



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

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO CONFIRMATORIO
PARA LA DETECCIÓN DE BETALACTÁMICOS Y AMINOGLUCÓSIDOS EN
DEYECCIONES DE POLLOS BROILER MEDIANTE HPLC – MS/MS**

MATÍAS RAÚL MATURANA MEDINA

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

PROFESOR GUÍA: Aldo Maddaleno Toledo

FUENTE DE FINANCIAMIENTO: FONDEF IDeA I+D 2019 ID19110033

SANTIAGO, CHILE

2022



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

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO CONFIRMATORIO
PARA LA DETECCIÓN DE BETALACTÁMICOS Y AMINOGLUCÓSIDOS EN
DEYECCIONES DE POLLOS BROILER MEDIANTE HPLC – MS/MS**

MATÍAS RAÚL MATURANA MEDINA

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

CALIFICACIÓN FINAL:.....

CALIFICACIÓN	FIRMA
PROFESOR GUÍA: ALDO MADDALENO
PROFESOR CORRECTOR: JAVIERA CORNEJO
PROFESOR CORRECTOR: CAROLINA VALENZUELA

SANTIAGO, CHILE

2022

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis me gustaría dedicarla y a su vez agradecer a las distintas personas que me acompañaron durante este proceso. En primer lugar quisiera agradecer a mis padres, Mariana Medina y Raúl Maturana, que fueron un apoyo incondicional, pues sin ellos no habría sido capaz de aprovechar las oportunidades que se cruzaron en mi camino, a Claudia Cisterna, mi pareja, que fue un pilar fundamental en todo ámbito para mí durante este periodo, siendo una gran compañera en todo momento, a Aldo Maddaleno, mi profesor guía y amigo, por la paciencia que tuvo para formarme como médico veterinario y como persona durante este proceso, a quien le debo gran parte del ejemplo de futuro profesional que sea y que pretendo ser, a Javiera Cornejo, por haberme abierto las puertas al área en la que me estoy desarrollando, por haber confiado en mí y por darme la oportunidad de entrar a FARMAVET, a Andrés Flores, por enseñarme gran parte del rubro en el que me estoy desempeñando y por convertirse en un gran amigo durante el transcurso de mi carrera este laboratorio, a Ekaterina Pokrand, por su paciencia y su disposición en todo momento para ayudarme ante cualquier duda, a quien, al igual que Aldo, considero un gran ejemplo de profesional, a Peter Núñez a quien estimo y valoro mucho por su gran calidad de persona y su disposición de compartirme su conocimiento laboral y personal, y finalmente, a mis compañeros de trabajo, Yéster, Leonora, Constanza, Etier y Álvaro por tener la voluntad transmitirme su conocimiento de forma desinteresada, entre otras personas de las cuales también pude aprender mucho durante este trayecto, y de los que seguiré aprendiendo.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Uso de antibióticos en la industria.....	3
Toxicidad ambiental de Betalactámicos y Aminoglucósidos.....	4
Efectos sobre la salud pública y animal de Betalactámicos y Aminoglucósidos.....	5
Análisis instrumental de residuos de Betalactámicos y Aminoglucósidos.....	6
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Obtención de muestras analíticas y n muestral.....	9
Reactivos y estándares.....	9
Proceso de extracción de aminoglucósidos y betalactámicos desde deyecciones de pollos Broiler.....	10
Proceso de extracción de aminoglucósidos.....	10
Proceso de extracción de betalactámicos.....	11
Instrumentación y evaluación de parámetros cromatográficos.....	11
Criterios y parámetros de verificación.....	14
Tiempo de retención del estándar.....	14
Especificidad.....	14
Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC) del método analítico.....	14
Linealidad de las curvas de calibración.....	14
Cuantificación y análisis de muestras.....	15
RESULTADOS	16
Objetivo 1. Desarrollar un método de extracción analítico químico para la determinación de residuos de amoxicilina, ampicilina, neomicina y espectinomina en deyecciones de pollos Broiler.....	16

Desarrollo de las condiciones de extracción para la matriz deyecciones de pollos Broiler.....	16
Condiciones de extracción desde deyecciones para aminoglucósidos.....	17
Condiciones de extracción desde deyecciones para betalactámicos.....	17
Objetivo 2. Evaluar parámetros cromatográficos para el desarrollo de un método confirmatorio de análisis mediante espectrometría de masas (HPLC MS/MS) en deyecciones de pollos Broilers para la detección de amoxicilina, ampicilina, neomicina y espectinomicina.....	18
Tiempo de Retención.....	18
Especificidad.....	19
Límite de detección y límite de cuantificación.....	21
Linealidad.....	23
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIÓN	30
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXOS	37

RESUMEN

El uso de antimicrobianos en la industria agropecuaria es un recurso ampliamente utilizado, donde su principal función es controlar los brotes de enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Sin embargo, esta práctica ha generado controversias asociadas a su uso indiscriminado, lo que ha obligado a establecer normativas para evitar repercusiones negativas a la salud pública, animal y ambiental. Para asegurar este cumplimiento, se han desarrollado métodos analíticos para detectar y cuantificar su presencia en diferentes matrices de origen animal. Sin embargo, entre los métodos desarrollados, no ha sido considerado que entre el 30 y el 90% de los fármacos aplicados en animales son eliminados inalterados a través de las heces. Por lo tanto, en este estudio se implementó un método analítico confirmatorio para la presencia de penicilina G, neomicina y espectinomicina en deyecciones de pollos Broiler a través de la técnica HPLC-MS/MS Q3, cumpliendo con los criterios de tiempo de retención, especificidad, LD, LC y linealidad asociados a la normativa 2002/657/CE, logrando establecer un LD para estos analitos de 30, 400 y 250 µg/kg respectivamente. Además, al ser el primer estudio en implementar un método confirmatorio con estas características, permitiría a futuros estudios a establecer relaciones causa/efecto entre la concentración de residuos antimicrobianos en deyecciones y su impacto, planteando la posibilidad de caracterizar el perfil de distribución de estos fármacos según su farmacocinética y extrapolar las concentraciones presentes en deyecciones a las concentraciones plasmáticas, obteniendo información relevante previo a la faena del animal productivo mediante una matriz poco invasiva.

Palabras clave: betalactámicos, aminoglucósidos, deyecciones, HPLC-MS/MS Q3.

ABSTRACT

Antibiotic usage is a common practice in the agricultural sector, where its main function is to control outbreaks of infectious diseases of bacterial origin. However, this practice has generated controversies associated with its indiscriminate use, which has forced the establishment of regulations to avoid negative repercussions to humans, animals, and the environment. To ensure this compliance, analytical methods have been developed to detect and quantify its presence in different matrices of animal origin. However, among the developed methods, it has not been considered that between 30 and 90% of the drugs applied in animals are eliminated unchanged through the feces. Therefore, in this study, a confirmatory analytical method was implemented for the presence of penicillin G, neomycin and spectinomycin in Broiler chicken droppings through the HPLC-MS/MS 3Q technique, meeting the criteria of retention time, specificity, LoD, LoQ, and linearity associated with regulation 2002/657/CE. Managing to establish an LoD for these analytes of 30, 400 and 250 µg/kg, respectively. In addition, being the first study to implement a confirmatory method with these characteristics, it would allow future studies to establish cause/effect relationships between the concentration of antimicrobial residues in droppings and their impact, raising the possibility of characterizing the distribution profile of these drugs. according to its pharmacokinetics and extrapolate the concentrations present in droppings to plasma concentrations, allowing relevant information to be obtained prior to the slaughter of the productive animal through a slightly invasive matrix.

Key Words: HPLC-MS/MS Q3, beta-lactams, aminoglycosides, droppings

INTRODUCCIÓN

El uso de antibióticos en la industria agropecuaria es una práctica ampliamente utilizada, siendo su principal función, el controlar brotes de enfermedades que puedan afectar la producción animal de forma general. Si bien la utilización de antibióticos es común en medicina veterinaria, esta actividad no ha estado exenta de cuestionamientos por organismos internacionales encargados del resguardo de la salud pública. Algunos ejemplos de malas prácticas de uso son la administración de antibióticos como promotores del crecimiento, o bien, como uso profiláctico en los sistemas de producción animal (Gutiérrez, *et al.*, 2013; Espinosa, *et al.*, 2019), prácticas que en la actualidad se encuentran normadas en nuestro país y la comunidad europea.

La problemática que se desprende de este punto consiste en que los antibióticos, luego de ser consumidos por los animales, pueden estar presentes como residuos en el individuo ya sea como moléculas precursoras del compuesto o como metabolitos activos (Massé *et al.*, 2014), los cuales posteriormente se depositarán o distribuirán en tejidos tales como hígado, riñones, músculos o grasa (Lees y Tountain, 2012). El consumo de productos originarios desde animales tratados farmacológicamente sin sus respectivos resguardos representa un peligro para la salud pública, tomando en cuenta la posibilidad de generar reacciones adversas debido al consumo único o crónico de estos residuos, como también por la generación de bacterias multirresistentes en el individuo o en el ambiente (Espinosa *et al.*, 2019; Mella *et al.*, 2004). Lo anterior, ha impulsado la creación y aplicación de múltiples métodos analíticos que buscan detectar la presencia de residuos antimicrobianos en distintos tejidos de origen animal, utilizando para este fin, matrices de análisis diana o “*target*” tales como hígado, riñón y músculo (Ujueta y Aranque, 2016). El análisis de estas matrices se basa en los tejidos que están dirigidos a consumo humano y además en la farmacocinética de los antimicrobianos utilizados, considerando las características fisiológicas propias de la especie animal tratada, lo que explica su absorción, distribución, metabolización y excreción en los diferentes compartimentos del individuo. Estos residuos pueden distribuirse a músculo, grasa u otros tejidos, y se excretan principalmente a través de los riñones, posterior a la metabolización hepática de la molécula (Levison M. y Levison J. 2009). Este tipo de enfoque, si bien es

correcto, debe ser complementado por otras investigaciones que entreguen información del traspaso de estos residuos al ambiente y sobre su posible recirculación, puesto que otra característica farmacocinética importante de los antibióticos es que entre un 30-90% de la dosis total aplicada es excretada a través de la orina y heces hacia el medioambiente dependiendo del principio activo del fármaco utilizado (Peng *et al.*, 2016). Este problema productivo y ambiental, implica la necesidad de realizar un control preventivo sobre estos residuos, utilizando una matriz analítica de origen animal coherente según el requisito mencionado y poco invasiva.

Las deyecciones de pollos Broiler son una alternativa válida para evaluar el traspaso ambiental de las moléculas excretadas desde los individuos tratados, puesto que muchas veces estas últimas son utilizadas como fertilizantes en siembras de alimento para el ganado (Sarmah *et al.*, 2006; Xiangang *et al.*, 2010), o como subproducto alimenticio, como es el caso de la cama de Broiler (Cornejo *et al.*, 2017; Rojas y Manríquez, 2007), aumentando la vida media del residuo en la cadena productiva y en el ambiente. El uso de estos productos bajo cualquiera de las circunstancias señaladas anteriormente, podría tener un efecto bioacumulativo en el ecosistema y en el individuo tratado aumentando la persistencia del principio activo en el ambiente (Sarmah *et al.*, 2006; Xiangang *et al.*, 2010). Como respuesta a este problema, el presente estudio desarrollará la implementación de un método analítico instrumental confirmatorio para deyecciones de pollos Broiler mediante *HPLC MS/MS*, para cinco moléculas antibacterianas, tres de la familia de los beta-lactámicos (amoxicilina, ampicilina y penicilina G), y dos aminoglucósidos (neomicina y espectinomicina), moléculas ampliamente utilizadas en la medicina veterinaria, y que se caracterizan por su difícil extracción desde matrices orgánicas y complejo análisis instrumental. Esta metodología no invasiva, permitirá evaluar la presencia de residuos en animales tratados, facilitando la opción de tomar medidas preventivas medioambientales, productivas, y relevantes para la salud pública, aplicando un enfoque integral y con perspectiva sobre la posible recirculación de residuos antimicrobianos y como identificar o mitigar su impacto.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Uso de antibióticos en la industria

En la industria agropecuaria, el uso de antibióticos ha sido ampliamente cuestionado debido a que durante mucho tiempo fueron utilizados de forma excesiva a causa de los beneficios productivos que generaban, llegando incluso a administrarse como promotores del crecimiento, o también con fines profilácticos para evitar el desarrollo de enfermedades, sin cumplir con criterios de aplicación asociados (Millanao *et al.*, 2011). Posteriormente, comenzaron a surgir investigaciones que sugerían que estas prácticas favorecían el desarrollo y multiplicación de bacterias multirresistentes inducidas por la presión de selección que generaba la aplicación de estos fármacos (Espinosa *et al.*, 2019). La repercusión que podría generar este fenómeno en la salud humana fue la razón que impulsó el desarrollo de diversas políticas públicas tanto nacionales como internacionales, con la finalidad de controlar el riesgo que podría suponer este hecho para la salud pública (Gatica y Rojas, 2018).

Las consecuencias del uso indiscriminado de estos fármacos no solo tienen una repercusión en la salud humana, sino que también a nivel animal y ambiental, situación que reafirma la importancia de trabajar bajo el enfoque de una salud (*One Health*) (Gatica y Rojas, 2018). Un claro ejemplo de esta situación queda en evidencia en la publicación de Xiangang *et al.*, (2010) donde se investigó la presencia de antibióticos comúnmente utilizados en medicina veterinaria a nivel productivo en suelos, vegetales y aguas subterráneas, confirmando su presencia y encontrando una correlación positiva entre la concentración de antibióticos en vegetales y el nivel de solubilidad que estos presentaban con respecto al agua. También propusieron que los antimicrobianos pueden bioacumularse en vegetales a bajas concentraciones y causar efectos negativos en la microflora del suelo, perjudicando también a plantas y siembras. Un claro ejemplo de esto, es el efecto que generan los residuos antimicrobianos en el trigo, donde se ha demostrado bajo condiciones de laboratorio, que estos causan una disminución en la tasa de elongación del brote y sus raíces (Jin *et al.*, 2009).

Las heces y deyecciones contaminadas con residuos antimicrobianos, al utilizarse como fertilizantes, también pueden generar efectos negativos en la biota a diferentes niveles

tróficos. Además de ser absorbidos por las plantas las cuales serán destinadas a consumo animal continuando el ciclo de contaminación, también pueden interferir en sus procesos fisiológicos. Estos efectos negativos han sido registrados a través de pruebas de toxicidad agudas y crónicas, revelando un impacto negativo de los antibióticos en el proceso de fotosíntesis, afectando la expresión de genes del cloroplasto y su proliferación celular, además de generar daño en la mitocondria, causando una respuesta oxidativa en las plantas (Polianciuc *et al.*, 2020).

Toxicidad ambiental de Betalactámicos y Aminoglucósidos

Los antibióticos pueden generar diversos grados de toxicidad en el ambiente y en el consumidor, dependiendo de la dosis o concentración utilizada, de su estructura molecular, y/o de sus propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, los betalactámicos suelen considerarse que tienen una baja toxicidad para humanos y animales, pero se ha demostrado que su presencia puede afectar la división de plastídios en plantas menores, como también inhibir la actividad de la enzima catalasa en el cerebro de ejemplares de *Danio rerio* adultos, una especie de pez cebra utilizada como modelo *in vivo* para distintos modelos experimentales (Polianciuc *et al.*, 2020).

La presión selectiva asociada a la contaminación por antimicrobianos además de generar resistencias bacterianas puede afectar la composición de la microbiota ambiental, reduciendo su variabilidad taxonómica y modificando su composición. Esto puede generar la pérdida de microorganismos con roles críticos en ecosistemas. En ambientes acuáticos pueden ser responsables de afectar especies participantes del ciclo del carbono y de la producción primaria, mientras que, en ambientes terrestres, pueden generar una pérdida de biomasa y la reducción de actividades tales como la nitrificación, desnitrificación y respiración (Kraemer *et al.*, 2019). Otro efecto relevante informado, es que pueden generar disrupción en las distintas comunidades microbianas afectadas, aumentando la presencia de parásitos y especies patógenas en aguas y suelos, hecho que ha sido demostrado en ambientes acuáticos, donde se ha evidenciado que los antibióticos generaron un aumento de la presencia de especies tóxicas de *Cyanobacteria*, causando una eutroficación de aguas que previamente habían sido constatadas como limpias (Drury *et al.*, 2013).

Efectos sobre la salud pública y animal de Betalactámicos y Aminoglucósidos

El consumo de residuos farmacológicos por parte de la población a través de alimentos de origen animal tratados con antibióticos representa un riesgo en la salud de la población, pudiendo desencadenar reacciones adversas de distinto tipo ligadas a las características físico/químicas de cada antibiótico (Polianciuc *et al.*, 2020). Tal es el caso de las penicilinas, las cuales pueden desarrollar reacciones alérgicas en los individuos tras un consumo prolongado (Guzmán *et al.*, 2004), además de que representan la mayor cantidad de casos de hipersensibilidad en comparación a otros tipos de fármacos. La manifestación clínica de esta hipersensibilidad puede manifestarse de manera inmediata, en caso de ser mediada por inmunoglobulinas o anticuerpos clase IgE, donde el paciente presenta signos característicos de urticaria, angiedema y broncoespasmos, o una reacción tardía mediada por anticuerpos IgG donde el paciente desarrolla toxidermia y exantemas máculopapulares (Guzmán *et al.*, 2004).

Por otro lado, el consumo o la aplicación de aminoglucósidos puede presentar una potencial nefrotoxicidad y ototoxicidad en el individuo (Mella *et al.*, 2004). En el caso particular de neomicina y espectinomicina, estos se consideran principalmente cocleotóxicos, esto ocurre debido a que provocan destrucción de las células ciliadas externas de la cóclea (Quintero *et al.*, 2018). Por su parte, la nefrotoxicidad de estos fármacos radica en que, debido a su tamaño y alta carga policationica, son pobremente absorbidas por membranas biológicas, lo que implica su acumulación en las células tubulares proximales del riñón. Se cree que, por esta razón, entre el 8-26% de los individuos que reciben aminoglucósidos como tratamiento por varios días presentan trastornos renales (Pérez-Barriocanal *et al.*, 2000). Estos efectos adversos adquieren una mayor relevancia considerando que un porcentaje de estas moléculas no son metabolizadas, y que, por ende, se excretan inalteradas hacia el ambiente, pudiendo ser consumidas indirectamente por especies productivas, generando los efectos tóxicos anteriormente descritos por bioacumulación como consecuencia de un consumo crónico en bajas dosis (Kraemer *et al.*, 2019; Xiangang *et al.*, 2010; Krauser *et al.*, 2016).

De igual forma, se ha investigado la presencia de residuos antimicrobianos en las heces de animales utilizados para la alimentación de otras especies tales como cerdos, bovinos y pollos (Berendsen *et al.*, 2015; Cornejo *et al.*, 2017; Ji-Ran *et al.*, 2017). Estos estudios se han

enfocado principalmente en el peligro que implica la utilización de estas heces como fertilizante, o bien, como subproductos de alimentación, tales como la cama de Broiler (Cornejo *et al.*, 2017; Rojas y Manriquez, 2007). Esta preocupación surge a raíz del efecto acumulativo que podría tener el consumo, ya sea directo o indirecto de alimentos que presenten estos contaminantes (Singer *et al.*, 2016). Por su parte, Berendsen *et al.* (2015) ha demostrado la viabilidad de la utilización de heces de animales productivos como matriz de análisis, argumentando la importancia de un monitoreo no invasivo que permita reforzar las políticas públicas de la Comunidad Europea ligadas al control de residuos antimicrobianos, proponiendo también la implementación de un método multiresidual que consista en la utilización de esta matriz no invasiva y que permita determinar la presencia y concentración de múltiples antibióticos en un solo análisis.

Análisis instrumental de residuos de Betalactámicos y Aminoglucósidos

En general, el análisis de residuos antimicrobianos en distintas matrices de origen animal se realiza mediante técnicas cromatográficas HPLC-MS/MS, sin embargo, para estas dos familias de moléculas, se ha presentado un desafío analítico tanto para la inclusión en métodos de análisis multiresiduales, como en su inclusión en métodos convencionales analíticos, pues se ha descrito que, en el caso de los aminoglucósidos, su alta polaridad obliga a establecer condiciones de extracción y cromatográficas específicas para estas moléculas (Van Dujikeren *et al.*, 2019). En el caso de betalactámicos específicamente, no se ha logrado establecer un método de análisis para la matriz heces, debido a que se ha descrito que el anillo betalactámico de su estructura es sensible a la hidrólisis de enzimas betalactamasas producidas por bacterias presentes en esta matriz (Berendsen *et al.* 2015), además de que en el caso de las deyecciones de Broiler, al presentar un bajo pH y una alta concentración de amonio y de fosfatos, favorecen la degradación de la estructura de los betalactámicos (Kakimoto y Funamizu, 2006; Berednsen *et al.*, 2013). Es por esta razón que se necesita un método analítico capaz de determinar la presencia tanto de aminoglucósidos como de betalactámicos en una matriz de análisis compleja, como es el caso de las heces, con el fin de obtener información respecto a las concentraciones de estas moléculas eliminadas por estas vías, para posteriormente, evaluar el efecto de dichas concentraciones en el ambiente y en su microbiota.

Siguiendo esa línea investigativa, el presente estudio tiene como finalidad implementar un método analítico que permita contribuir a un adecuado control y monitoreo de betalactámicos y aminoglucósidos en deyecciones, simplificando la metodología utilizada para este fin y permitiendo establecer protocolos o tratamientos previos al beneficio o utilización de heces de animales productivos tratados farmacológicamente evitando un ciclo de contaminación, además de permitir determinar la presencia de residuos farmacológicos antes del sacrificio del animal productivo, ahorrando los costos asociados al decomiso y contribuyendo al resguardo de la salud pública, animal y ambiental (Asenjo, 2016; Tamhankar y Lundborg 2019).

OBJETIVO GENERAL:

Implementar un método confirmatorio mediante HPLC-MS/MS para la detección y cuantificación de amoxicilina, ampicilina, neomicina y espectinomicina en deyecciones de pollos Broiler.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Desarrollar un método de extracción analítico químico para la determinación de residuos farmacológicos de amoxicilina, ampicilina, neomicina y espectinomicina en deyecciones de pollos Broiler.

2.- Evaluar parámetros cromatográficos para el desarrollo de un método confirmatorio de análisis mediante espectrometría de masas (HPLC MS/MS) en deyecciones de pollos Broiler para la detección de amoxicilina, ampicilina, neomicina y espectinomicina.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente memoria de título se realizó en el marco del proyecto FONDEF IDeA I+D 2019 ID19I10033 “Desarrollo y validación de una metodología rápida, económica y no invasiva para la detección de residuos de tetraciclinas, quinolonas, sulfonamidas, aminoglucósidos, macrólidos y betalactámicos”, en las dependencias del Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile (FARMAVET).

Obtención de muestras analíticas y n muestral

Se utilizaron deyecciones extraídas directamente de pollos Broiler sin tratamiento farmacológico, obtenidas durante el desarrollo del proyecto FONDEF IDeA I+D 2019 ID19I10033. El número de muestras fue determinado según los requerimientos de la normativa de validación de métodos analíticos de la unión europea 2002/657/CE (EC, 2002) para cada parámetro evaluado. Las deyecciones obtenidas fueron previamente analizadas para determinar que estuvieran libres de residuos.

Además, las muestras fueron obtenidas bajo los requerimientos del comité de bioética según el certificado N° 19331-VET-UCH, cumpliendo, además, los requisitos del comité de bioseguridad de la facultad de medicina veterinaria de la Universidad de Chile bajo certificado N°153.

Reactivos y estándares

Como estándares analíticos se utilizaron amoxicilina trihidrato, neomicina sulfato y espectinomicina dihidrocloruro pentahidratado, obtenidas de Dr.Ehrenstorfer®, mientras que ampicilina de sodio y penicilina G fue obtenida de SIGMA-ALDRICH®. Como estándar Interno (EI) de aminoglucósidos se utilizaron gentamicina y estreptomina mientras que como EI para betalactámicos se utilizó amoxicilina D4. Todos los estándares fueron de pureza certificada, obtenidos de Dr.Ehrenstorfer®.

Los reactivos y solventes usados para la implementación de estas metodologías correspondieron a agua, acetonitrilo (ACN) y metanol (MEOH) de grado HPLC, ácido fórmico grado reactivo ACS®, acetato de amonio, ácido heptafluorobutírico (HFBA, por sus siglas en inglés), ácido tricloroacético (TCA, por sus siglas en inglés), fosfato monopotásico,

fosfato disódico, cloroformo y hexano, todos pertenecientes a la marca MERCK[®], todas ellos de grado P.A. o similar. Las soluciones de extracción utilizadas fueron TCA al 5% en agua, *buffer* fosfato de pH 7,5 en agua, amoníaco diluido al 10% en agua, HFBA 0,02 M en agua, HFBA 0,2 M en ACN, mientras que las soluciones para el método instrumental (fases móviles) fueron HFBA 0,05 M en agua, HFBA 0,05 en ACN, ácido fórmico 0,01% con acetato de amonio 0,2 mM en agua y ácido fórmico 0,01% en ACN.

Métodos de extracción y condiciones cromatográficas generales.

Para establecer los métodos de extracción y las condiciones cromatográficas del estudio, se utilizaron como referencia los parámetros establecidos por el *United States Department of Agriculture* para la detección de betalactámicos (USDA, 2011a) y aminoglucósidos (USDA, 2011b) a través de cromatografía líquida de alta performance asociada a un espectrómetro de masas tándem de triple cuadrupolo (HPLC-MS/MS Q3, por sus siglas en inglés). Se realizaron modificaciones en el método de extracción para mejorar parámetros como recuperación, resolución, sensibilidad y especificidad, evaluando la capacidad extractiva de diferentes solventes que cumplan con las características fisicoquímicas que permitan la extracción de los analitos de interés, además de la utilización de cartuchos de extracción en fase sólida (SPE, asociado a sus siglas en inglés) para optimizar la metodología. Asimismo, las muestras se liofilizaron con el fin de disminuir la dificultad analítica de esta matriz debido a sus propiedades fisicoquímicas, aumentando su pH, y dificultando la presencia de bacterias debido a la reducción de la actividad de agua en la matriz el pH de las muestras.

Proceso de extracción de aminoglucósidos

En el caso de aminoglucósidos se pesaron $2 \pm 0,1$ g de deyecciones previamente liofilizadas en un tubo Falcon de 50 mL, añadiendo una solución de 10 mL de ácido tricloroacético 10% en agua y 10 mL de cloroformo para posteriormente agitar, sonicar y centrifugar durante 15 minutos a 4200 rpm. El sobrenadante se trasvasijó a otro tubo Falcon de 50 mL, repitiendo la extracción y mezclando ambos sobrenadantes, ajustando el pH de cada una de las muestras entre 8,4 y 8,6 utilizando una solución de amoníaco al 10% en agua. Se procedió a centrifugar durante 5 minutos a 4200 rpm y a filtrar con filtros Whatman[®] de microfibras de vidrio cada una de las muestras para luego pasar la muestra a través del cartucho de extracción en fase sólida, previamente acondicionado con 6 mL de metanol seguidas de 5 mL de agua y 4 mL

de HFBA 0,02 M. Luego de cargar el extracto, el cartucho debió ser lavado con 5 mL de agua y posteriormente secado. Se realizó la elusión del contenido con 6 mL de HFBA 0,2M en ACN recibiendo el eluido en tubos de vidrio de 10 mL secándolo bajo flujo de nitrógeno en un baño temperado a 40°C, reconstituyendo la muestra con 400 µL de HFBA 0,05 M, y centrifugándola en un tubo Eppendorf a 13000 rpm por 30 minutos y filtrado con filtros Millex® de 0,22 µm. Finalmente se agregó el contenido a un vial de vidrio para su lectura en el instrumento.

Proceso de extracción de betalactámicos

En el caso de betalactámicos se pesó $2 \pm 0,1$ g de deyecciones previamente liofilizadas en un tubo Falcon de 50 mL, se agregó 5 mL de *buffer* fosfato Ph 7,5 y 5 mL de cloroformo. Se agitó, sonicó y centrifugó la muestra durante 15 minutos a 4200 rpm, se extrajo el sobrenadante, luego se repitió la extracción, trasvasijando el contenido a otro tubo Falcon de 50 mL, agregando 5 mL de hexano, para posteriormente agitar, sonicar y centrifugar nuevamente a 4200 rpm durante 15 minutos, descartando el sobrenadante y filtrando las muestras con filtros Whatman® de microfibra de vidrio, se cargó el extracto al cartucho de extracción previamente acondicionado con 6 mL de agua, 6 mL de ACN y 6 mL de *buffer* fosfato pH 7,5. Luego, la columna fue secada y eluído el contenido con 10 mL de ACN. Posteriormente el eluido se concentró bajo flujo de nitrógeno hasta llevar a sequedad, reconstituyéndose con 300 µL de ácido fórmico 0,01% con acetato de amonio al 0,2 mM, para finalmente ser filtrado con filtros Millex de 0,22 µm y agregado el contenido a un vial de vidrio para su posterior lectura.

Instrumentación y evaluación de parámetros cromatográficos.

Los criterios de confirmación por masas (Tabla 1) y las condiciones cromatográficas del método analítico (Tabla 2) están descritas y fueron modificadas y optimizadas de acuerdo con las condiciones instrumentales y analíticas del Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile (FARMAVET). Para el presente trabajo se utilizó un cromatógrafo líquido HPLC, constituido por una bomba cuaternaria Agilent 1260, un *autosampler* Agilent 1290 y un horno de columna serie Agilent 1290 acoplado a un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo modelo TQ 5500, ABSciex®. La columna analítica (fase estacionaria) utilizada correspondió a una C18 Sunfire (3,5µm x 2,1mm x 150

mm) de Waters® para neomicina y espectinomicina, y una columna C18 Xbridge (3,5um x 2.1mm x 150mm) de Waters® para amoxicilina y ampicilina. Para el análisis espectroscópico y cromatográfico de las muestras, se utilizaron los *softwares* Analyst® versión 1.6.2 y MultiQuant® 3.0.

Tabla Nro. 1 Criterios de confirmación de Betalactámicos y Aminoglucósidos.

Analito	Ión Precursor (DA)	Fragmentos iónicos (DA)
Espectinomicina	351,0	333,0 – 207,0
Neomicina	615,0	293,0 – 161,0
Amoxicilina	366,074	114,018-349,120
Ampicilina	350,0	106,0-160,0
Penicilina G	335,0	217,0-202,0
Amoxicilina D4	371,09	114,9
Gentamicina	464,0	322,0
Estreptomycinina	582,0	263,0

(Fuente: USDA, 2011a y USDA, 2011b).

Tabla Nro. 2 Aminoglucósidos, configuración instrumental modificada.

Familia de antibióticos	Gas cortina (psi)	Gas colisionador (psi)	Voltaje de ionización	Temperatura del capilar °C	Gas 1 de la fuente de ionización (psi)	Gas 2 de la fuente de ionización (psi)
Aminoglucósidos	15,0	8	5000,0	550,0	50,0	40,0
Betalactámicos	15,0	8	5500,0	350,0	50,0	30,0

(Fuente: USDA, 2011a).

La gradiente cromatográfica de volúmenes de fases móviles para el análisis de amoxicilina y ampicilina (Tabla 3) consistió en ácido fórmico al 0,01% y acetato de amonio 0,2 mM en agua (Fase A) y ácido fórmico al 0,01% en ACN (Fase B). El volumen de inyección que se utilizó para el método analítico fue de 20 μ L.

Tabla Nro. 3 Betalactámicos, gradiente de la bomba modificada.

Tiempo (min)	Fase móvil acuosa	Fase móvil orgánica	mL/min
0.00	80	20	0,35
3	80	20	0,35
6	20	80	0,35
12	80	80	0,35
15	80	20	0,35

(Fuente: USDA, 2011a).

La gradiente cromatográfica en el análisis de neomicina y espectinomina consistió en HFBA en agua al 0,05M (Fase A) y HFBA al 0,05 M en ACN (Fase B) (Tabla 4). Se utilizó un volumen de inyección de 20 μ L.

Tabla Nro. 4 Aminoglucósidos, Gradiente de la bomba modificada.

Tiempo (min)	Fase móvil acuosa	Fase móvil orgánica	mL/min
0	72	28	0,3
3	35	65	0,3
5	10	90	0,3
7	10	90	0,3
7.1	72	28	0,3
14	72	28	0,3

(Fuente: USDA, 2011b).

Criterios y parámetros de verificación

Los criterios que se utilizaron para implementar la técnica cromatográfica se ajustaron a las recomendaciones de la Decisión de la Comisión 2002/657/CE. Los parámetros evaluados se realizaron para ambas familias de antibióticos de forma independiente. Los parámetros analíticos que fueron definidos son los siguientes:

- I. Tiempo de retención del estándar:** se analizaron soluciones puras de los analitos. Se realizaron seis replicados que se compararon con las muestras blanco. Se evaluó el CV% (Coeficiente de variación) de las repeticiones, aceptando el parámetro con un CV% < a 5%
- II. Especificidad:** Se analizaron 20 muestras blanco de diferentes fuentes para evaluar si existen interferentes en la región cromatográfica de interés en la cual se espera la elución del analito.
- III. Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC) del método analítico:** se buscó la concentración más baja donde la relación señal: ruido fuera a lo menos 3:1 para el LD y a lo menos 10:1 para el LC. Para determinar el Límite de Cuantificación se analizaron 20 muestras de matriz fortificada de cada analito al nivel del límite de detección seleccionado, las que debían tener un CV% menor al 25%. Para el cálculo del límite de cuantificación, se utilizó la siguiente formula;

$$LC = LD + 1,64 * DS$$

Dónde:

LC: Limite de Cuantificación

LD: Limite de Detección

DS: Desviación estándar de las 20 muestras cuantificadas al LD.

- IV. Linealidad de las curvas de calibración:** Se analizaron 3 curvas, fortificadas al menos a cinco concentraciones equidistantes a partir del límite de detección para cada uno de los analitos, realizando un análisis de función lineal, siendo aceptadas al presentar un coeficiente de determinación (R²) mayor o igual 0,95.

Cuantificación y análisis de muestras

Para determinar la concentración de cada una de las muestras, se efectuó una regresión lineal de las curvas de calibración en matriz fortificada, asociando las áreas *ratio* obtenidas a partir de las muestras a sus concentraciones correspondientes, donde las curvas de calibración debieron tener un R² mayor o igual a 0,95. Para la determinación de las áreas *ratio* de cada muestra se utilizó la siguiente ecuación con las áreas de los fragmentos de cada molécula obtenidas desde los cromatogramas:

$$\textit{Área Ratio} = \textit{Área del ion de transición mayoritaria} / \textit{Área de estándar interno}$$

Luego de obtener los datos mencionados, se procedió a calcular la función lineal de la recta de la curva de calibración, para poder establecer la concentración de analitos detectados en cada triplicado, reemplazando el valor obtenido en la siguiente ecuación:

$$\textit{Concentración } \mu\text{g/Kg} = \textit{Área ratio} - \textit{Intercepto de la curva de calibración} / \textit{Pendiente de la curva de calibración}$$

RESULTADOS

Todos los análisis realizados en este estudio fueron en las dependencias del laboratorio de farmacología de la universidad de Chile (FARMAVET), acreditado bajo NCh ISO/IEC 17025:2017 y centro de colaboración asociado a la OMSA (ex OIE).

Objetivo 1. Desarrollar un método de extracción analítico químico para la determinación de residuos de amoxicilina, ampicilina, neomicina y espectinomicina en deyecciones de pollos Broiler.

Desarrollo de las condiciones de extracción para la matriz deyecciones de pollos Broiler:

Las condiciones de extracción de las metodologías se basaron inicialmente en los métodos de la USDA (USDA, 2011a y USDA 2011b) para betalactámicos y aminoglucósidos en músculo, sin embargo, debido las características fisicoquímicas de la matriz, durante el proceso de elusión de la muestra a través del cartucho de extracción en fase sólida (SPE), hubo saturación y obstrucción de los poros del material de relleno, por lo tanto, fue necesario realizar cambios en el método de extracción para continuar con este proceso. Para obtener un mejor proceso de elución desde la columna, fue necesario liofilizar las muestras de deyecciones de pollos Broiler previamente, antes de iniciar la metodología de extracción mejorando la recuperación y determinación de analitos que previamente no pudieron ser evaluados tanto por la complejidad de la extracción, como por la presencia de interferentes en la posterior lectura en el instrumento como en el caso de penicilina G (Figura 1).

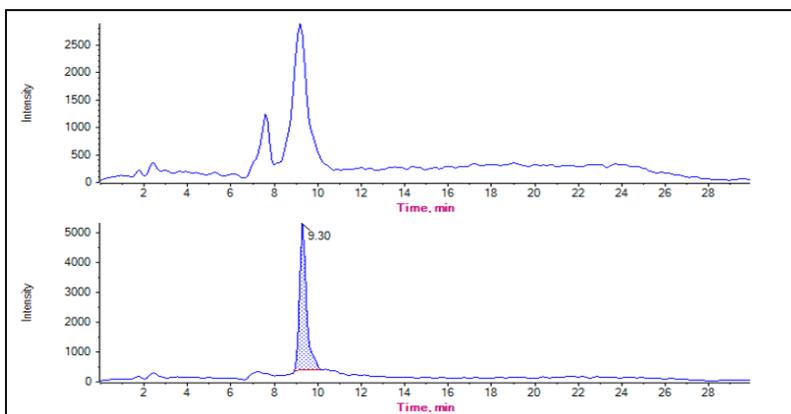


Figura Nro.1. Cromatogramas de penicilina G extraída en matriz deyecciones con liofilización (abajo) y sin liofilización (arriba).

Condiciones de extracción desde deyecciones para aminoglucósidos.

El método desarrollado para la extracción de los aminoglucósidos debió incluir modificaciones respecto a las metodologías seleccionadas inicialmente, modificaciones que consistieron en aumentar la concentración de ácido tricloroacético hasta alcanzar el 10% en agua, con el fin de facilitar la precipitación del contenido orgánico presente en la muestra, incorporando además, un proceso de filtración y centrifugación en la metodología luego de ajustar el pH de las muestras con una solución de amoníaco al 10%. Esto ayudó a eliminar la capa de sobrenadante que generaba dificultades en el paso por la columna SPE. Otro cambio que debió incorporarse por este motivo fue el aumento del tiempo de centrifugación en cada uno de los pasos correspondientes al método, además de incluir solventes de descarte como hexano y cloroformo con el fin de eliminar compuestos orgánicos apolares de baja y alta densidad respectivamente.

El método utilizado finalmente para la extracción de aminoglucósidos consistió en pesar 2g +/- 0,5 de muestra liofilizada, a la cual se agregó 10 mL de ácido tricloroacético al 10%, cloroformo y hexano, fue centrifugada, ajustado su pH entre 8,4 y 8,6 y filtrada con microfibra de vidrio. La columna SPE fue acondicionada, trasvasiado el contenido del extractante, secado y eluido para posteriormente concentrar la muestra, llevarla a sequedad, reconstituida, centrifugada y filtrada por filtros Millex de 0,22 μm .

Condiciones de extracción desde deyecciones para betalactámicos.

En el caso del método de extracción de betalactámicos, fue necesario determinar la estabilidad en diferentes solventes, concluyendo que el uso de *buffer* fosfato a pH 7,5, lograba mantener estable las moléculas durante el proceso de extracción (figura 2), en este caso también fue necesario agregar cloroformo y hexano como compuestos de descarte para la centrifugación, además de aumentar los tiempos necesarios para separar cada una de las fases, mientras que el uso de filtros de microfibra de vidrio también fueron críticos para una correcta extracción de las muestras.

El método utilizado finalmente para la extracción de betalactámicos consistió en pesar 2g de muestra, agregar 5 mL de *buffer* fosfato de pH 7,5, 5 mL de cloroformo y 5 mL de hexano. La muestra fue centrifugada y recolectado el extractante. El cartucho SPE fue acondicionado, trasvasijada la muestra en su interior, el cartucho fue secado y posteriormente eluída la muestra. El contenido colectado fue llevado a sequedad, reconstituido centrifugada y filtrada por filtros Millex de 0,22 μm .

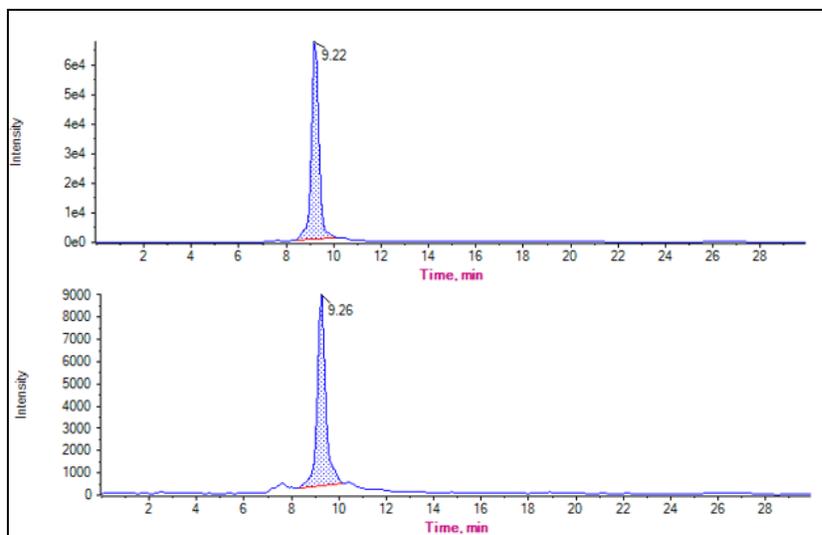


Figura Nro.2. Cromatograma de penicilina G mediante extracción con *buffer* fosfato en agua a pH 7,5 (arriba) y con acetato de etilo (abajo).

Objetivo 2. Evaluar parámetros cromatográficos para el desarrollo de un método confirmatorio de análisis mediante espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) en deyecciones de pollos Broilers para la detección de amoxicilina, ampicilina, neomicina y espectinomina.

Para el cálculo e interpretación de los resultados, se siguió el reglamento de ejecución relativo al funcionamiento de métodos analíticos de la unión europea 2002/657/CE (EC, 2002).

Tiempo de Retención

Luego de evaluar los tiempos de retención de cada uno de los analitos presentes en este estudio, se concluyó que el CV de cada uno de ellos cumplió con el criterio de obtención de un CV de las 6 repeticiones menor a un 5%, siendo cada uno de ellos menor al 0,5% (Tabla 5), aceptándose los criterios para establecer este parámetro.

Tabla Nro. 5 Tiempo de retención de los analitos.

Analitos	Tiempo de retención (min)						Promedio	Desv. Est.	CV %
	1	2	3	4	5	6			
Espectinomocina	3,18	3,19	3,19	3,18	3,19	3,19	3,187	0,0052	0,16
Neomicina	6,96	6,97	6,97	6,96	6,97	6,97	6,967	0,0052	0,07
Penicilina G	8,65	8,65	8,66	8,65	8,66	8,66	8,655	0,0055	0,06
Ampicilina	3,41	3,4	3,4	3,38	3,37	3,39	3,392	0,0147	0,43
Amoxicilina	1,92	1,92	1,92	1,92	1,91	1,92	1,918	0,0041	0,21
Amox D4 (EI)	1,92	1,92	1,92	1,92	1,91	1,92	1,918	0,0041	0,21
Gentamicina (EI)	6,69	6,69	6,69	6,69	6,69	6,69	6,69	0	0
Estreptomocina (EI)	5,14	5,14	5,13	5,12	5,12	5,13	5,13	0,0089	0,7

Especificidad.

Con respecto al parámetro de especificidad obtenido a partir de las 20 muestras blanco de distintos orígenes, para el analito neomicina no se presentan interferentes cromatográficos en los tiempos de retención obtenidos previamente para esta molécula. (figura 3).

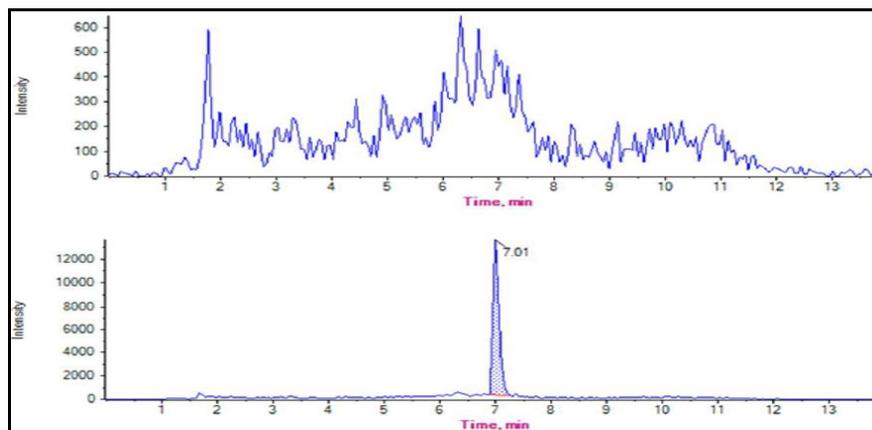


Figura Nro. 3 Muestra blanco (arriba) y muestra control a 400 µg/kg de neomicina (abajo).

Para el análisis de espectinomicina en cambio, si se presentan interferentes cromatográficos, donde la media de las *áreas ratio* de estos interferentes encontrados en las 20 repeticiones, consistió en el 32,5% de las *áreas ratio* presentadas en los controles, siendo posible descontar este valor y corregirlo en la curva de calibración y en los controles fortificados (Figura 4), cumpliendo con cada uno de los parámetros especificados para la determinación del analito luego del descuento aritmético.

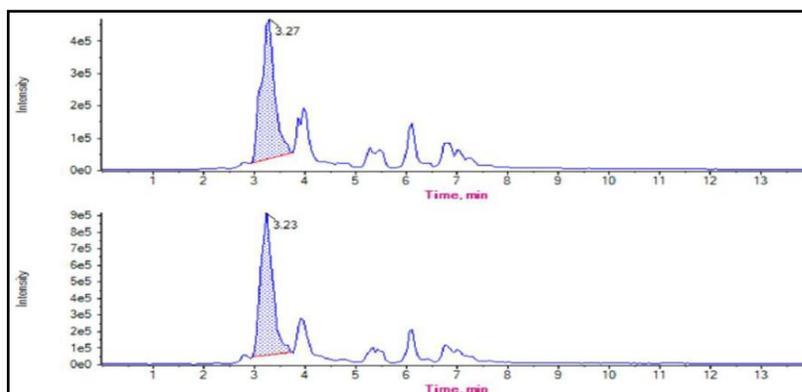


Figura Nro. 4 Muestra blanco (arriba) y muestra control a 250 µg/kg (abajo) de espectinomicina respectivamente

Para amoxicilina y ampicilina no se logró cumplir con el criterio de especificidad, debido a que se presentan interferentes en el tiempo de retención de estos analitos. Además, no fue posible identificar peaks correspondientes a los analitos en los controles fortificados utilizados como controles (Figura 5).

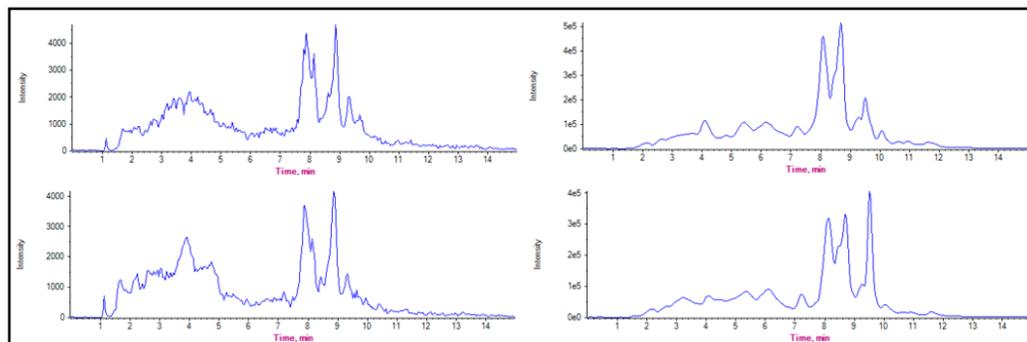


Figura Nro. 5 Muestra blanco de deyecciones (arriba) y muestras control fortificadas (abajo) de ampicilina (izquierda) y amoxicilina (derecha).

Entre los analitos utilizados como EI, se observó que amoxicilina D4 si pudo ser determinada en el tiempo de retención correspondiente (figura 6), a diferencia de la molécula de amoxicilina.

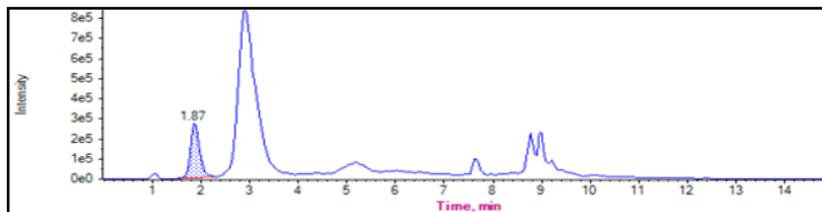


Figura Nro. 6 Muestra control fortificado a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de amoxicilina-D4

Durante el estudio, se incluyó el análisis de penicilina G como otro representante de la familia de los betalactámicos. Esta molécula (a diferencia de amoxicilina y ampicilina), si resultó ser específica frente a las condiciones presentes en esta metodología, donde se determinó su presencia en los controles fortificados y no presentó interferentes asociados a su tiempo de retención (figura 7).

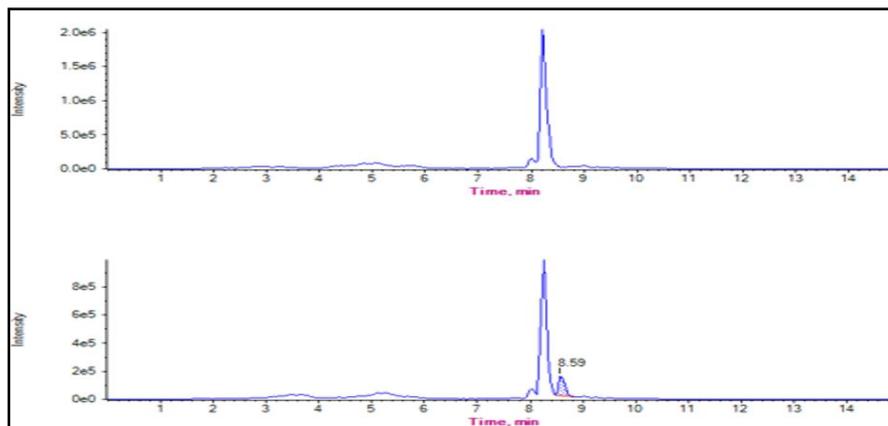


Figura Nro. 7 Muestra blanco de deyecciones (superior) y muestra control fortificada de penicilina G a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (inferior).

Límite de detección y límite de cuantificación.

Con respecto a los límites de detección (LD) y cuantificación (LC), tanto en aminoglucósidos como en penicilina G se cumplió con el criterio inicial de ser al menos 3 veces la señal ruido en el LD y 10 veces la señal ruido en el LC. Además, se cumplió el criterio de que los controles fortificados evaluados al límite de detección presentaran un coeficiente de variación menor a un 25% (Tabla 6).

Para espectinomicina se obtuvieron límites de detección y de cuantificación de 250 µg/kg y 251,09 µg/kg respectivamente, mientras que el coeficiente de variación entre los controles fue de un 4,211% (tabla 6). Con respecto a neomicina, se obtuvo un LD de 400 µg/kg y un LC de 400,09 µg/kg, mientras que el coeficiente de variación entre los controles fortificados al LD fue de un 7,29% (tabla 6). Finalmente, para penicilina G, se alcanzaron LD y LC de 30 µg/kg y 30,019 µg/kg respectivamente. En el caso del CV de los 20 controles al LD, este correspondió a 3,038%, siendo el analito que menos variación tuvo en este parámetro (tabla 6).

Tabla Nro. 6 Parámetros analíticos asociados al LD y LC de espectinomicina, neomicina y penicilina G.

Analito	Parámetro	Unidad de medida	Valores
Espectinomicina	LD	µg/kg	250
	DS	µg/kg	0,661
	LC	µg/kg	251,09
	Media controles	Área ratio	15,695
	CV% controles	-	4,211%
Neomicina	LD	µg/kg	400
	DS	µg/kg	0,018
	LC	µg/kg	400,029
	Media controles	Área ratio	0,244
	CV% controles	-	7,29%
Penicilina G	LD	µg/kg	30
	DS	µg/kg	0,011
	LC	µg/kg	30,019
	Media controles	Área ratio	0,369
	CV% controles	-	3,038

Linealidad.

La linealidad fue evaluada en cada una de las curvas de calibración, cumpliendo en todas ellas con el requisito mínimo del parámetro evaluado, que consiste en presentar un coeficiente de determinación (R^2) mayor o igual a 0,95, obteniendo a partir de cada una de ellas como resultado final un R^2 de 0,99. Para espectinomina, se evaluaron cada una de sus 3 curvas de calibración, fortificadas a 5 concentraciones equidistantes, que correspondieron a 250, 300, 350, 400 y 450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figura 8).

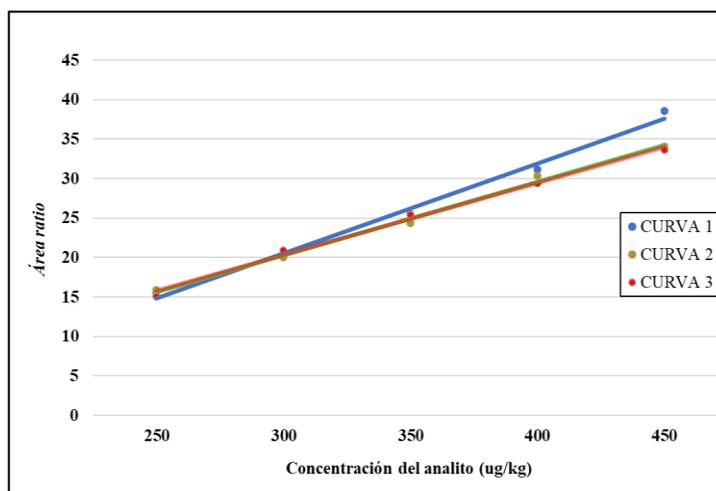


Figura Nro. 8 Modelos de regresión lineal para espectinomina.

Utilizando estas curvas de calibración, se obtuvieron recuperaciones promedio de 103,2, 100,4 y 99,7 % correspondientes a las curvas 1, 2 y 3 respectivamente para cada punto de fortificación. Además, el CV de las tres pendientes fue de 12,55%, demostrando que las cuantificaciones fueron coherentes y repetitivas en cada una de las curvas (tabla 7).

Tabla Nro. 7 Parámetros asociados a la linealidad de espectinomicina neomicina y penicilina G.

Analito	Parámetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Espectinomicina	Media % recuperación	103,2%	100,4%	99,7%
	Pendiente	0,1138	0,0933	0,0912
Neomicina	Media % recuperación	92,90%	98,40%	97,80%
	Pendiente	0,0043	0,005	0,0059
Penicilina G	Media % recuperación	58,82%	80,27%	75,78%
	Pendiente	0,0111	0,0127	0,0124

Al evaluar las curvas de calibración para la molécula de neomicina, estas fueron fortificadas a 5 puntos crecientes y equidistantes entre sí, los que correspondieron a concentraciones de 400, 450, 500, 550 y 600 µg/kg (figura 9).

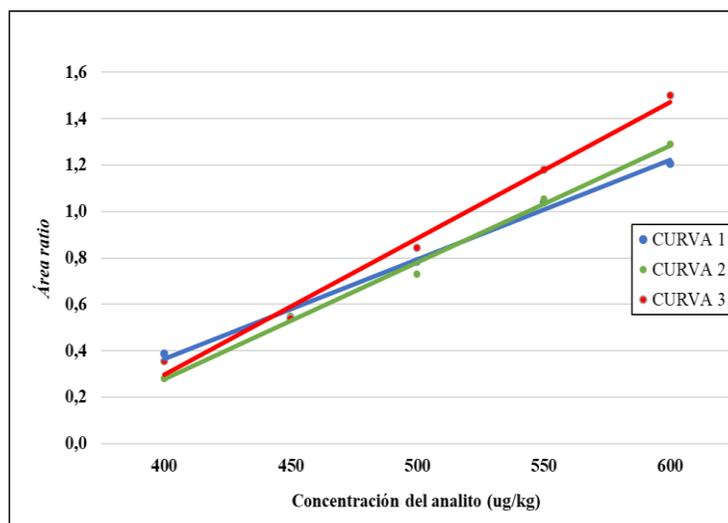


Figura Nro. 9 Modelos de regresión lineal para neomicina

Se utilizaron las curvas para evaluar las recuperaciones al punto más bajo de la curva de calibración observándose una mayor variabilidad entre sus tendencias en comparación a

espectinomicina, esto puede evidenciarse en el CV% calculado para sus pendientes, correspondiente a 15,83% para neomicina, a diferencia del 12,55% de CV% entre las pendientes del analito anteriormente mencionado, mientras que la media recuperación de los controles fortificados fue de 92,90; 98,40 y 97,80 % para las curvas 1, 2 y 3 respectivamente.

Finalmente, la linealidad de las curvas de penicilina G fue evaluada con 6 puntos fortificados a concentraciones crecientes y equidistantes entre sí, las que correspondieron a 30, 60, 90, 120, 150 y 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ figura 10).

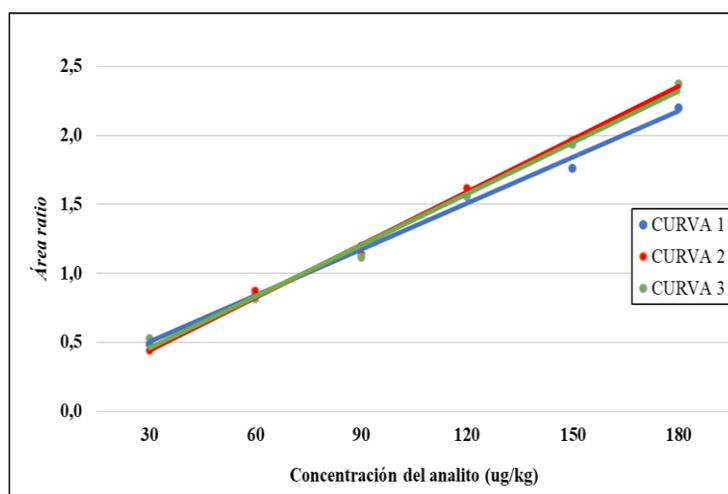


Figura Nro. 10 Modelos de regresión lineal para penicilina G.

La recuperación obtenida de los controles al punto más bajo de la curva de calibración consistió en 58,82; 80,27 y 75%, siendo inferior a las recuperaciones obtenidas en los demás analitos analizados en este estudio, sin embargo, el límite de detección de penicilina G consistió en 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que para espectinomicina y neomicina fue de 250 y 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente. En complemento a estos resultados, el CV entre las tres pendientes fue de un 7,04%, presentando menor variabilidad en comparación a neomicina y espectinomicina, que consistieron en 15,83 y 12,55% respectivamente (Tabla 7).

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de este estudio, se presentaron una serie de dificultades que están asociadas a las propiedades fisicoquímicas de la matriz y los analitos evaluados, siendo un desafío constante lograr establecer condiciones de extracción e instrumentales que permitieran mantener la estabilidad de las moléculas para su posterior lectura y cuantificación, con el fin de completar el objetivo general propuesto. Estos problemas ya habían sido descritos anteriormente por otros autores, asociándolos a la implementación y validación de moléculas pertenecientes a la familia de los betalactámicos en matrices similares. Por ejemplo, Beredsen *et al.* (2015), intentó incluir estas moléculas a un método multiresidual que utilizaba como matriz de análisis heces de cerdo, atribuyendo la dificultad para determinar su presencia a la carga de bacterias productoras de betalactamasas. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio muestran que, si bien no fue posible determinar amoxicilina ni ampicilina, si fue posible determinar la presencia de penicilina G, lo que podría deberse a diferencias en la estabilidad de la molécula frente al proceso de extracción o las condiciones de pH de la matriz, ya que amoxicilina y ampicilina a diferencia de penicilina G, presentan un comportamiento anfótero (Settimo *et al.*, 2014), teniendo un pKa ácido y uno básico, lo que podría facilitar su interacción y/o degradación con un espectro más amplio de moléculas, mientras que penicilina G solo presenta un pKa correspondiente a 2,72 (Settimo *et al.*, 2014), entre otras posibles causas asociadas a la estructura de las mismas.

Otro antecedente obtenido en esta investigación consiste en la detección de amoxicilina deuterada en muestras fortificadas con este estándar interno, sin interferentes en su tiempo, lo que contrasta los resultados obtenidos con la molécula de amoxicilina. Una razón que podría estar asociada a este resultado consiste en que, si bien, la optimización de las condiciones de extracción e instrumentales con el fin de conservar la estabilidad una molécula son factores críticos, también es necesario realizar una selección adecuada de los fragmentos iónicos utilizados para determinar y cuantificar la presencia de un analito, no sólo considerando la abundancia de ese fragmento y la intensidad de su respuesta instrumental, si no, que considerando la especificidad de esos fragmentos frente a una determinada matriz y las limitaciones de la técnica utilizada para evaluarlos. En el caso de la técnica de HPLC-MS/MS, se debe considerar que, aun siendo una técnica altamente sensible y específica, la

variedad de compuestos que pueden estar presentes en una matriz compleja como las deyecciones de pollos Broiler, permite que existan interferentes que tengan una relación masa/carga similar a la de los analitos de interés, pudiendo confundirse con la molécula o simplemente dificultando determinar su presencia por un incremento de la línea base. Esta situación podría explicar los resultados asociados a la ausencia de amoxicilina y ampicilina en las muestras fortificadas y también explicaría por qué, amoxicilina D4, al ser una molécula que debiese tener un comportamiento equivalente al de amoxicilina, pudo determinarse sin problemas. Esto se podría explicar debido a que amoxicilina D4, al tener cuatro átomos de hidrógeno sustituidos por átomos de deuterio, le entrega como característica una masa/carga ligeramente distinta a la molécula original, obteniéndose (en este caso) un peso molecular de cuatro *Dalton* (Da) por sobre la amoxicilina, y, por lo tanto, presentando interferentes distintos asociados al filtro de masa/carga específicos realizados por el instrumento al momento de seleccionar una masa para su análisis. Es debido a esto, que los betalactámicos han sido analizados en distintos tipos de detectores tradicionales a lo largo del tiempo, como, por ejemplo, detectores de fluorescencia, pero incluso en ese tipo de técnicas es necesario realizar procesos adicionales para facilitar la determinación de este tipo de compuestos y aumentar su expresión cromatográfica. En el caso de la utilización de un detector de fluorescencia, es necesario realizar un proceso de estabilización y adición de grupos fluoróforos a través de la derivatización del compuesto (Lara *et al.*, 2012).

Otra alternativa relacionada a superar las dificultades asociadas a la inestabilidad de los betalactámicos y su especificidad en esta matriz, es el análisis los productos de degradación de estas moléculas, los cuales ya han sido determinados previamente mediante HPLC-MS/MS, destacando principalmente, los productos generados a partir de amoxicilina, de los cuales, los más importantes corresponden al ácido amoxiciloico, el cual es un metabolito activo de esta molécula, y a amoxicilina 2,5-diketopiperazina, que corresponde a un isómero generado por un reordenamiento interno de los átomos de amoxicilina que ocurre al abrirse el anillo betalactámico presente en su estructura. (Freitas *et al.*, 2012; Nägele y Moritz, 2005; Chen *et al.*, 2019). Esto podría permitir establecer una relación entre la concentración de estos productos de degradación (o al menos uno de ellos) y la concentración inicial de amoxicilina, permitiendo una cuantificación indirecta de su presencia. Esta metodología podría ser útil como alternativa, sobre todo considerando que ambos productos de

degradación, si bien no presentan efecto antimicrobiano, si son capaces de generar resistencia en bacterias expuestas a estos compuestos, como también, a generar reacciones de hipersensibilidad en humanos (Freitas *et al.*, 2012), y al no ser determinados habitualmente, se desconoce el impacto que generan, lo que podría marcar un precedente también, para la determinación de la concentración original de otros antibióticos mediante el análisis de sus productos de degradación. Es debido a estos problemas asociados a la sensibilidad y especificidad de los métodos orientados al análisis de estas moléculas, que estudios relacionados, plantean la necesidad de hidrolizar estos analitos, utilizando piperidina, con la finalidad de romper el anillo betalactámico y formar productos estables para su posterior análisis (Beredsen *et al.*, 2013), sin embargo, la matriz utilizada en ese estudio corresponde a músculo de pollo, por lo tanto, la eficacia de ese tratamiento aún no está comprobado en deyecciones.

Si bien la liofilización resultó ser un proceso efectivo para el tratamiento las deyecciones de pollo Broiler como matriz, permitiendo mejorar su proceso de limpieza y mejorando la recuperación de penicilina G, esto no resultó ser suficiente para lograr determinar la presencia de amoxicilina y ampicilina, aun favoreciendo el control de factores críticos para la degradación de estos betalactámicos, como pueden ser la presencia de bacterias y el pH (Kakimoto y Funamizu, 2006).

Este método analítico al ser capaz de determinar la presencia de estos fármacos en deyecciones de pollos Broiler, permitiría evitar su uso como fertilizante en siembras y praderas, previniendo modificar la microbiota de los suelos, principalmente al complejo de bacterias fijadoras de nitrógeno, que suelen estar presentes con mayor frecuencia en las raíces de especies leguminosas (Kraemer *et al.*, 2019) además de disminuir el riesgo de selección de bacterias resistentes desde el ambiente debido a la presencia de residuos eliminados por las heces. Otro factor relevante que se podría evitar, también atribuido al impacto de los residuos de antimicrobianos en suelos es la disminución del crecimiento de especies vegetales (Jin *et al.*, 2009), lo que se traduciría en pérdidas económicas generadas por un menor rendimiento de estos alimentos destinados a consumo animal. Finalmente, se podría prevenir el consumo de especies vegetales o subproductos contaminados con residuos antimicrobianos por parte de animales productivos (Cornejo *et al.*, 2017), lo que evitaría una

posible recirculación de estos contaminantes y las pérdidas generadas por decomisos debido a la acumulación de antimicrobianos por consumo crónico a bajas dosis, además de controlar la selección de bacterias multiresistentes en el ecosistema. Para esto, serían necesarios estudios complementarios que pudieran relacionar la presencia de estos analitos en la matriz en concentraciones capaces de provocar estos efectos y, además, cuantificar las pérdidas económicas asociadas al productor.

CONCLUSIÓN

El método analítico implementado en este estudio permite la detección de aminoglucósidos y algunos betalactámicos en deyecciones de pollos Broiler mediante HPLC MS/MS, siendo altamente sensible, específico y lineal para los analitos espectinomicina, neomicina y penicilina G, permitiendo cuantificar estas moléculas en deyecciones de pollos Broiler.

Amoxicilina y ampicilina no pueden ser determinadas mediante el método analítico desarrollado en este estudio, debido a la poca estabilidad de los analitos en la matriz a causa de sus características físico químicas.

Los resultados presentes en este estudio, permitirían sentar precedentes para la implementación de límites máximos en deyecciones de pollos Broilers, pudiendo ser establecidos en base a la ponderación de distintos criterios, como la concentración y el impacto de estos residuos antimicrobianos sobre la industria agropecuaria y sus consecuencias en los animales, el ambiente, y la salud pública.

El método analítico desarrollado en este estudio, permitiría además contribuir a futuras investigaciones asociadas a la distribución y farmacocinética de antimicrobianos en las distintas matrices de origen animal, incluyendo las heces, lo que facilitaría relacionarlos a sus tiempos de depleción, permitiendo establecer una relación y un perfil de estas variables que ayudaría a establecer una relación entre las concentraciones presentes en las heces y las concentraciones plasmáticas del animal productivo, en pro de establecer controles preventivos en las distintas áreas relacionadas a la producción de alimentos desde animales tratados farmacológicamente.

BIBLIOGRAFÍA

- **ASENJO, G.A.** 2016. Identificación de los aspectos claves para la creación de un sistema de vigilancia integrada de la resistencia antimicrobiana. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U.Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 51 p.
- **BERENDSEN, B.J.; GERRITSEN, H.W.; WEGH, R.S.; LAMERIS, S.; VAN SEBILLE, R.; STOLKER, A.A.; NIELEN, W.F.** 2013. Comprehensive analysis of β -lactam antibiotics including penicillins, cephalosporins, and carbapenems in poultry muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 405(24):7859-74.
- **BERENDSEN, B.J.; WEGH, R.S.; MEMELINK, J.; ZUIDEMA, T. STOLKER, L.A.** 2015. The analysis of animal feces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta* 132: 258-268.
- **CHEN, L.; WANG, B.; DIAO, Z.; ZHAO, M.; XIE, K.; ZHANG, P.; WANG, X.; ZHANG, T.; WANG, J.** 2019. Development and Validation of an HPLC-ESI/MS/MS Method for the Determination of Amoxicillin, Its Major Metabolites, and Ampicillin Residues in Chicken Tissues. *Molecules.* 24(14):2652.
- **CORNEJO, J.; POKRANT, E.; KROGH, M.; BRICEÑO, C.; HIDALGO, H.; MADDALENO, A.; ARAYA, C.; SAN MARTIN, 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. *Journal of Food Protection* 80(4): 619-625.
- **DRURY, B.; SCOTT, J.; ROSI-MARSHALL, E.J.; KELLY, J.J.** 2013. Triclosan exposure increases triclosan resistance and influences taxonomic composition of benthic bacterial communities. *Environ. Sci. Technol.* 47:8923–8930.
- **EC. EUROPEAN COMMISSION.** 2002. Comisión 2002/657/EC of Journal Europ. Comm. 221: 8-36.
- **ESPINOSA, I.; BÁEZ, M.; HERNÁNDEZ, R.; LÓPEZ, Y.; LOBO, E.; CORONA-GONZÁLEZ, B.** 2019. Resistencia antimicrobiana en bacterias de origen animal: desafíos para su contención desde el laboratorio. *Rev. de Salud Animal,* 41(3): 7. [en línea] < 31

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2019000300008

> [consulta: 25-05-2021]

- **FREITAS, A., BARBOSA, J.; RAMOS, F.** 2012. Determination of Amoxicillin Stability in Chicken Meat by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. 5:471–479.
- **GATICA, M.A.; ROJAS, H.** 2018. Gestión sanitaria y resistencia a los antimicrobianos en animales de producción. **In:** Simposio Resistencia antimicrobiana. Lima, Perú. Enero - marzo, 2018. Rev. Perú med exp salud pública. pp. 118 - 125
- **GUTIERREZ, L.A.; MONTOYA, O.I.; VÉLEZ, J.M.** 2013. Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. Rev. P+L. 8: 135 – 146.
- **GUZMÁN, M.; SALINAS, J.; TOCHE, P.; AFANI, A.** 2004. Alergia a β -lactámicos. Rev.Chil. Infect. 21 (4): 285-298.
- **JIN, C.; CHEN, Q.; SUN, R.; ZHOU, Q.; LIU, J.** 2009. Eco-toxic effects of sulfadiazine sodium, sulfamonomethoxine sodium and enrofloxacin on wheat, chinese cabbage and tomato. Ecotoxicology.18:878–885.
- **JI-RAN, Y.; SOON-UK, Y.; CHANG-GYUN, K.** 2017. Quantification of residual antibiotics in cow manure being spread over agricultural land and assessment of their behavioral effects on antibiotic resistant bacteria. Chemosphere. 182: 771-780.
- **KAKIMOTO, T.; FUNAMIZU, N.** 2006. Factors affecting the degradation of amoxicillin in composting toilet. Chemosphere. 66(11): 2219-2224.
- **KRAEMER, S.; RAMACHANDRAN, A.; PERRON, G.** 2019. Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. Microorganism. 7 (6): 180.
- **KRAUSE, K.M.; SERIO, A.W.; KANE, T.R.; CONNOLLY, L.E.** 2016. Aminoglycosides: An Overview. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 6(6): 27029.
- **LARA, F.; OLMO-IRUELA, M.; CRUCES-BLANCO, C.; QUESADA-MOLINA, C.; GARCIA-CAMPANA A.** 2012. Advances in the determination of β -lactam antibiotics by liquid chromatography. Trends. In Anal. Chem. 38: 52-66.

- **LEES, P.; TOUNTAIN, P.L.** 2012. Pharmacokinetics, distribution, bioavailability, and relationship to antibiotic residues. **In:** Wang, J.; Macneil, J.D.; Kay, J.F. Chemical análisis of antibiotic residues in food. John Wiley & Sons. Estados Unidos. pp. 61 – 109.
- **LEVISON, M.; LEVISON, J.** 2009. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 23(4): 791-815
- **MASSÉ, D. I., SAADY, N. M., & GILBERT, Y.** 2014. Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals : an open access journal from MDPI*, 4(2): 146–163.
- **MELLA, S.; SEPULVEDA, M.; GONZALEZ, G.; BELLO, H.; DOMINGUEZ, M.; ZEMELMAN, R.; RAMIREZ, C.** 2004. Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Rev Chil Infect.* (4): 330-338.
- **MILLANAO, A.; BARRIENTOS, M.; GÓMEZ, C.; TOMOVA, A.; BUSCHMANN, A.; DÖLZ, H.; CABELLO, F.C.** 2011. Uso inadecuado y excesivo de antibióticos: Salud pública y salmonicultura en Chile. *Rev. Med Chile.* 139: 107-118.
- **NÄGELE, E.; MORITZ, R.** 2005. Structure elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicilin with ion trap MSn and accurate mass determination by ESI TOF. *J Am Soc Mass Spectrom.* 16: 1670 –1676.
- **PENG, P.; WANG, Y.; LIU, L.; ZOU, Y.; LIAO, X.; LIANG, J.; WU, Y.** 2016. The excretion and environmental effects of amoxicillin, ciprofloxacin, and doxycycline residues in layer chicken manure. *Poult. Sci. J.* 95: 1033–1041.
- **PÉREZ-BARRIOCANAL, F.; A, MORALES.; M. ARÉVALO.** 2000. Mecanismos implicados en la nefrotoxicidad producida por aminoglucósidos. 20(5): 408-414.
- **POLIANCIUC, S.; GURZAU, A.; KISS, B.; STEFAN, M.; LOGHIN, F.** 2020. Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Med. And Pharm. Rep.* 93(3): 231-240.
- **QUINTERO, N.;J, HERNÁNDEZ.; M, DE LEÓN OJEDA.; N. MELÉNDEZ.; QUINTERO, L.** 2018. Ototoxicidad y factores predisponentes. *Revista Cubana de*

<http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312018000100011&lng=es&tlng=es>. [consulta: 15-10-2020]

- **ROJAS, C.; MANRIQUEZ, M.** 2007. Cama de broiler y grano de cebada entero o molido en raciones de engorda invernal de novillos. *Agric. Téc* 67(1): 94-99.
- **SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; 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.
- **SETTIMO, L.; BELLMAN, K.; & KNEGTEL, R. M.** 2014. Comparison of the accuracy of experimental and predicted pKa values of basic and acidic compounds. *Pharmaceutical research*, 31(4), 1082–1095.
- **SINGER, A.; SHAW, H.; HART, A.** 2016. Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Front. In Microb.* 7(1): 1728
- **TAMHANKAR, A.J.; LUNDBORG, C.S.** 2019. Antimicrobials and Antimicrobial Resistance in the environment and Its Remediation: A Global One Health Perspective. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 16(23): 4614.
- **UJUETA, S.; ARAQUE, A.** 2016. Detection of antimicrobial residues in muscle, liver and kidney of pork for sale in Bogota. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 19 (2): 371 – 379
- **UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.** 2011a. Confirmation of Aminoglycosides by HPLC-MS/MS. [en línea]. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/bfbdfbd2-0859-4de9-9d1b-c339df2ada5f/CLG_AMG_1_03.pdf?MOD=AJPERES>[consulta: 15-10-2020]
- **UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.** 2011b. Screening and Confirmation of β -Lactam Antibiotics by HPLC-MS/MS [en línea]. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1c66a017-215e-4844-bfb1-29183b5af252/CLG_BLAC_03.pdf?MOD=AJPERES>[consulta: 15-10-2020]
- **VAN DUJIKEREN, E.; SCHWARZ C.; BOUCHARD, D.; CATRY, B.; POMBA, C.; BAPTISTE, K.; MORENO, M.; RANTALA, M.; RUŽAUSKAS, M.; SANDERS, P.; TEALE, C.; WESTER, A.; ZOLTAN, K.; JUKEZ, H.** 2019.

The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Journ. of Antim. Chem.*, 74(9): 2480-2496.

- **XIANGANG H.; ZHOU, Q.; & LUO, Y.** 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Env. Poll.*, 158(9), 2992–2998.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de acreditación ISO 17.025

acreditación



El Instituto Nacional de Normalización, INN, certifica que:

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE**

LABORATORIO DE FARMACOLOGIA VETERINARIA
ubicado en Santa Rosa N°11735, La Pintana, Santiago

ha sido acreditado en el Sistema Nacional de Acreditación del INN,
como

Laboratorio de Ensayo
según NCh-ISO 17025.012005

en el área Química para alimentos de animales, con el alcance
indicado en anexo.

Primera Acreditación: Desde el 29 de Abril de 2013

Vigencia de la Acreditación: hasta el 29 de Abril de 2021

Santiago de Chile, 15 de Septiembre de 2017


Eduardo Ceballos Osorio
Jefe de División Acreditación


Sergio Toro Galleguillos
Director Ejecutivo



ACREDITACION LE 1112

FA07-01-20 v01

LAS CONDICIONES BAJO LAS CUALES RIGE ESTA ACREDITACION ESTAN DETALLADAS EN EL ACTA DE COMPROMISO

Anexo 2. Norma de bioseguridad.



CERTIFICADO N° 153

Santiago, 15 noviembre 2019.-

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto del Concurso FONDEF-IDEA 2019 ID19I10033. **"Desarrollo y validación de una metodología rápida, económica y no invasiva para la detección de residuos de tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos y β -lactámicos en heces de animales de producción"** de la investigadora responsable Dra. Javiera Cornejo Kelly, Profesor Asistente, académica del Departamento de Medicina Preventiva Animal, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

La evaluación del citado proyecto permite acreditar que las normas de bioseguridad que se encuentran descritas en el mismo y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas Bioseguridad y Riesgos Asociados Fondecyt – CONICYT, versión 2018 y en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)", que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

Se otorga el presente certificado a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.


Dr. José Pizarro Lucero
Coordinador
Comité de Bioseguridad
FAVET – Universidad de Chile



Anexo 3. Norma de bioética.



Santiago, 18 de Noviembre de 2019

Certificado N°: 19331-VET-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo 22-2019, del Proyecto de Investigación titulado: ***“Desarrollo y validación de una metodología rápida, económica y no invasiva para la detección de residuos de tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos y β -lactámicos en heces de animales de producción”***, de la Investigadora responsable **Javiera Cornejo Kelly**, Profesor Asistente, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

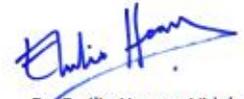
La Investigadora se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **60** pollos Broiler, genética Ross 308, provenientes de un criadero comercial (Agrícola Chorombo S.A., Región Metropolitana), desde Diciembre de 2019 a Octubre de 2021, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Concurso IDeA I+D 2019 Fondef – Conicyt Nro. ID19110033**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.


Ronald Vargas Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile




Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua>
email: coordinador.cicua@uchile.cl