food Chem.* 54 (25): 9614-9619.
- LOVE, D.; HALDEN, R.; DAVIS, M.; NACHMAN, K.** 2012. Feather meal: a previously unrecognized route for reentry into the food supply of multiple pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). *Environ. Sci. Technol.* 46: 3795-3802.
- MARTÍNEZ, J.; BAQUERO, F.** 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (4): 647-679.
- MESTORINO, N.; DANIELE, M.; ERRECALDE, J.** 2011. Residuos tisulares de florfenicol tras su administración oral en pollos parrilleros. *VC.* 6: 27-33.
- ODEPA. Oficina de estudios y Políticas Agrarias.** 2013. Industria Avícola. [En línea] <<http://www.odepa.cl/odepaweb/publicaciones/doc/10530.pdf>> [consulta: 16-05-15]
- ODEPA. Oficina de estudios y Políticas Agrarias.** 2015. Actualización del mercado avícola. [En línea] <http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1428415820Aves201503.pdf> [consulta: 20-05-15]

- ODORE, R.; DE MARCO, M.; GASCO, L.; ROTOLO, L.; MEUCCI, V.; PALATUCCI, A.; RUBINO, V.; RUGGIERO, G.; CANELLO, S.; GUIDETTI, G.; CENTENARO, S.; QUARANTELLI, A.; TERRAZZANO, G.; SCHIAVONE, A.** 2015. Cytotoxic effects of oxytetracycline residues in the bones of broiler chickens following therapeutic oral administration of a water formulation. *Poultry Sci.* 94: 1979-1985.
- PARK, B.; LIM, J.; KIM, M.; HWANG, Y.; YUN, H.** 2007. Pharmacokinetics of florfenicol and its major metabolite, florfenicol amine, in rabbits. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 30: 32-36.
- ROJAS, C.; CATRILEO, A.** 2006. Reemplazo de la cama de broiler por granos de cereales y leguminosas en raciones de engorda invernal en novillos. *Agric. Téc.* 66(3): 318-323.
- SAG. Servicio agrícola y ganadero.** 2006. Diagnóstico de la problemática ambiental de los residuos generados por la producción de aves y vacunos de leche en Chile y capacitación en la evaluación de plántales pecuarios. [en línea] <http://www.sag.cl/sites/default/files/RESIDUOS_AVES_VACUNOS_LECHE.pdf> [consulta: 20-05-2016]
- SAG. Servicio agrícola y ganadero.** 2015. Sistema en línea de búsqueda de medicamentos veterinarios autorizados por el SAG. [en línea] <http://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos_1.asp> [consulta: 15-05-2015].
- 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 protection.* 70 (8): 1952-7.
- SARMAH, A.; MEYER, M.; BOXALL, A.** 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere.* 65: 725-759.
- SHEN, J.; HU, D.; WU, X.; COATS, J.** 2003. Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 26: 337-341.
- SWITALA, M.; HRYNYK, R.; SMUTKIEWICZ, A.; JAWORSKI, K.; PAWLOWSKI, P.; OKONIEWSKI, P.; GRABOWSKI, T.; DEBOWY, J.** 2007. Pharmacokinetics of florfenicol, thiamphenicol and chloramphenicol in turkeys. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 30: 145-150.
- XIE, K.; JIA, L.; YAO, Y.; XU, D.; CHEN, S.; XIE, X.; PEI, Y.; BAO, W.; DAI, G.; WANG, J.; LIU, Z.** 2011. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs, by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 879: 2351-2354.
- ZHANG, S.; LIU, Z.; GUO, X.; CHENG, L.; WANG, Z.; SHEN, J.** 2008. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 875: 399-404.

ANEXOS

Anexo 1: Certificado del Comité de Bioética FAVET.




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


Santiago, 4 de diciembre de 2013


CERTIFICADO N° 08-2013


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

A este respecto este Comité entiende que el Investigador Responsable tiene la idoneidad necesaria para el manejo de las aves que serán sujeto de estudio, que cuenta con la colaboración de la Unidad de Patología Aviar de FAVET y que estas permanecerán en un recinto adecuado para su manejo y mantención dentro de FAVET.


Dra. Tamara Tadién G.
Director
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Orcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal



Anexo 2: Metodología analítica para la detección de florfenicol y florfenicol amina en plumas, por LC-MS/MS

- a) Pesar $2 \pm 0,02$ grs de muestra en tubo tipo Falcon de 50 ml.
- b) Fortificar muestras, utilizando Cloranfenicol-D5 como estándar interno.
- c) Agregar 20 ml de acetona.
- d) Agregar 20 ml de agua HPLC.
- e) Agitar por 10 min en vórtex.
- f) Sonicar 5 min y dejar reposar por 5 min.
- g) Agitar por 10 min en vórtex.
- h) Centrifugar por 5 min a 4000 rpm.
- i) Utilizando lana de vidrio y filtros millex en jeringas de 50 ml, filtrar el contenido a un tubo tipo Falcon de 50 ml.
- j) Agregar 15 ml de diclorometano.
- k) Agitar por 5 min en vórtex.
- l) Centrifugar por 5 min a 4000 rpm.
- m) Descartar la fase superior.
- n) Evaporar la fase inferior bajo flujo de nitrógeno en baño de agua a 40 - 50 °C.
- o) Reconstituir con 700 μ l de solución metanol/agua en relación 7:3.
- p) Agregar 1 ml de hexano.
- q) Agitar por 5 min en vórtex.
- r) Sonicar por 5 min.
- s) Centrifugar por 10 min a 4000 rpm.
- t) Pasar 700 μ l de la fase inferior a un microtubo Eppendorf de 1,5 ml.

Anexo 3: Metodología analítica para la extracción de florfenicol y florfenicol amina en garras, por LC-MS/MS

- a) Pesar $2 \pm 0,02$ grs de muestra en un tubo tipo Falcon de 50 ml.
- b) Fortificar muestras, utilizando Cloranfenicol-D5 como estándar interno.
- c) Agregar 10 ml de agua HPLC.
- d) Agregar 10 ml de acetona.
- e) Agitar 10 min en vórtex.
- f) Sonicar 5 min y dejar reposar por 5 min.
- g) Agitar 5 min en vórtex.
- h) Centrifugar 5 min a 4000 rpm.
- i) Pasar el sobrenadante a otro tubo tipo Falcon de 50 ml.
- j) Agregar 15 ml de diclorometano.
- k) Agitar 5 min en vórtex.
- l) Centrifugar 5 min a 4000 rpm.
- m) Descartar la fase superior.
- n) Evaporar la fase inferior bajo flujo de nitrógeno en baño de agua a 40 - 50 °C.
- o) Reconstituir con 700 μ l de solución metanol/agua en relación 7:3.
- p) Agregar 1 ml de hexano.
- q) Agitar 5 min en vórtex.
- r) Sonicar 5 min.
- s) Centrifugar 5 min a 4000 rpm.
- t) Pasar 700 μ l de la fase inferior a un microtubo Eppendorf de 1,5 ml.
- u) Centrifugar 10 min a 13500 rpm.
- v) Utilizando una jeringa de 1 ml con filtro millex, traspasar a un microtubo Eppendorf o vial rotulado.

Anexo 4: Metodología analítica para la extracción de florfenicol y florfenicol amina en deyecciones, por LC-MS/MS

- a) Pesar $2 \pm 0,02$ grs de muestra en un tubo tipo Falcon de 50 ml.
- b) Fortificar muestras, utilizando Cloranfenicol-D5 como estándar interno.
- c) Agregar 10 ml de agua HPLC.
- d) Agregar 10 ml de acetona.
- e) Agitar 15 min en vórtex.
- f) Sonicar 5 min y dejar reposar por 5 min.
- g) Agitar 5 min en vórtex.
- h) Centrifugar 5 min a 4000 rpm.
- i) Utilizando lana de vidrio y filtros millex en jeringas de 10 ml, filtrar el sobrenadante a otro tubo tipo Falcon de 50 ml.
- j) Agregar 7 ml de diclorometano.
- k) Agitar 10 min en vórtex.
- l) Centrifugar 5 min a 4000 rpm.
- m) Descartar la fase superior.
- n) Acondicionar columnas de extracción con 6 ml de solución acetona/diclorometano en relación 7:3.
- o) Eluir muestras, recogiendo el contenido en tubos de vidrio.
- p) Evaporar bajo flujo de nitrógeno en baño de agua a 40 - 50 °C.
- q) Reconstituir con 700 μ l de solución metanol/agua en relación 7:3.
- r) Agregar 1 ml de hexano.
- s) Agitar 5 min en vórtex.
- t) Sonicar 5 min.
- u) Centrifugar 10 min a 4000 rpm.
- v) Pasar 700 μ l de la fase inferior a un microtubo Eppendorf de 1,5 ml.
- w) Centrifugar 10 min a 13500 rpm.
- x) Utilizando una jeringa de 1 ml con filtro millex, traspasar a un microtubo Eppendorf o vial rotulado.

Anexo 5: Certificado Comité de Bioseguridad FAVET



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.


LISSETTE LAPIERRE ACEVEDO

Coordinadora
Comité de Bioseguridad



Anexo 6: Datos de validación para la metodología analítica de extracción de florfenicol y florfenicol amina en plumas, por LC-MS/MS

Tiempo de Retención (TR)	
FF	1,4 min (promedio); CV: 2,76%
FFa	1,07 min (promedio); CV: 0,70%
Especificidad	
No hay interferentes en el TR de los analitos	
Límite de Detección (LD)	
FF	20 µg/Kg
FFa	20 µg/Kg
Límite de Cuantificación (LC)	
FF	24,4 µg/Kg
FFa	24,5 µg/Kg
Linealidad de la Curva de Calibración	
FF	$R^2 > 0,99$; CV de las pendientes: 0,04%
FFa	$R^2 > 0,99$; CV de las pendientes: 0,14%
Recuperación	
FF	20 µg/Kg: 100%; 100 µg/Kg: 99%; 200 µg/Kg: 100%
FFa	20 µg/Kg: 102%; 100 µg/Kg: 99%; 200 µg/Kg: 100%
Precisión	
Repetibilidad	
FF	20 µg/Kg: 10,1%; 100 µg/Kg: 3,6%; 200 µg/Kg: 0,8%
FFa	20 µg/Kg: 15,6%; 100 µg/Kg: 5,8%; 200 µg/Kg: 1,3%
Reproducibilidad	
FF	20 µg/Kg: 19,4%; 100 µg/Kg: 5,8%; 200 µg/Kg: 1,4%
FFa	20 µg/Kg: 20,8%; 100 µg/Kg: 9,3%; 200 µg/Kg: 1,9%

Anexo 7: Datos de validación para la metodología analítica de extracción de florfenicol y florfenicol amina en garras, por LC-MS/MS

Tiempo de Retención (TR)	
FF	1,4 min (promedio); CV: 2,76%
FFa	1,07 min (promedio); CV: 0,70%
Especificidad	
No hay interferentes en el TR de los analitos	
Límite de Detección (LD)	
FF	50 µg/Kg
FFa	50 µg/Kg
Límite de Cuantificación (LC)	
FF	68,9 µg/Kg
FFa	53 µg/Kg
Linealidad de la Curva de Calibración	
FF	$R^2 > 0,97$; CV de las pendientes: 0,31%
FFa	$R^2 > 0,98$; CV de las pendientes: 1,18 %
Recuperación	
FF	50 µg/Kg: 100%; 200 µg/Kg: 99%; 400 µg/Kg: 100%
FFa	50 µg/Kg: 102%; 200 µg/Kg: 99%; 400 µg/Kg: 100%
Precisión	
Repetibilidad	
FF	50 µg/Kg: 11,2%; 200 µg/Kg: 6,3%; 400 µg/Kg: 1,2%
FFa	50 µg/Kg: 25,9%; 200 µg/Kg: 17,2%; 400 µg/Kg: 3,1%
Reproducibilidad	
FF	50 µg/Kg: 11,6%; 200 µg/Kg: 14,5%; 400 µg/Kg: 3,8%
FFa	50 µg/Kg: 34,2%; 200 µg/Kg: 20,7%; 400 µg/Kg: 3,9%

Anexo 8: Datos de validación para la metodología analítica de extracción de florfenicol y florfenicol amina en deyecciones, por LC-MS/MS

Tiempo de Retención (TR)	
FF	0,44 min (promedio); CV: 1,18%
FFa	0,35 min (promedio); CV: 1,81%
Especificidad	
No hay interferentes en el TR de los analitos	
Límite de Detección (LD)	
FF	50 µg/Kg
FFa	50 µg/Kg
Límite de Cuantificación (LC)	
FF	52,2 µg/Kg
FFa	60,5 µg/Kg
Linealidad de la Curva de Calibración	
FF	$R^2 > 0,98$; CV de las pendientes: 4,29%
FFa	$R^2 > 0,97$; CV de las pendientes: 13,01%
Recuperación	
FF	50 µg/Kg: 95,9%; 200 µg/Kg: 101,5%; 500 µg/Kg: 99,8%
FFa	50 µg/Kg: 97,5%; 200 µg/Kg: 101%; 500 µg/Kg: 99,9%
Precisión	
Repetibilidad	
FF	50 µg/Kg: 17,4%; 200 µg/Kg: 10,4%; 500 µg/Kg: 15%
FFa	50 µg/Kg: 15,8%; 200 µg/Kg: 21%; 500 µg/Kg: 18,9%
Reproducibilidad	
FF	50 µg/Kg: 22,5%; 200 µg/Kg: 15,3%; 500 µg/Kg: 16,5%
FFa	50 µg/Kg: 25,4%; 200 µg/Kg: 9,6%; 500 µg/Kg: 16,8%