



INFORME FINAL

Impactos asociados con el uso extra etiqueta del principio activo
oxitetraciclina, vía intraperitoneal en centros de cultivo de
salmónidos sobre el programa de control de fármacos vigente

FIPA N° 2014-91 / Enero 2017



INFORME FINAL

Impactos asociados con el uso extra etiqueta del principio activo
oxitetraciclina, vía intraperitoneal en centros de cultivo de
salmónidos sobre el programa de control de fármacos vigente

FIPA N° 2014-91 / Enero 2017

REQUIRENTE

FONDO DE INVESTIGACIÓN PESQUERA
Y ACUICULTURA, FIPA

Presidente Consejo de Investigación
Pesquera y Acuicultura
Raúl Súnico Galdames

EJECUTOR

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO, IFOP

Director Ejecutivo
Leonardo Núñez Montaner

Jefe División Investigación en Acuicultura
Leonardo Guzmán Méndez

JEFE PROYECTO
Sergio Contreras Lynch

AUTORES
Luis Norambuena Subiabre
Sergio Contreras Lynch



RESUMEN EJECUTIVO

El presente documento constituye el Informe Final del estudio “Impactos asociados con el uso extra etiqueta del principio activo oxitetraciclina, vía intraperitoneal en centros de cultivo de salmónidos sobre el programa de control de fármacos vigente”, ejecutado por el Instituto de Fomento Pesquero, a través de su Departamento de Salud Hidrobiológica, perteneciente a la División de Investigación en Acuicultura.

La presente investigación tuvo por objetivo evaluar los posibles impactos asociados con el uso extra etiqueta del principio activo oxitetraciclina, administrado por vía intraperitoneal, en centros de cultivo de salmónidos sobre el programa de control de fármacos vigente.

Durante el periodo de ejecución se realizaron los estudios de depleción en condiciones controladas de los productos Liquamicina LA[®], Magnadur LA[®] y Terrivet F-200[®] en Salmón Coho, Trucha arcoíris y Salmón del Atlántico, determinándose las curvas de depleción en músculo respectivas.

Por otro lado, se realizó el estudio en condiciones de campo del producto Magnadur[®] en la especie Trucha arcoíris, obteniéndose la respectiva curva de depleción de oxitetraciclina, del mismo modo que en los estudios en condiciones controladas.



Se realizó un taller de difusión de los resultados del estudio con presencia de representantes de Sernapesca y Subpesca, como de la industria salmonicultora, laboratorios farmacéuticos y laboratorios de servicio.

En el presente Informe se da cuenta de las actividades y resultados obtenidos a lo largo de la ejecución de todo el estudio.



EXECUTIVE SUMMARY

This document represents the Final Report of the research project “Impacts associated with the use of extra-label intraperitoneal oxytetracycline in salmonid farms and their effects in the current pharmacological control system”, executed by Instituto de Fomento Pesquero, Departamento de Salud Hidrobiológica, belongs to División de Investigación en Acuicultura.

The objective of the research was evaluating the possible impacts associated with the use of intraperitoneally administrated extra-label oxytetracycline in salmonid farms in the current pharmacological control system.

During the execution period, depletion studies under controlled conditions of the products Liquamicina LA, Magnadur LA and Terrivet F-200 in Coho salmon, Rainbow trout and Atlantic salmon were performed and the depletion curves of oxytetracycline in fish muscle were determined.

On the other hand, the study under field conditions of the product Magnadur in Rainbow trout was done, obtaining the respective depletion curve of oxytetracycline, in the same way as the studies under controlled conditions.

A workshop was held to show the results of the project, with a large public presence from the authority, such as Sernapesca and Subpesca, as well as professionals from the salmon industry, pharmaceutical companies and service laboratories staff.

This report describes the activities and results obtained throughout the execution of the entire study.



ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN EJECUTIVO	i
EXECUTIVE SUMMARY.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS	vii
1. OBJETIVO GENERAL	1
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	1
3. ANTECEDENTES	2
4. METODOLOGÍA	7
4.1. Revisi3n bibliográfica asociada a curvas de depleci3n de fármacos en peces	7
4.2. Revisi3n de fuentes de informaci3n oficial nacional e internacional ---	8
4.3. Identificaci3n del tipo de muestra requerido para la detecci3n de oxitetraciclina aplicado intraperitoneal bajo condiciones controladas y de campo.....	8
4.4. Identificaci3n de las presentaciones farmacéuticas de oxitetraciclina inyectable comercializadas en el pa3s y las dosis utilizadas	9
4.5. Desarrollo de estudios de depleci3n en músculo del principio activo oxitetraciclina aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salm3n Coho, Trucha Arco3ris y Salm3n del Atlántico	10
4.5.1. Desarrollo de estudio de depleci3n en músculo del producto comercial Liquamicina LA aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en salm3n Coho.....	11
4.5.2. Desarrollo de estudio de depleci3n en músculo de los productos comerciales Magnadur y Terrivet F-200 aplicados vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salm3n Coho.....	17
4.5.3. Desarrollo de estudio de depleci3n en músculo del producto comercial Magnadur aplicados vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Trucha Arco3ris.	20



4.5.4.	Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Liquamicina y Terrivet F-200 aplicados vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Trucha Arcoíris. -----	23
4.5.5.	Desarrollo de estudio de depleción en músculo de los productos comerciales Liquamicina, Magnadur y Terrivet F-200 aplicados vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmón del Atlántico	25
4.6.	Desarrollo de estudios de depleción del principio activo oxitetraciclina (Magnadur) aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones de campo.	28
4.7.	Comparación de las curvas de depleción obtenidas bajo condiciones controladas y las obtenidas bajo condiciones de campo-----	31
4.8.	Identificación y evaluación de los impactos del uso extraetiqueta de oxitetraciclina aplicada intraperitonealmente sobre el actual programa de control de fármacos vigente.-----	31
4.9.	Propuesta de ajustes para que el uso extra etiqueta de oxitetraciclina intraperitoneal, no se traduzca en un rechazo del producto final debido a presencia de residuos de antimicrobianos -----	33
5.	RESULTADOS -----	35
5.1.	Revisión bibliográfica asociada a curvas de depleción de fármacos en Peces -----	35
5.2.	Revisión de fuentes de información oficial nacional e internacional ---	37
5.3.	Identificación del tipo de muestra requerido para la detección de oxitetraciclina intraperitoneal bajo condiciones controladas y de campo	40
5.4.	Identificación de las presentaciones farmacéuticas de oxitetraciclina inyectable comercializadas en el país y las dosis utilizadas -----	41
5.5.	Desarrollo de estudios de depleción del principio activo oxitetraciclina aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmón coho, trucha arcoíris y salmón del Atlántico -----	43
5.5.1	Desarrollo de estudio de depleción del producto comercial Liquamicina LA aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmón Coho -----	44
5.5.2.	Desarrollo de estudio de depleción del producto comercial Magnadur aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmón Coho -----	51
5.5.3	Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Terrivet F-200 aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmón Coho -----	56



5.5.4	Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Liquamicina aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Trucha arcoíris -----	61
5.5.5	Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Magnadur aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Trucha arcoíris -----	66
5.5.6	Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Terrivet F-200 aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Trucha arcoíris -----	70
5.5.7	Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Liquamicina aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmo salar -----	75
5.5.8	Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Magnadur aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmo salar -----	79
5.5.9	Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Terrivet F-200 aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmo salar -----	84
5.6.	Desarrollo de estudios de depleción en músculo del principio activo oxitetraciclina aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones de campo -----	88
5.7	Comparación de las curvas de depleción obtenidas bajo condiciones controladas y las obtenidas bajo condiciones de campo -----	93
5.8	Identificación y evaluación de los impactos del uso extraetiqueta de oxitetraciclina aplicada intraperitonealmente sobre el actual programa de control de fármacos vigente -----	102
5.9	Propuesta de ajustes para que el uso extra etiqueta de oxitetraciclina intraperitoneal, no se traduzca en un rechazo del producto final debido a presencia de residuos de antimicrobianos -----	105
5.10	Actividades generales -----	108
5.10.1	Reunión de Coordinación -----	108
5.10.2	Taller de Difusión de resultados -----	109
5.10.3	Publicación de resultados -----	109
6.	DISCUSIÓN Y ANÁLISIS -----	110
7.	CONCLUSIONES -----	121
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	126



ÍNDICE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS

FIGURAS

- Figura 1** Anestesia de peces con benzocaína.
- Figura 2** Inyección de Liquamicina.
- Figura 3** Regresión lineal de concentración de OTC en corte normal vs el que Incluye el punto de inyección.
- Figura 4** Curva de depleción de OTC-Liquamicina en Coho.
- Figura 5** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Liquamicina en Coho, con LMR de 100 ppb.
- Figura 6** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Liquamicina en Coho, con LMR de 10 ppb.
- Figura 7** Gráfico de residuales de curva de depleción Liquamicina-Coho.
- Figura 8** Gráfico de la frecuencia acumulada de errores Liquamicina-Coho.
- Figura 9** Curva de depleción de OTC-Magnadur en Coho.
- Figura 10** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Magnadur en Coho, con LMR de 100 ppb.
- Figura 11** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Magnadur en Coho, con LMR de 10 ppb.
- Figura 12** Gráfico de residuales de curva de depleción Magnadur-Coho.
- Figura 13** Gráfico de la frecuencia acumulada de errores Magnadur-Coho.
- Figura 14** Curva de depleción de OTC-Terrivet en Coho.
- Figura 15** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Terrivet en Coho, con LMR de 100 ppb.



- Figura 16** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Terrivet en Coho, con LMR de 10 ppb.
- Figura 17** Gráfico de residuales de curva de depleción Terrivet-Coho.
- Figura 18** Gráfico de la frecuencia acumulada de errores Terrivet-Coho.
- Figura 19** Curva de depleción de OTC-Liquamicina en Trucha.
- Figura 20** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Liquamicina en Trucha, con LMR de 100 ppb.
- Figura 21** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Liquamicina en Trucha, con LMR de 10 ppb.
- Figura 22** Gráfico de residuales de curva de depleción Liquamicina-Trucha.
- Figura 23** Gráfico de la frecuencia acumulada de errores Liquamicina-Trucha.
- Figura 24** Curva de depleción de OTC-Magnadur en Trucha.
- Figura 25** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Magnadur en Trucha, con LMR de 100 ppb.
- Figura 26** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Magnadur en Trucha, con LMR de 10 ppb.
- Figura 27** Gráfico de residuales de curva de depleción Magnadur-Trucha.
- Figura 28** Gráfico de la frecuencia acumulada de errores Magnadur-Trucha.
- Figura 29** Curva de depleción de OTC-Terrivet en Trucha.
- Figura 30** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Terrivet en Trucha, con LMR de 100 ppb.
- Figura 31** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Terrivet en Trucha, con LMR de 10 ppb.
- Figura 32** Gráfico de residuales de curva de depleción Terrivet-Trucha.
- Figura 33** Gráfico de la frecuencia acumulada de errores Terrivet-Trucha.
- Figura 34** Curva de depleción de OTC-Liquamicina en Salar.



- Figura 35** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Liquamicina en Salar, con LMR de 100 ppb.
- Figura 36** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Liquamicina en Salar, con LMR de 10 ppb.
- Figura 37** Gráfico de residuales de curva de depleción Liquamicina-Salar.
- Figura 38** Gráfico de la frecuencia acumulada de errores Liquamicina-Salar.
- Figura 39** Curva de depleción de OTC-Magnadur en Salar.
- Figura 40** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Magnadur en Salar, con LMR de 100 ppb.
- Figura 41** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Magnadur en Salar, con LMR de 10 ppb.
- Figura 42** Gráfico de residuales de curva de depleción Magnadur-Salar.
- Figura 43** Gráfico de la frecuencia acumulada de errores Magnadur-Salar.
- Figura 44** Curva de depleción de OTC-Terrivet en Salar.
- Figura 45** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Terrivet en Salar, con LMR de 100 ppb.
- Figura 46** Gráfico de periodo de resguardo OTC-Terrivet en Salar, con LMR de 10 ppb.
- Figura 47** Gráfico de residuales de curva de depleción Terrivet-Salar.
- Figura 48** Gráfico de la frecuencia acumulada de errores Terrivet-Salar.
- Figura 49** Curva de depleción de OTC-Magnadur en Trucha, condiciones de campo.
- Figura 50** Gráfico de periodo de resguardo OTC- Magnadur en Trucha, condiciones de campo, con LMR de 100 ppb.
- Figura 51** Gráfico de periodo de resguardo OTC- Magnadur en Trucha, condiciones de campo, con LMR de 10 ppb.



- Figura 52** Gráfico de residuales de curva de depleci3n Magnadur-Trucha, condiciones de campo.
- Figura 53** Gráfico de la frecuencia acumulada de errores Magnadur-Trucha, condiciones de campo.
- Figura 54** Regresi3n lineal de Magnadur, Terrivet y Liquamicina, Salar- condiciones controladas.
- Figura 55** Regresi3n lineal de Magnadur, Terrivet y Liquamicina, Trucha- condiciones controladas.
- Figura 56** Regresi3n lineal de Magnadur, Terrivet y Liquamicina, Coho- condiciones controladas.
- Figura 57** Regresi3n lineal de Magnadur en Trucha, condiciones controladas y decampo.
- Figura 58.** Diagrama de Flujo para el muestreo pre cosecha del Programa de Control de F3rmacos de Sernapesca.



TABLAS

- Tabla 1** Parámetros de la estimación de la regresión lineal de la comparación de muestras.
- Tabla 2** Resultados de curvas de depleción, T1/2 y periodo de resguardo a 10 y 100 ppb.
- Tabla 3** Diferencia de concentraciones obtenidas en el grupo de menor peso, con respecto al grupo de mayor peso en Salm3n Coho en condiciones controladas.
- Tabla 4** Diferencia de concentraciones obtenidas en el grupo de menor peso, con respecto al grupo de mayor peso en Trucha Arco3ris en condiciones controladas.
- Tabla 5** Diferencia de concentraciones obtenidas en el grupo de menor peso, con respecto al grupo de mayor peso en Salm3n del Atlántico en condiciones controladas.
- Tabla 6** Diferencia de concentraciones obtenidas en el grupo de menor peso, con respecto al grupo de mayor peso en Trucha Arco3ris en condiciones de campo.



ANEXOS

- Anexo 1.** Listado de solicitudes efectuadas al servicio para autorización de uso extra-etiqueta de OTC en salmonicultura por las empresas salmoneras los últimos 5 años.
- Anexo 2.** Respuestas a Observaciones a los Protocolos Estudios IFOP.
- Anexo 3.** Protocolo para la obtención de curvas de depleción de Oxitetraciclina (OTC) administrada vía intraperitoneal en Trucha Arcoíris (*O. mykiss*), Salmón Coho (*O. kisutch*) y Salmón del Atlántico (*S. salar*) en condiciones controladas, versión 2.
- Anexo 4.** Protocolo para la obtención de curvas de depleción de Oxitetraciclina (OTC) administrada vía intraperitoneal en Trucha Arcoíris (*O. mykiss*), Salmón Coho (*O. kisutch*) y Salmón del Atlántico (*S. salar*) en condiciones de campo, versión 2.
- Anexo 5.** Citas de revisión bibliográfica asociada a curvas de depleción de fármacos de peces
- Anexo 6.** Productos comerciales de OTC inyectable más utilizados por la industria salmonicultora.
- Anexo 7.** Resultados y Cromatogramas de OTC en piel-músculo en muestras normal y que incluye el punto de inyección en los 4 primeros tiempos de muestreo en salmón Coho.
- Anexo 8.** Resultados y Cromatogramas de OTC en piel-músculo para el cálculo de las curvas de depleción.
- Anexo 9.** Acta de reunión de coordinación.
- Anexo 10.** Personal participante por actividad.
- Anexo 11.** Memoria de cálculo costeo propuesta.
- Anexo 12.** Base de Datos FIP 2014-91.
- Anexo 13.** Lista de participantes de taller de difusión.
- Anexo 14.** Presentación de resultados en taller de difusión.
- Anexo 15.** Resumen de manuscrito científico.



1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los posibles impactos asociados con el uso extra etiqueta del principio activo oxitetraciclina, administrado por v3a intraperitoneal, en centros de cultivo de salm3nidos sobre el programa de control de f3rmacos vigente.

2. OBJETIVOS ESPEC3FICOS

1. Determinar las curvas de depleci3n del principio activo oxitetraciclina v3a intraperitoneal, bajo condiciones de campo.
2. Analizar las curvas de depleci3n obtenidas y evaluar los impactos que 3stas podr3an tener sobre el actual programa de control de f3rmacos vigente.



3. ANTECEDENTES

La acuicultura en Chile es una actividad relativamente nueva y en expansión, generando importantes ingresos económicos al país. Esto ha traído consigo un aumento en la aparición de enfermedades de etiología bacteriana, para lo cual se ha intensificado el uso de agentes antimicrobianos como medida de tratamiento. Sin embargo, su uso trae consecuencias en la salud veterinaria y humana, como por ejemplo, persistencia de residuos en producto final y el entorno, así como la persistencia del fenómeno de resistencia bacteriana.

Se estima que la industria salmonera chilena utiliza aproximadamente varias veces más antibióticos que la industria noruega para producir una tonelada de salmón (Grave *et al.*, 1999), generando así un alto costo operacional y ambiental por el uso de alimento medicado y el efecto de presión de selección en la resistencia bacteriana de patógenos de salmones y humanos (Alderman and Hastings, 1998; Furushita *et al.*, 2003). Oxitetraciclina (OTC) es uno de los agentes antibacterianos más utilizado en la acuicultura a nivel mundial (Alday-Sanz *et al.*, 2012).

Aunque la administración de agentes antibacterianos es un medio efectivo para el control de las infecciones bacterianas en peces en cultivo (Gratzek, 1983), existe una creciente preocupación acerca de sus consecuencias sobre la salud pública (Anonymous, 1998; Bernoth, 1991), sobre el medio ambiente (Hansen *et al.*, 1992) y sobre los animales tratados (Van der Heijden *et al.*, 1992).

En varios países la legislación sobre la disponibilidad y uso de drogas en acuicultura es inadecuada, debido a que ha sido originalmente formulada con una



orientación hacia los problemas de medicina veterinaria convencional (Alderman and Hastings, 1998; Schlotfeldt, 1992).

Además, se debe considerar que diversos factores ambientales, como temperatura, pH, concentración de iones y salinidad, tienen influencia sobre la farmacocinética de la mayoría de las drogas utilizadas en peces (Barnes *et al.*, 1995; Björklund *et al.*, 1992; Haug and Hals, 2000; Lunestad and Goksøyr, 1990; Martinsen and Horsberg, 1995; Martinsen *et al.*, 1991; Pursell *et al.*, 1995; van der Heijden *et al.*, 1994; Vaughan *et al.*, 1996).

La forma más habitual de administración de antibióticos en peces corresponde a su incorporación en el alimento. Cuando los productos farmacéuticos son administrados vía oral, éstos entran al medio ambiente como alimento no ingerido, o como eliminación vía urinaria o fecal (Dempster *et al.*, 2009; Samuelsen *et al.*, 2015). La Oxitetraciclina es absorbida por los peces en un 60-80% cuando el estómago está vacío, sin embargo por la presencia de cationes divalentes y trivalentes en el agua se disminuye su actividad antimicrobiana (Miller, 2007). La disminución de la actividad no es solucionada del todo con la encapsulación del alimento, ya que para ser absorbida, la OTC debe ser previamente solubilizada en el estómago del pez, por lo que se mezclaría con los fluidos de éste (Miller, 2007). Como resultado de un proyecto realizado por el IFOP (IFOP, 2014a) se determinó que el principio activo estaría biodisponible para el pez entre un 50% a un 70%. Coyne *et al.* (2004a; 2004b; 2006) demostraron que en tratamientos metafilácticos comerciales con alimentos medicados, en los peces moribundos altamente infectados, la concentración sérica de antibiótico es despreciable comparado con la subpoblación sana, lo que puede deberse a que los peces enfermos prácticamente no se alimentan (Rigos and Smith, 2013).



Por otro lado, estudios han demostrado que antibacterianos como oxitetraciclina, flumequina y ácido oxolínico persisten por meses en el sedimento de los sistemas de cultivo después de su administración oral (Björklund *et al.*, 1990; Hansen *et al.*, 1992; Hektoen *et al.*, 1995; Jacobsen and Berglind, 1988; Nygaard *et al.*, 1992; Samuelsen, 1992; Samuelsen *et al.*, 1994; Smith, 1996). De igual modo, algunos investigadores (Jacobsen and Berglind, 1988; Samuelsen, 1989), han informado una vida media de 10 semanas y 32-64 días, respectivamente, para la oxitetraciclina en sedimentos de centros de cultivo.

Estos antecedentes, y la baja eficacia observada en terreno de los antimicrobianos entregados vía oral frente a brotes declarados en centros de cultivo, han llevado a los productores a buscar alternativas terapéuticas, como el uso extra-etiqueta de antimicrobianos inyectables destinados a otras producciones animales, situación que está contemplada como factible dentro de la normativa.

El uso de antimicrobianos inyectables posee algunas ventajas sobre el uso de alimentos medicados como mecanismo de tratamiento, como por ejemplo, el asegurarse una dosificación individual homogénea del grupo tratado, no dejar residuos de principio activo no consumido (alimento) que pueda permanecer en el entorno de las balsas jaula, y el asegurarse que tanto individuos enfermos como expuestos se traten de igual forma, lográndose un buen efecto en peces con infecciones tempranas. Por otro lado, y desde el punto de vista de costos, representa un mayor impacto que la medicación por alimento, principalmente asociado al manejo que requiere este procedimiento (com. personal).

En Chile, el registro y autorización de uso en acuicultura de productos farmacéuticos es responsabilidad del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), a través del D.S. (MINAGRI) N° 25 de 2005 (2012), no obstante, la aplicación



terapéutica en terreno es materia de monitoreo y registro del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.

El registro de SAG posee en la actualidad, un fármaco inyectable registrado (autorizado el 23 de Octubre del 2014, N° 2252-B) cuya especie objetivo son salmónidos de cultivo, no obstante, el uso extra-etiqueta sigue siendo una alternativa viable y atractiva para los productores, en el tratamiento de enfermedades provocadas por agentes bacterianos. Esta situación conlleva algunos aspectos que deben tenerse en cuenta, considerando que para este tipo de fármacos las dosis y periodos de resguardo están calculadas en las especies objetivo originales del registro, desconociéndose su comportamiento en condiciones de campo, y generando alguna incertidumbre respecto del momento de cosecha, para cumplir con las normativas internacionales, respecto de residuos farmacológicos en el producto final.

Un componente esencial en el control de producto final libre o con niveles aceptables de residuos de fármacos es obtener los periodos de resguardo de cada fármaco (Reeves, 2011). El periodo de resguardo es el tiempo de espera entre el término de la medicación y el sacrificio de los animales para consumo humano (Baggot, 2001). Este periodo permite que los fármacos se metabolicen y se eliminen desde el pez hasta alcanzar niveles que son permitidos o exigidos para resguardar la salud humana que los consume (Riviere and Mason, 2011).

Para el cálculo de este periodo de resguardo es necesario conocer el decaimiento de los fármacos dentro del animal. Esto se obtiene realizando estudios de depleción donde se medican a los animales de acuerdo a las dosis recomendadas por cada fabricante y se obtiene muestras de matrices biológicas desde la suspensión de la medicación (Riviere and Mason, 2011). Así, las curvas de depleción son estudios de



farmacocinética, toda vez que se evidencia el cambio de concentraciones a través del tiempo. La depleción generalmente es de tipo lineal en todos los compartimentos farmacocinéticos y dependiente de procesos de metabolización y excreción renal, fecal, branquial o por mucus de piel (Riviere, 2011).

Debido a que los estudios de depleción se realizan bajo condiciones controladas, es necesario contrastarlos con estudios de campo, con el fin de detectar si existen diferencias entre estos tiempos de resguardo (Reeves, 2011). Esto es crítico en peces de producción, más que en mamíferos o aves terrestres, toda vez que las condiciones ambientales juegan un rol importante en procesos de eliminación y depleción (Toutain *et al.*, 2011).

Dada la importancia de la industria salmonicultora para la economía nacional, y la implicancia que una detección de residuos de fármacos puede tener en la comercialización de estos productos, es prioritario que la Autoridad pertinente cuente con la información y conocimientos en este nuevo escenario terapéutico, y que permitan la generación de planes de monitoreo y control asociados a esta problemática.

Finalmente, y considerando el objetivo del presente estudio, el Instituto de Fomento Pesquero y su División de Acuicultura, surgió como la entidad de elección para ejecutar la presente investigación, en consideración de la experiencia que posee en este ámbito, y por otro lado, de la estructura multidisciplinaria de su equipo de profesionales, lo que sin duda le permitió abordar de la mejor forma el estudio con una mirada integral, a partir de trabajos efectuados previamente.



4. METODOLOGÍA

La metodología utilizada en la presente iniciativa se detalla de acuerdo a los objetivos específicos establecidos:

Objetivo específico 1: *Determinar las curvas de depleción del principio activo oxitetraciclina vía intraperitoneal, bajo condiciones de campo.*

4.1. Revisión bibliográfica asociada a curvas de depleción de fármacos en peces.

Se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando motores en línea tales como EBSCO, SciVerse-ScienceDirect, PubMed de la National Library of Medicine National Institute of Health de Estados Unidos de Norteamérica (EEUU), Phish-Pharm de la Food and Drug Administration (FDA), entre otros. La búsqueda se enfocó en la obtención de artículos de investigación regulares y revisiones amplias en revistas con comité editor y libros científicos asociados a la obtención de curvas de depleción de oxitetraciclina luego de su aplicación en salmónidos, con especial énfasis con administración por vía inyectable.

Como información complementaria, se consideraron los antecedentes obtenidos en el marco de un proyecto ejecutado por el proponente, donde se efectuaron estudios de depleción para los fármacos oxitetraciclina y florfenicol, para sus presentaciones farmacéuticas más comercializadas en la industria salmoniculora y entregados a través del alimento (IFOP, 2014b).



La información recopilada fue revisada y analizada con el fin de obtener los protocolos y requisitos experimentales a utilizar.

4.2. Revisión de fuentes de información oficial nacional e internacional.

Se realizó una extensiva búsqueda de información bibliográfica pública y de libre acceso en sitios oficiales de organizaciones normativas nacionales e internacionales que se relacionan o han relacionado con el uso de fármacos y estudios de depleción en peces de producción. Para el caso de organizaciones e instituciones nacionales se revisaron las normativas del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA), la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (SUBPESCA). Las instituciones internacionales revisadas fueron la European Medicine Agency (EMA) y la International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH).

Al igual que en punto anterior, se revisaron y analizaron los requerimientos que las diferentes instituciones señalan como recomendables para la realización de estudios y obtención de curvas de depleción en especies animales productoras de alimento y en específico en especies de peces de producción.

4.3. Identificación del tipo de muestra requerido para la detección de oxitetraciclina intraperitoneal bajo condiciones controladas y de campo.

Para la identificación del tipo de muestra requerida para la detección de cada producto farmacológico, se siguieron las recomendaciones entregadas por VICH



(2015) y EMEA (1997). Estas dicen relación con que las muestras deben representar el producto que será consumido por la población humana.

Si bien, y en estricto rigor, la obtención de curvas de depleción se pueden obtener con cualquier matriz biológica, se efectuó un análisis de respecto de que tejidos son los importantes a considerar para los estudios a ejecutar.

4.4. Identificación de las presentaciones farmacéuticas de oxitetraciclina inyectable comercializadas en el país y las dosis utilizadas.

Para la identificación de los productos comerciales y dosis de oxitetraciclina inyectable más utilizados como extra-etiqueta por la industria salmonicultora, se recopiló la información desde el listado de productos comerciales de oxitetraciclina vía inyectable autorizados para uso en diversas especies de producción animal por el SAG.

Por otro lado, el 30 de julio del 2015 se solicitó oficialmente al Sernapesca el listado de solicitudes efectuadas al servicio para autorización de uso extra-etiqueta de OTC en salmonicultura por las empresas salmoneras los últimos 5 años (Anexo 1). Adicionalmente, y en la misma ocasión, se solicitó información respecto de la cantidad utilizada del producto OTC inyectable, registrado para uso en salmónes (registro SAG N° 2252-B).



4.5. Desarrollo de estudios de depleción en músculo del principio activo oxitetraciclina aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmón Coho, Trucha Arcoíris y Salmón del Atlántico.

Con la información obtenida en los puntos anteriores se confeccionaron los protocolos para la obtención de curvas de depleción de OTC administrada vía intraperitoneal en trucha arcoíris, salmón coho y salmón del Atlántico en condiciones controladas y de campo, los que se enviaron a la Subpesca y al Sernapesca. Luego de recibidas las observaciones a los protocolos, éstos se confeccionaron nuevamente en su versión 2, los que se pueden observar en los Anexos 3 y 4.

La ejecución de los protocolos óptimos de los estudios de depleción del principio activo oxitetraciclina aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en salmón coho, trucha arcoíris y salmón del Atlántico se realizaron en el Centro de Maricultura Hueihue de IFOP. La metodología de trabajo dentro de las dependencias siguió los lineamientos de normativas de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) y Buenas Prácticas Clínicas (GCP) de organismos internacionales. Esto permite tener un sistema de seguimiento, trazabilidad y control de los estudios de depleción ejecutados.



4.5.1. Desarrollo de estudio de depleci3n en m3sculo del producto comercial Liquamicina LA aplicado v3a intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salm3n Coho.

Animales.

Se utilizaron 3 estanques de 2 m³ con 47 ejemplares de Salm3n Coho cada uno, de peso de 1.040 +/- 400 g. Los peces no hab3an sido previamente tratados con OTC. Las condiciones en que se mantuvieron los peces se detallan en el protocolo espec3fico (Anexo 3)

Tratamiento.

Inicialmente se realiz3 un muestreo de 3 peces de cada estanque, los que fueron utilizados como muestras blanco (Tiempo 0). Con fecha 16 de octubre de 2015, los 44 peces restantes fueron extra3dos desde el estanque original y puestos en un estanque con una soluci3n anest3sica (Fig 1), tal como se detalla en el protocolo espec3fico (Anexo 3). Una vez que los peces alcanzaron el plano anest3sico III (Ross *et al.*, 2008), se tomaron individualmente, con la cara ventral hacia arriba para posteriormente ser inyectados intraperitonealmente con 0.2 ml de Liquamicina LA 20 %, utilizando una jeringa de tuberculina de 1 ml. La aguja se insert3 lentamente en un 3ngulo de aproximadamente 45° en la l3nea media ventral entre las aletas pectorales y las p3lvicas (Fig 2). Luego los peces fueron transferidos al estanque original. De acuerdo al peso promedio de los peces inyectados, la dosis de OTC administrada corresponde aproximadamente a 39 mg de OTC/Kg de P.V.



Fig. 1. Procedimiento de manejo anestésico de peces con Benzocaína.



Fig. 2. Aplicación de inyección del producto bajo estudio Liquamicina.



Metodología de Muestreo.

Se realizaron los 8 muestreos programados, de 5 peces por estanque y por tiempo de muestreo, a los 12 (pez N° 4 al 8), 20 (pez N° 9 al 13), 33 (pez N° 14 al 18), 40 (pez N° 19 al 23), 47 (pez N° 24 al 28), 54 (pez N° 29 al 33), 59 (pez N° 34 al 38) y 74 (pez N° 39 al 43) días post tratamiento con el objetivo de realizar la respectiva curva de depleción.

Los peces fueron sacrificados por golpe mortal en la cabeza. El tipo de muestra obtenido se realizó de acuerdo a la Norma Técnica del Sernapesca LAB/NT1(2015a):

- Antes de trozar el pescado, este fue eviscerado completamente.
- Se realizó un corte transversal al eje al pescado, por detrás de la aleta dorsal y delante de la aleta anal.
- Se obtuvo los filetes sin tejido cartilaginoso y óseo, siendo un lado la muestra y el otro la contra muestra. Este tipo de corte se denominó "Normal".

Adicionalmente se tomó una segunda muestra que incluye el sitio de inyección:

- El trozo incluye desde el corte transversal realizado detrás de la aleta dorsal hasta un corte transversal detrás de la aleta pectoral, siendo un lado la muestra y el otro la contra muestra. Este tipo de corte se denominó "Punto de Inyección".

Las muestras y contramuestras obtenidas fueron introducidas en bolsas plásticas, las que fueron selladas, identificadas y mantenidas en cooler con gel-pack hasta su arribo al Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, donde fueron congeladas a -20°C en freezer hasta su posterior análisis. Las muestras fueron rotuladas con la sigla



Mx y las contramuestras con la sigla CMx, Posteriormente se agrega la letra N (corte normal) o P (corte que incluye el punto de inyección). Luego se agrega una letra A, B o C, dependiendo si corresponde al estanque Liquamicina 1, 2 o 3. Finalmente se rotula con el número del pez.

Pese a que la Norma Técnica del Sernapesca LAB/NT1 (2015a) señala que la muestra debe ser de al menos 400 gramos, en este caso se privilegió el sector de la muestra, por sobre su tamaño, con fines comparativos.

Detección y cuantificación de Oxitetraciclina en músculo de salmónidos

El principio analítico aplicado en el presente estudio consiste en la extracción del producto farmacéutico en muestras de músculo porcionado de salmónidos, homogeneizados por agitación en vórtex y sonicación, junto a los solventes adecuados, hasta la obtención de un extracto que es identificado y cuantificado utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) acoplado a un detector UV visible con arreglo de diodos.

El procedimiento es una adaptación de una metodología validada y publicada para la detección y cuantificación de oxitetraciclina (OTC) en sedimento (Norambuena *et al.*, 2013). En breve, una vez homogeneizada la muestra de piel-músculo de salmón, se pesaron 5 +/- 0,3 g de ésta en un tubo de centrífuga cónico de polipropileno con tapa rosca de 50 ml. Se agregaron 20 ml de solución ácido oxálico en metanol (0,01M) y se agita en vórtex por 30 minutos. Se llevaron los tubos a un baño de ultrasonido por 10 minutos. Se centrifugaron las muestras a 4000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se traspasa a un balón de rotavapor de 100 ml. Se repitió el procedimiento anterior por una vez, pero sin sonicar la muestra. Luego se juntaron ambos sobrenadantes en el mismo balón. Los balones



se evaporaron a sequedad en rotavapor a 50°C +/- 3°C. La muestra se resuspendió en 2 ml de Hexano y se agregan 2 ml de Agua/Metanol (90/10 v/v), se agitó y se traspasó a un nuevo tubo de centrifuga y se centrifuga a 4000 rpm por 5 minutos. Se filtró la fase acuosa en filtros de jeringa de 0,22 µm de poro, 13 mm de diámetro de PVDF en viales de HPLC de 1,8 ml.

Se determinó la presencia y cuantificación de OTC en los viales utilizando un HPLC acoplado a un detector UV con arreglo de diodos, de las siguientes características:

- HPLC: - Bomba cuaternaria Shimadzu, modelo LC-10AT
- Autosampler Shimadzu, modelo SIL-10 AF
- Horno de columna Shimadzu CTO-10 AS
- Detector arreglo de diodos Shimadzu SPD-M20A
- Columna HPLC SunShell Phenyl, 2.6 µm, 100 x 4.6 mm
- Fase móvil: - 72 % Agua HPLC, 0.1 % TFA
- 5 % Metanol HPLC, 0.1 % TFA
- 23% Acetonitrilo HPLC 0.1% TFA
- Flujo: - 0.8 ml/min
- Long onda: - 355 nm
- Vol iny: - 50 ul
- T° horno: 40°C

La concentración de las muestras fue calculada con una curva de calibración de muestras fortificadas de 25 a 750 ng/g. El límite de detección de la técnica fue de 25 ng/g, el límite de cuantificación fue de 50 ng/g.



Para cada día de realización de los ensayos, se analizó una muestra blanco, para demostrar la ausencia de contaminantes y dos muestras fortificadas a 100 ppb, para demostrar que no hubo errores en el proceso analítico.

Comparación de resultados de las muestras Normales y las del Punto de Inyección:

Con el objetivo de verificar eventuales diferencias en los tiempos de depleción del analito de interés, entre ambos tipos de muestra de músculo, se procedió a comparar los resultados obtenidos mediante un análisis de regresión. Este análisis se efectuó representando en el eje de las abscisas los resultados obtenidos a partir de la muestra normal y en el eje de las ordenadas los valores de los resultados a partir de la muestra que incluye el punto de inyección, obteniendo la ecuación de la recta de regresión de tipo lineal:

$$Y = a + bx$$

Donde:

a= ordenada en el origen

b= pendiente de la curva

Si los resultados son iguales, se debería obtener una recta de regresión que pase por el origen, formando un ángulo de 45°, es decir si los dos resultados son equivalentes los puntos experimentales caen en una recta de pendiente igual a uno y ordenada en el origen igual a 0.

La recta de regresión y sus parámetros se calcularon utilizando el programa Statistica.



Obtención de curva de depleción.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analizó la concentración de oxitetraciclina (OTC) de las muestras obtenidas, para posteriormente obtener la curva de depleción de OTC en músculo, tal como se detalla en el respectivo protocolo (Anexo 3). Solamente se realizó la curva de depleción en la muestra normalmente utilizada en los ensayos de pre cosecha, ya que, como se observa en la sección de resultados, en los primeros cuatro tiempos de muestreo, no se obtuvo una diferencia significativa en la concentración de OTC entre esta muestra y la que incluye el punto de inyección. Con la curva de depleción se calculó el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de OTC en piel y músculo en Salmón Coho, producto de la administración intraperitoneal de Liquamicina L.A.

Para el cálculo del período de resguardo, se utilizó el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” establecido por European Medicine Agency (EMA) para este efecto, el cual está disponible en su página web (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000384.jsp). Para el cálculo del periodo de resguardo se consideraron como Límite Máximo Residual (LMR) de OTC 10 y 100 ppb.

4.5.2. Desarrollo de estudio de depleción en músculo de los productos comerciales Magnadur y Terrivet F-200 aplicados vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmón Coho.

Animales

Para el estudio con el producto comercial Magnadur se utilizaron 3 estanques de 2 m³, con 22 ejemplares de Salmón Coho cada uno, con un peso de 1.700 +/- 300 g.



Los peces no habían sido previamente tratados con OTC. Las condiciones en que se mantuvieron los peces se detallan en el protocolo específico (Anexo 3).

Para el estudio con Terrivet F-200 se utilizaron 3 estanques de 2 m³, con 22 ejemplares de Salmón Coho cada uno, con peso de 1.100 +/- 240 g. Los peces no habían sido previamente tratados con OTC. Las condiciones en que se mantuvieron los peces se detallan en el protocolo específico (Anexo 3).

Tratamiento.

Una semana antes del tratamiento los peces fueron pesados y dispuestos en los estanques, dejándose aclimatar por dos semanas. No se realizó muestreo previo al tratamiento (Tiempo 0), ya que el origen de los peces fue el mismo que los utilizados para los estudios previos con Liquamicina. Con fecha 14 de diciembre de 2015, los peces fueron extraídos desde los estanques originales y puestos en un estanque con una solución anestésica, tal como se detalla en el protocolo específico (Anexo 3). Una vez que los peces alcanzaron el plano anestésico III (Ross *et al.*, 2008), se tomaron individualmente, con la cara ventral hacia arriba. Posteriormente, los peces fueron inyectados intraperitonealmente con 0,2 ml de Magnadur y Terrivet F-200, utilizando una jeringa de tuberculina de 1 ml. La aguja se insertó lentamente en un ángulo de aproximadamente 45° en la línea media ventral entre las aletas pectorales y las pélvicas. Luego los peces fueron transferidos al estanque original. De acuerdo al peso promedio de los peces inyectados, la dosis de OTC administrada corresponde aproximadamente a 35 mg de OTC/Kg de P.V en el caso de Magnadur, y de 36 mg de OTC/Kg de P.V. para Terrivet F-200.



Metodología de Muestreo.

Se realizaron 4 muestreos programados, de 5 peces por estanque y por tiempo de muestreo, a los 32 (pez 1 al 5), 39 (pez 6 al 10), 46 (pez 11 al 15) y 53 (pez 16 al 20) días post tratamiento para realizar la curva de depleción.

Los peces fueron sacrificados por golpe mortal en la cabeza. El tipo de muestra obtenido se realizó de acuerdo a la Norma Técnica de Sernapesca LAB/NT1(2015a):

- Antes de trozar el pescado, este fue eviscerado completamente.
- Se realizó un corte transversal al eje al pescado, por detrás de la aleta dorsal y delante de la aleta anal.
- Se obtuvieron los filetes sin tejido cartilaginoso y óseo, siendo un lado la muestra y el otro la contra-muestra.

Las muestras y contra-muestras obtenidas fueron introducidas en bolsas plásticas, las que fueron selladas, identificadas y mantenidas en cooler con gel-pack hasta su arribo al Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, donde fueron congeladas a -20°C en freezer hasta su posterior análisis. Las muestras fueron rotuladas con la sigla Mx y las contramuestras con la sigla CMx. Posteriormente se agrega la letra D, E, F (correspondiendo a los estanques Magnadur 1, 2 y 3, respectivamente), G, H o I (correspondiendo a los estanques Terrivet 1, 2 y 3, respectivamente) y finalmente se rotula con el número del pez.

Obtención de curva de depleción.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analizó la concentración de oxitetraciclina (OTC) de las muestras obtenidas, para posteriormente obtener las



curvas de depleción de OTC en músculo, tal como se detalla en el respectivo protocolo (Anexo 3). Con las curvas de depleción se calculó el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de OTC en piel y músculo en Salmón Coho, producto de la administración intraperitoneal de Magnadur y Terrivet F-200.

Para el cálculo del período de resguardo, se utilizó el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” establecido por European Medicine Agency (EMA) para este efecto, el cual está disponible en su página web (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000384.jsp). Para el cálculo del periodo de resguardo se consideraron como Límite Máximo Residual (LMR) de OTC 10 y 100 ppb.

4.5.3. Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Magnadur aplicados vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Trucha Arcoíris.

Animales.

Para el estudio con Magnadur se utilizaron 3 estanques de 2 m³ con 22 ejemplares de Trucha Arcoíris cada uno, con peso de 1.650 +/- 370 g. Los peces no habían sido previamente tratados con OTC. Las condiciones en que se mantuvieron los peces se detallan en el protocolo específico (Anexo 3).

Tratamiento.

Con fecha 28 de Octubre se realizó un muestreo de 4 peces como Tiempo 0. Posteriormente con fecha 26 de noviembre de 2015, los peces fueron extraídos desde los estanques originales y puestos en un estanque con una solución



anestésica, tal como se detalla en el protocolo específico (Anexo 3). Una vez que los peces alcanzaron el plano anestésico III (Ross *et al.*, 2008), se tomaron individualmente, con la cara ventral hacia arriba. Luego, los peces fueron inyectados intraperitonealmente con 0,2 ml de Magnadur, utilizando una jeringa de tuberculina de 1 ml. La aguja se insertó lentamente en un ángulo de aproximadamente 45° en la línea media ventral entre las aletas pectorales y las pélvicas. Luego los peces fueron transferidos al estanque original. De acuerdo al peso promedio de los peces inyectados, la dosis de OTC administrada corresponde aproximadamente a 36 mg de OTC/Kg de P.V

Metodología de Muestreo.

Se realizaron 4 muestreos programados, de 5 peces por estanque y por tiempo de muestreo, a los 33 (pez 1 al 5), 42 (pez 6 al 10), 50 (pez 11 al 15) y 57 (pez 16 al 20) días post tratamiento para realizar la curva de depleción.

Los peces fueron sacrificados por golpe mortal en la cabeza. El tipo de muestra obtenido se realizó de acuerdo a la Norma Técnica de Sernapesca LAB/NT1(2015a):

- Antes de trozar el pescado, este fue eviscerado completamente.
- Se realizó un corte transversal al eje al pescado, por detrás de la aleta dorsal y delante de la aleta anal.
- Se obtuvieron los filetes sin tejido cartilaginoso y óseo, siendo un lado la muestra y el otro la contra muestra.



Las muestras y contra-muestras obtenidas fueron introducidas en bolsas plásticas, las que fueron selladas, identificadas y mantenidas en cooler con gel-pack hasta su arribo al Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, donde fueron congeladas a -20°C en freezer hasta su posterior análisis. Las muestras fueron rotuladas con la sigla Mx y las contramuestras con la sigla CMx. Posteriormente se agrega la letra M, N, O (correspondiendo a los estanques Magnadur 1, 2 y 3, respectivamente) y finalmente se rotula con el número del pez.

Obtención de curva de depleción.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analizó la concentración de Oxitetraciclina (OTC) de las muestras obtenidas, para posteriormente obtener la curva de depleción de OTC en músculo, tal como se detalla en el respectivo protocolo (Anexo 3). Con la curva de depleción se calculó el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de OTC en piel y músculo en Trucha arcoiris, producto de la administración intraperitoneal de Magnadur LA-300.

Para el cálculo del período de resguardo, se utilizó el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” establecido por European Medicine Agency (EMA) para este efecto, el cual está disponible en su página web (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000384.jsp). Para el cálculo del periodo de resguardo se consideraron como Límite Máximo Residual (LMR) de OTC 10 y 100 ppb.



4.5.4. Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Liquamicina y Terrivet F-200 aplicados vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Trucha Arcoíris.

Animales.

Para el estudio con Liquamicina se utilizaron 2 estanques de 1 m³, con 25 ejemplares de Trucha Arcoíris cada uno, con peso de 360 +/- 124 g. Los peces no habían sido previamente tratados con OTC. Las condiciones en que se mantuvieron los peces se detallan en el protocolo específico (Anexo 3).

Para el estudio con Terrivet F-200 se utilizaron 2 estanques de 1 m³, con 25 ejemplares de Trucha Arcoíris cada uno, con peso de 316 +/- 103 g. Los peces no habían sido previamente tratados con OTC. Las condiciones en que se mantuvieron los peces se detallan en el protocolo específico (Anexo 3).

Tratamiento.

Con fecha 12 de abril de 2016, los peces fueron extraídos desde los estanques originales y puestos en un estanque con una solución anestésica, tal como se detalla en el protocolo específico (Anexo 3). Una vez que los peces alcanzaron el plano anestésico III (Ross *et al.*, 2008), se tomaron individualmente, con la cara ventral hacia arriba. Luego, los peces fueron inyectados intraperitonealmente con 0,05 ml de Liquamicina o Terrivet F-200, utilizando una jeringa de tuberculina de 1 ml. La aguja se insertó lentamente en un ángulo de aproximadamente 45° en la línea media ventral entre las aletas pectorales y las pélvicas. Luego los peces fueron transferidos al estanque original. De acuerdo al peso promedio de los



peces inyectados, la dosis de OTC administrada corresponde aproximadamente a 28 y 32 mg de OTC/Kg de P.V para Liquamicina y Terrivet, respectivamente.

Metodologí3 de Muestreo.

Se realizaron 4 muestreos programados, de 5 peces por estanque y por tiempo de muestreo, a los 30 (pez 1 al 5), 38 (pez 6 al 10), 44 (pez 11 al 15) y 55 (pez 16 al 20) dí3s post tratamiento para realizar la curva de depleci3n.

Los peces fueron sacrificados por golpe mortal en la cabeza. El tipo de muestra obtenido se realiz3 de acuerdo a la Norma T3cnica de Sernapesca LAB/NT1(2015a):

- Antes de trozar el pescado, este fue eviscerado completamente.
- Debido al tamaíno de los peces, se realiz3 un corte transversal detr3s del opérculo y otro delante de la aleta anal.
- Se obtuvieron los filetes sin tejido cartilaginoso y óseo, siendo un lado la muestra y el otro la contra-muestra.

Las muestra y contra-muestras obtenidas fueron introducidas en bolsas pl3sticas, las que fueron selladas, identificadas y mantenidas en cooler con gel-pack hasta su arribo al Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, donde fueron congeladas a -20°C en freezer hasta su posterior an3lisis. Las muestras fueron rotuladas con la sigla Mx y las contramuestras con la sigla CMx. Posteriormente se agrega la letra AJ, AK (correspondiendo a los estanques Liquamicina 1 y 2, respectivamente), AP o AQ (correspondiendo a los estanques Terrivet 1 y 2, respectivamente), finalmente se rotula con el númer3 del pez.



Obtención de curva de depleción.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analizó la concentración de Oxitetraciclina (OTC) de las muestras obtenidas, para posteriormente obtener las curvas de depleción de OTC en músculo, tal como se detalla en el respectivo protocolo (Anexo 3). Con las curvas de depleción se calculó el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de OTC en piel y músculo de Trucha arcoiris, producto de la administración intraperitoneal de Liquamicina y Terrivet.

Para el cálculo del período de resguardo, se utilizó el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” establecido por European Medicine Agency (EMA) para este efecto, el cual está disponible en su página web (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000384.jsp). Para el cálculo del periodo de resguardo se consideraron como Límite Máximo Residual (LMR) de OTC 10 y 100 ppb.

4.5.5. Desarrollo de estudio de depleción en músculo de los productos comerciales Liquamicina, Magnadur y Terrivet F-200 aplicados vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmón del Atlántico.

Animales.

Para el estudio con Liquamicina se utilizaron 3 estanques de 1 m³, con 30 ejemplares de Salmón del Atlántico cada uno, con peso de 735 +/- 190 g. Los peces no habían sido previamente tratados con OTC. Las condiciones en que se mantuvieron los peces se detallan en el protocolo específico (Anexo 3).



Para el estudio con Magnadur se utilizaron 3 estanques de 1 m³, con 30 ejemplares de Salmón del Atlántico cada uno, con peso de 620 +/- 163 g. Los peces no habían sido previamente tratados con OTC. Las condiciones en que se mantuvieron los peces se detallan en el protocolo específico (Anexo 3).

Para el estudio con Terrivet F-200 se utilizaron 3 estanques de 1 m³, con 30 ejemplares de Salmón del Atlántico cada uno, con peso de 770 +/- 221 g. Los peces no habían sido previamente tratados con OTC. Las condiciones en que se mantuvieron los peces se detallan en el protocolo específico (Anexo 3).

Tratamiento.

Con fecha 12 de abril de 2016, los peces fueron extraídos desde los estanques originales y puestos en un estanque con una solución anestésica, tal como se detalla en el protocolo específico (Anexo 3). Una vez que los peces alcanzaron el plano anestésico III (Ross *et al.*, 2008), se tomaron individualmente, con la cara ventral hacia arriba. Luego, los peces fueron inyectados intraperitonealmente con 0,1 ml de Liquamicina, 0.1 ml de Magnadur o 0.05 ml de Terrivet F-200, utilizando una jeringa de tuberculina de 1 ml. La aguja se insertó lentamente en un ángulo de aproximadamente 45° en la línea media ventral entre las aletas pectorales y las pélvicas. Luego los peces fueron transferidos al estanque original. De acuerdo al peso promedio de los peces inyectados, la dosis de OTC administrada corresponde aproximadamente a 28, 25 y 26 mg de OTC/Kg de P.V para Liquamicina, Magnadur y Terrivet, respectivamente.



Metodolog3a de Muestreo.

Se realizaron 4 muestreos programados, de 5 peces por estanque y por tiempo de muestreo, a los 30 (pez 1 al 5), 38 (pez 6 al 10), 44 (pez 11 al 15) y 55 (pez 16 al 20) d3as post tratamiento para realizar la curva de depleci3n.

Los peces fueron sacrificados por golpe mortal en la cabeza. El tipo de muestra obtenido se realiz3 de acuerdo a la Norma T3cnica de Semapesca LAB/NT1(2015a):

- Antes de trozar el pescado, este fue eviscerado completamente.
- Debido al tama3o de los peces, se realiz3 un corte transversal detr3s del op3rculo y otro delante de la aleta anal.
- Se obtuvieron los filetes sin tejido cartilaginoso y 3seo, siendo un lado la muestra y el otro la contra muestra.

Las muestra y contra-muestras obtenidas fueron introducidas en bolsas pl3sticas, las que fueron selladas, identificadas y mantenidas en cooler con gel-pack hasta su arribo al Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, donde fueron congeladas a -20°C en freezer hasta su posterior an3lisis. Las muestras fueron rotuladas con la sigla Mx y las contramuestras con la sigla CMx. Posteriormente se agrega la letra S, To U (correspondiendo a los estanques Liquamicina 1, 2 y 3, respectivamente), V, W o X (correspondiendo a los estanques Magnadur 1, 2 y 3, respectivamente), Y, Z o ZZ (correspondiendo a los estanques Terrivet 1, 2 y 3, respectivamente), finalmente se rotula con el n3mero del pez.

Obtenci3n de curva de depleci3n.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analiz3 la concentraci3n de Oxitetraciclina (OTC) de las muestras obtenidas, para posteriormente obtener las



curvas de depleción de OTC en músculo, tal como se detalla en el respectivo protocolo (Anexo 3). Con las curvas de depleción se calculó el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de OTC en piel y músculo de Trucha arcoiris, producto de la administración intraperitoneal de Liquamicina y Terrivet.

Para el cálculo del período de resguardo, se utilizó el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” establecido por European Medicine Agency (EMA) para este efecto, el cual está disponible en su página web (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000384.jsp). Para el cálculo del periodo de resguardo se consideraron como Límite Máximo Residual (LMR) de OTC 10 y 100 ppb.

4.6. Desarrollo de estudios de depleción del principio activo oxitetraciclina (Magnadur) aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones de campo.

Se realizó un estudio en condiciones de campo en un centro de la Empresa Salmones Antártica ubicado en la Región de Aysén. La especie estudiada fue Trucha arcoiris, y la presentación farmacéutica de OTC intraperitoneal administrada fue Magnadur 30%.

Animales.

El estudio tal como se mencionó anteriormente, se realizó con la especie T. arcoiris, en un centro de engorda de la empresa Salmones Antártica. Antes de realizar el tratamiento, se tomaron 3 muestras de truchas, para verificar el estado inicial de los peces, en cuanto a concentración de OTC se refiere, las que fueron procesadas en el Laboratorio y se guardaron congeladas a -20°C , hasta su posterior procesamiento.



La jaula estudiada fue la N° 203, cepa TSA 152135, las que fueron cultivadas de acuerdo a las prácticas habituales de la empresa. Los peces presentaban un peso promedio de 820 gramos, y se cultivaron a una tasa de 65 Kg/m³.

Tratamiento.

Los peces fueron tratados el día 17 de Abril de 2016, a una dosis de 35 mg de OTC/Kg de PV., de acuerdo al procedimiento habitualmente realizado por la Empresa.

Metodología de Muestreo.

Se realizaron los 4 muestreos programados, de 10 peces por tiempo de muestreo, a los 31, 38, 46 y 58 días post tratamiento con el objetivo de realizar la respectiva curva de depleción.

Los peces fueron sacrificados por golpe mortal en la cabeza. El tipo de muestra obtenido se realizó de acuerdo a la Norma Técnica de Sernapesca LAB/NT1 (Sernapesca, 2015a)

- Antes de trozar el pescado, este fue eviscerado completamente.
- Debido al tamaño de los peces, se realizó un corte transversal al eje al pescado, por delante de la aleta anal, con el resto del pescado, se obtienen los filetes completos.
- Se obtuvieron los filetes sin tejido cartilaginoso y óseo, siendo un lado la muestra y el otro la contra muestra.



Las muestra y contra-muestras obtenidas fueron introducidas en bolsas plásticas, las que fueron selladas, identificadas y mantenidas en cooler con gel-pack hasta su arribo al Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, donde fueron congeladas a -20°C en freezer hasta su posterior análisis. Las muestras fueron rotuladas con la sigla Mx y las contramuestras con la sigla CMx. Posteriormente se agrega las letras TA y finalmente se rotula con el número del pez.

Obtención de curva de depleción.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analizó la concentración de Oxitetraciclina (OTC) de las muestras obtenidas, para obtener la curva de depleción de OTC en músculo, tal como se detalla en el respectivo protocolo (Anexo 4). Con la curva de depleción se calculó el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de OTC en piel y músculo en Trucha arcoiris, producto de la administración intraperitoneal de Magnadur LA-300 en condiciones de campo.

Para el cálculo del período de resguardo, se utilizó el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” establecido por European Medicine Agency (EMA) para este efecto, el cual está disponible en su página web (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000384.jsp). Para el cálculo del periodo de resguardo se consideraron como Límite Máximo Residual (LMR) de OTC 10 y 100 ppb.



Objetivo específico 2: *Analizar las curvas de depleción obtenidas y evaluar los impactos que éstas podrían tener sobre el actual programa de control de fármacos vigente.*

4.7. Comparación de las curvas de depleción obtenidas bajo condiciones controladas y las obtenidas bajo condiciones de campo.

Se realizó una comparación de las curvas de depleción obtenidas tanto en condiciones controladas como de campo, teniendo en cuenta que se utilizaron diferentes productos comerciales.

La comparación se centró en posibles diferencias obtenidas en el $T \frac{1}{2}$ y periodos de resguardo obtenidas de las diferentes especies, productos comerciales como así también diferencias entre condiciones de campo y condiciones controladas. Para el cálculo de diferencias estadísticas de $T \frac{1}{2}$ se utilizó un análisis de pendientes separadas, el que analiza si las pendientes presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí, y como el $T \frac{1}{2}$ se calcula directamente de la pendiente, evidenciando si hay diferencias estadísticamente significativas de $T \frac{1}{2}$.

Adicionalmente se estudió la posible diferencia de concentraciones obtenidas en los grupos de mayor peso con los de menor peso en todos los estudios realizados y en todos los tiempos de muestreo.

4.8. Identificación y evaluación de los impactos del uso extraetiqueta de oxitetraciclina aplicada intraperitonealmente sobre el actual programa de control de fármacos vigente.

Una vez obtenidos y analizados los resultados de los estudios con 3 presentaciones farmacéuticas de oxitetraciclina inyectable, para tres especies de



salmónidos, tanto en condiciones controladas como de campo, se pudieron establecer algunas conclusiones generales que permiten identificar singularidades de este tipo de aplicación, sobre las curvas de depleción y respectivos periodos de carencia según mercado de destino, respecto de la aplicación por alimento medicado, y que es la que fue considerada al momento de la elaboración de la normativa atingente, principalmente el programa de Control de Fármacos del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca).

Se identificaron los procesos que pudieran ser modificados, detallándose su justificación, aplicabilidad y costos generales, así como el estamento afectado.

Luego de identificados los cambios factibles de implementar, se evaluaron directamente las modificaciones asociados al Programa de Control de Fármacos vigente.

En términos generales, se consideraron las nuevas actividades exigidas para su implementación, las que a su vez, implican consumo de recursos, siendo el costo la expresión cuantificada en términos monetarios de los recursos o factores productivos consumidos por la actividad.

Se elaboró un diagrama de flujo relacionado con la implementación de los cambios al programa por parte de la autoridad y se identificaron las actividades relacionadas. Con la información obtenida en los puntos anteriores se implementó un costeo en dos fases que incluyen los siguientes pasos:

Fase 1

- Asignación de costos indirectos a los centros de actividad
- Identificación de las actividades por centro



- Determinación de los generadores de costo de las actividades
- Reclasificación de las actividades
- Cálculo del costo unitario del generador de costos

Fase 2

- Asignación de los costos de las actividades a los productos
- Asignación de los costos directos a los productos

En la primera fase se asignaron los costos a las actividades pertenecientes a los diferentes centros; de esta forma las actividades se convierten en el núcleo del modelo.

En la segunda fase se asignaron a los productos los costos de las actividades y además se asignaron a esos mismos productos los costos directos.

4.9. Propuesta de ajustes para que el uso extra etiqueta de oxitetraciclina intraperitoneal, no se traduzca en un rechazo del producto final debido a presencia de residuos de antimicrobianos.

Se elaboró el listado con propuestas de modificación a la normativa vigente del Programa de Control de Fármacos, FAR/MP1, del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, Sernapesca, considerando los resultados obtenidos para la vida media y curvas de depleción en músculo de oxitetraciclina aplicado por vía intraperitoneal y luego de contrastados con su factibilidad de implementación, considerando el costo estimado de la misma.

El objetivo principal de las propuestas es asegurar, con un margen de error conocido, el cumplimiento de las normativas internacionales respecto de las



regulaciones que aplican al uso de oxitetraciclina extra-etiqueta aplicada intraperitonealmente, y sus eventuales prohibiciones y/o límites máximos residuales permitidos en mercados de destino.

Las propuestas listadas y su fundamento se presentaron a representantes de Sernapesca y Subpesca el día 27 de julio de 2016 por videoconferencia, para luego ser remitidas en formato de informe escrito el 1° de Agosto de 2016, para su revisión y comentarios, a fin de consensuar las modificaciones propuestas.



5. RESULTADOS

Objetivo espec3fico 1: *Determinar las curvas de depleci3n del principio activo oxitetraciclina v3a intraperitoneal, bajo condiciones de campo.*

5.1. Revisi3n bibliogr3fica asociada a curvas de depleci3n de f3rmacos en Peces.

La revisi3n estuvo enfocada a estudios asociados a la obtenci3n de curvas de depleci3n de oxitetraciclina luego de su aplicaci3n en salm3nidos, con especial 3nfasis en estudios que considerasen administraci3n por v3a inyectable y su posterior detecci3n por HPLC. Inicialmente la revisi3n abarc3 los trabajos publicados los 3ltimos 5 a3os, pero debido a la escases de 3stos, se ampli3 la b3squeda hasta trabajos publicados desde 1990 en adelante. En la revisi3n se incluy3 una base de datos p3blica continuamente actualizada (3ltima actualizaci3n en 2014), establecida por Reimschuessel *et al.* (2005), la que entrega informaci3n de la farmacocin3tica de drogas (incluyendo OTC) en especies acu3ticas. Las citas de todos los trabajos revisados se pueden observar en el Anexo 5.

La mayor3a de los trabajos revisados acerca de la farmacocin3tica, acumulaci3n y depleci3n de Oxitetraciclina de especies salm3nidas, tienen relaci3n con la administraci3n v3a oral (Aoyama *et al.*, 1991; Bebak-Williams *et al.*, 2002; Bj3rklund and Bylund, 1990; Bj3rklund *et al.*, 1991; Coyne *et al.*, 2004a; Grondel *et al.*, 1989; Jacobsen, 1989; Meinertz *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2012; Namdari *et al.*, 1996; Rogstad *et al.*, 1991).



Los estudios revisados fueron realizados en Trucha Arcofiris, Chinook, Coho y Salar, en condiciones de campo y controlada, con distintas concentración de OTC administrada, distinto tiempo de aplicación, distintas salinidades de agua (dulce, salada y salobre) y a diversas temperaturas.

Los trabajos revisados que tienen relación a una administración inyectable, son muy escasos (Abedini *et al.*, 1998; Elema *et al.*, 1996; Grondel *et al.*, 1989; Namdari *et al.*, 1999; Uno *et al.*, 1997), principalmente intravenoso o arterial para realizar estudios de farmacocinética. Black *et al.* realizaron un estudio de farmacocinética y distribución en tejidos, luego de la administración intravenosa de OTC (1991), sin embargo los tiempos de muestreo que utilizaron fueron muy bajos, siendo el último tiempo de muestreo a las 96 horas (4 días) post-administración. No se encontraron trabajos de depleción de oxitetraciclina inyectable vía intraperitoneal en salmónidos publicados desde 1990 a la fecha. Se encontró un trabajo, dónde se estudió la concentración de OTC en el plasma e hígado, luego de la administración de OTC vía intraperitoneal (Bruno, 1989), sin embargo la determinación de OTC, se realizó con un método microbiológico.

Un aspecto importante en la revisión fue la cantidad de animales de estudio. En prácticamente la totalidad de los trabajos revisados, fue utilizado un estanque o jaula por variable a estudiar. En un caso se realizaron dos pruebas en ocasiones diferentes y se combinaron los resultados de ambos días (Bebak-Williams *et al.*, 2002). El número de peces por tiempo de muestreo fue de igual forma variable, se utilizaron de 2 a 9 peces por punto de muestreo, y en un caso se utilizaron 22 peces por tiempo de muestreo (Meinertz *et al.*, 2001), pero realizado con Salmón Coho de muy pequeño tamaño (13-62g).



En un proyecto recientemente realizado por el IFOP (2014b), se utilizaron 12 peces por tiempo de muestreo, esto debido a la gran variabilidad de resultados que se esperaba obtener. Rigos y Smith (2013), señalan que pocos trabajos satisfacen las recomendaciones de 10 animales por tiempo de muestreo señaladas por agencias europeas.

En cuanto a la cantidad de tiempos de muestreo realizados, éstos oscila entre los 6 y 16, los que incluyen muestreos durante y después de realizado el tratamiento. El último tiempo de muestreo en que se cuantificó oxitetraciclina osciló entre los 19 días (Meinertz *et al.*, 2001) a los 43 días (Namdari *et al.*, 1996). Cabe hacer notar que los resultados de Namdari los obtuvo con la especie Chinook a 9°C, en el mismo trabajo el último día que obtuvo resultados cuantificables de OTC fue a los 21 días.

Los valores de tiempo de vida media ($T_{1/2}$) calculados varía entre los 4,4 días hasta los 15 días. La mayoría de los valores oscilan alrededor de los 5,5 días. En un proyecto recientemente realizado por el IFOP (2014b), se calcularon los $T_{1/2}$ de dos productos comerciales utilizados en Chile con resultados de 5,6 y 6,8 días.

5.2. Revisión de fuentes de información oficial nacional e internacional.

En el Manual de Procedimientos del Sernapesca FAR-MP1 (2015b), se indica que como control de residuos de productos farmacéuticos en centros de cultivo, se debe muestrear cualquier jaula que haya sido tratada con un producto inyectable aunque haya sido realizado con más de 6 meses de anterioridad. El número muestral es de 10, correspondiendo al grupo de menor peso (20%) de la jaula. En el caso que las jaulas hayan sido tratadas adicionalmente en forma oral con el mismo principio activo, se deben tomar 20 muestras, 10 correspondientes al grupo



de mayor peso (20%) y 10 al grupo de menor peso (20%). El Límite Máximo Residual (LMR) para liberar una jaula (se pueda cosechar) es de 100 ng/g. Adicionalmente se indica que el LMR de Oxitetraciclina en producto final según los diferentes destinos, es el siguiente:

- Chile : 200 ng/g
- Unión Europea : 100 ng/g
- Japón : 200 ng/g

El LMR de OTC en peces para Chile, se puede encontrar en la resolución exenta 551 del Ministerio de Salud (2015). Actualmente el Sernapesca incluyó un Límite Máximo Residual (LMR) de Oxitetraciclina para productos derivados de la acuicultura de 10 ppb para las exportaciones de la Unión Económica Euroasiática (2015c).

El Sernapesca indica que los peces muestreados se deben eviscerar completamente, para posteriormente realizar un corte transversal al eje del pescado por detrás de la aleta dorsal y por delante de la aleta anal. La muestra a analizar debe consistir de 400 gramos de músculo y piel en proporciones naturales. De pesar menos de 400 gramos, el corte transversal se adelantará hacia la cabeza del pescado para completar los 400 gramos, si pesa menos se deberá tomar más de 1 pescado (Sernapesca, 2015a).

Actualmente el Laboratorio de Verificación del Sernapesca realiza el análisis de OTC en piel-músculo de pescado mediante HPLC-MS/MS con un límite de detección (LD) de 5,0 ppb y límite de cuantificación (LC) de 5,7 ppb (Sernapesca, 2015d). En la misma norma técnica se clarifica que la muestra a analizar debe ser



músculo y piel en proporciones naturales removiendo el tejido óseo y cartilaginoso. Una mitad corresponde a la muestra, la otra a la contramuestra.

En el D.S (MINAGRI) N°25 de 2005, en versión del 12 de Julio de 2012 (2012) señala que el registro y autorización de productos farmacéuticos de uso exclusivamente veterinario es responsabilidad del SAG. Además se indica que la responsabilidad de la prescripción y administración es del Médico Veterinario tratante, quien deberá además establecer un período de resguardo para asegurar de que no se sobrepase el LMR establecido para el producto en particular. La aplicación terapéutica en terreno es materia de monitoreo y registro del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.

En una guía de EMEA acerca de la demostración de seguridad y eficacia de productos veterinarios para uso en peces (2011) se recomienda que para estudios de farmacocinética y farmacodinámica en peces, al ser poiquiloterms, se debe controlar la temperatura del estudio. Adicionalmente, se debe controlar la salinidad del agua. En la misma guía se señala que el muestreo repetitivo a 1 mismo pez no es posible, debido a lo cual se deben tomar muestras de diferentes peces a distintos tiempo de muestreo.

Se decidió utilizar como referencia dos normas internacionales una proveniente de la FDA (2005) y la otra de la EMEA (1997).

- Ambas referencias señalan que los estudios de depleción deben ser medidos en la fase terminal de la eliminación de un fármaco, dónde debe haber linealidad del logaritmo natural (\ln) de la concentración vs el tiempo.
- Los datos (puntos de muestreo) deben ser independientes uno del otro.



- Cada dato debe ser originado por el mismo número de réplicas.
- En cuanto al tratamiento de los datos que se encuentren bajo el límite de cuantificación y de detección la FDA recomienda excluir estos datos, sin embargo en EMEA se señala que a estos datos se le asigne un valor correspondiente a la mitad del respectivo límite. Si todos o la mayoría de los datos en esta condición se debe eliminar el punto.
- Se necesitan al menos 3 puntos válidos para hacer un análisis de regresión.
- Se requiere de un mínimo de 3 animales por 3 puntos para hacer una regresión válida.
- Se sugiere 4-10 animales por punto de muestreo dependiendo de la especie. La FDA sugiere un mínimo de 5 animales en cuatro tiempos de muestreo.

5.3. Identificación del tipo de muestra requerido para la detección de oxitetraciclina intraperitoneal bajo condiciones controladas y de campo.

Tal como fue indicado en el informe final del proyecto realizado por IFOP en el año 2014, denominado “Monitoreo de la eficacia y seguridad de productos farmacológicos utilizados en la salmonicultura”, los estudios pueden ser hechos de cualquier tejido del organismo a estudiar. No obstante lo anterior, las recomendaciones de EMEA (1997) y VICH (2015) indican que las muestras deben corresponder al producto comestible.

En una revisión bibliográfica publicada recientemente (Rigos and Smith, 2013) se indica que en la mayoría de los peces, la porción comestible es el músculo y piel en proporciones naturales. Debido a lo anteriormente expuesto, inicialmente se decidió utilizar la muestra actualmente exigida por el Sernapesca en los ensayos



de pre-cosecha (Sernapesca, 2015a), el cual indica que se debe realizar un corte transversal al eje del pescado, por detr3s de la aleta dorsal y delante de la aleta anal. En la misma normativa el Sernapesca indica que el peso de la muestra debe ser al menos 400 gramos.

Por otra parte, en una gu3a de EMEA (2003) se indica que al utilizarse tratamientos inyectables, puede haber diferencias en los tiempos de depleci3n en los sitios de inyecci3n con respecto a otras zonas. Como resultado de conversaciones con representantes de las empresas productoras y a la revisi3n de la ficha t3cnica del producto Terrivet F 200 (3nico producto comercial con registro de SAG para salm3nidos, se pudo constatar que el sitio de inyecci3n es entre la aleta p3lvica y pectoral.

Considerando estos antecedentes, finalmente se decidi3 analizar dos muestras, una que es la obtenida normalmente para los ensayos de pre-cosecha (Sernapesca, 2015a), y una segunda d3nde se realiza un corte transversal detr3s de la aleta dorsal hasta un corte transversal detr3s de la aleta pectoral, que incluye el sitio de inyecci3n. En ambos tipos de muestras, una mitad sirve como muestra y una segunda como contramuestra. Pese a que la normativa dice que la muestra debe corresponder a 400 gramos, en este caso se privilegia el sector de la muestra por sobre su tama3o, con fines comparativos.

5.4. Identificaci3n de las presentaciones farmac3uticas de oxitetraciclina inyectable comercializadas en el pa3s y las dosis utilizadas.

De acuerdo a la informaci3n obtenida desde el Servicio Agr3cola y Ganadero (SAG), el 3nico producto comercial de OTC inyectable autorizado para ser utilizado en salm3nidos es Terrivet 200 de Veterqu3mica, Reg. SAG N3 2252-B.



Adicionalmente con la información obtenida del Sernapesca, se pudo elaborar un listado con los productos comerciales de OTC inyectable más utilizados por la industria salmonicultora desde el año 2013 a junio del presente año (Anexo 6). Por asuntos de confidencialidad, sólo se incluye la cantidad total de OTC inyectable utilizado y por producto comercial, pero sin nombrar las empresas que la utilizaron. En este listado se incluye Terrivet 200, pero la información disponible es desde diciembre del 2014 a junio del 2015, lo que se debe a que este producto fue recientemente registrado (Octubre del 2014).

La OTC inyectable extra etiqueta mayormente utilizada por la industria salmonicultora desde el año 2013 a junio del presente año es Liquamicina LA 20% (Pfizer). El segundo producto más utilizado durante el mismo período es Terrivet LA 20% (Veterquímica), sin embargo debido a que la empresa Veterquímica, registró a fines del año 2014 Terrivet F200 (especialmente fabricado a salmónidos), el uso del producto extra etiqueta ha disminuido su participación en el mercado.

En reuniones con representantes de la industria salmonicultora, se señaló que sería útil realizar los estudios con Liquamicina LA 20% y con Magnadur LA 300 30% (Norbrook Laboratories LTD), ya que de acuerdo a lo indicado, éste último tendría un período de resguardo menor.

Magnadur LA 300 30% es el quinto producto comercial mayormente utilizado, no obstante, su participación en el mercado debería aumentar en los próximos años. De hecho el primer semestre del presente año se ha utilizado más que lo que se utilizó el 2014. En el sistema en línea de búsqueda de medicamentos veterinarios autorizados por el SAG se puede observar que la forma farmacéutica de ambos



productos es diferente. Liquamicina LA 20% es una suspensión inyectable, mientras Magnadur LA 300 30% es una solución inyectable.

Con la información obtenida con fecha 13 de agosto de 2015 se realizó una propuesta a Sernapesca y Subpesca acerca de los productos a evaluar. En la propuesta se propuso realizar estudios con los productos Liquamicina LA 20% (Pfizer), Magnadur LA 300 30% (Norbrook Laboratories LTD) y adicionalmente Terrivet F200 (Veterquímica), por ser el único producto con registro del SAG para ser utilizados en salmónidos (no es extra etiqueta).

La forma farmacéutica de Terrivet F200 es una suspensión inyectable al 20%. La dosis recomendada para este producto por el fabricante es de 20 mg OTC/Kg de P.V. En estas condiciones señalan un periodo de resguardo de 1060 grados día. Sin embargo de acuerdo a conversaciones de productores, la dosis más utilizada por la industria es de 30 mg OTC/Kg de P.V.

5.5. Desarrollo de estudios de depleción del principio activo oxitetraciclina aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmón coho, trucha arcoíris y salmón del Atlántico

Con la información obtenida en los puntos anteriores se confeccionaron los protocolos para la obtención de curvas de depleción de OTC administrada vía intraperitoneal en trucha arcoíris, salmón coho y salmón del Atlántico en condiciones controladas y de campo, los que se enviaron a la Subpesca y al Sernapesca. Luego de recibidas las observaciones a los protocolos, éstos se confeccionaron nuevamente en su versión 2, los que se pueden observar en los Anexos 3 y 4.



En los protocolos en condiciones controladas, se propone realizar los estudios a la dosis más utilizada por la industria (30 mg de OTC/Kg P.V.), independiente que la dosis recomendada por Terrivet 200 sea de 20 mg de OTC/Kg P.V.

Los 8 tiempos de muestreo inicialmente propuestos en el protocolo a realizar bajo condiciones controladas, se aplicarán con el primer producto a estudiar. Una vez obtenidos los resultados de los análisis, se seleccionarán los 4 tiempos de muestreo que entreguen resultados cuantificables con una menor concentración, y con los que se pueda confeccionar una curva de depleción válida.

Una vez realizado este análisis, estos cuatro tiempos de muestreo se utilizarán en los otros dos estudios de productos restantes.

5.5.1. Desarrollo de estudio de depleción del producto comercial Liquamicina LA aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmón Coho.

Comparación de resultados de las muestras Normales y las del Punto de Inyección.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt se realizó la determinación de OTC en la matriz piel-músculo de pescado, mediante la extracción del producto farmacéutico con agitación en vórtex y sonicación, junto a los solventes adecuados, hasta obtener un extracto que es identificado y cuantificado utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD). El límite de detección y cuantificación de la técnica es 25 y 50 ppb, respectivamente.



En el anexo 7 se pueden observar los resultados de concentraci3n de OTC en m3sculo-piel de las muestras de los 4 primeros tiempos de muestreo, utilizados para la comparaci3n de los resultados obtenidos en las muestras normales y en las que incluyen el punto de inyecci3n. Los cromatogramas se pueden observar en el mismo anexo.

Al realizar el an3lisis de regresi3n lineal simple para comparar los resultados de concentraci3n de OTC en las muestras normales versus las muestras que incluyen el punto de inyecci3n (Figura 3), se obtiene un coeficiente de determinaci3n r^2 de 0,997. La pendiente de 0,9758, es muy cercana a 1 y el intercepto se acerca a 0. Al observar los l3mites de confianza con un 95% de la pendiente e intercepto (Tabla 1), se puede determinar que el l3mite superior es pr3cticamente 1, y estad3sticamente el intercepto es 0. Con esto se demuestra que los resultados de ambos tipos de muestra son iguales.

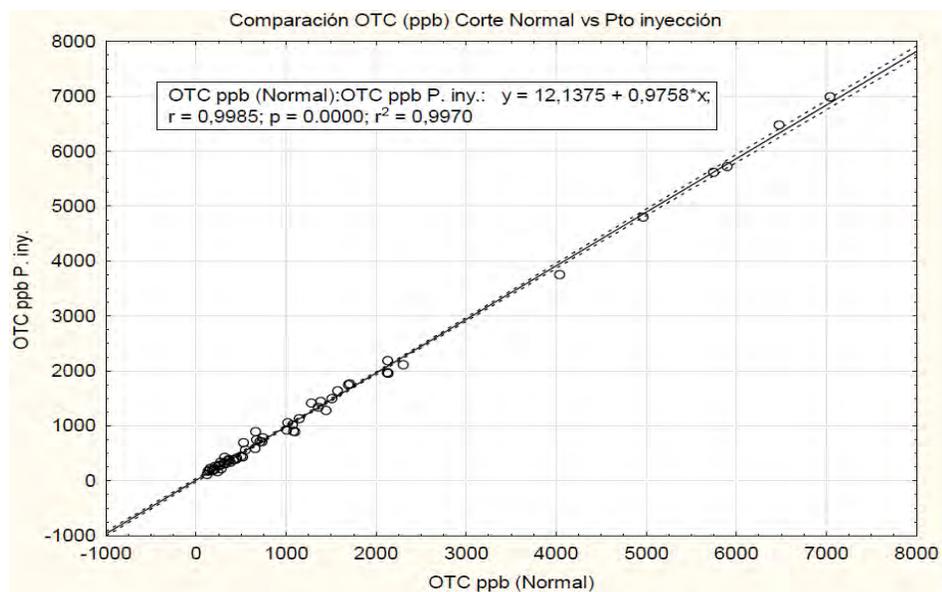


Figura 3. Regresi3n Lineal de concentraci3n de OTC ug/Kg en corte Normal vs Punto de inyecci3n.



Tabla 1
Parámetros de la estimaci3n de la regresi3n lineal de la comparaci3n de muestras.

	Coeficientes	Error Típico	Estadístico t	probabilidad	-95,00%	+95,00%
Intercepto	12,13752	15,36486	0,7900	0,433010	-18,6672	42,94220
OTC ppb (Normal)	0,97580	0,00727	134,1424	0,000000	0,9612	0,99039

Obtenci3n de curva de depleci3n de OTC producto de la inyecci3n i.p. de Liquamicina en Salm3n Coho en condiciones controladas.

Para la realizaci3n de la curva de depleci3n solamente se utilizaron los datos de los 6 últimos tiempos de muestreo, debido a que en los dos primeros la concentraci3n fue muy alta. La curva se realizó graficando el logaritmo natural (Ln) de la concentraci3n de OTC versus los días post administraci3n, para lo cual se utiliz3 el programa Statistica. Posteriormente, se realizó la revisi3n de la presencia de outliers en el conjunto de los datos mediante el criterio de dos desviaciones estandar de la media de los residuales. La curva de depleci3n obtenida se observa en la figura 4, en el anexo 8 los resultados obtenidos, y sus respectivos cromatogramas. Como demostramos en el punto anterior, los resultados al utilizar las muestras normalmente utilizadas en los ensayos de pre cosecha son iguales a los obtenidos utilizando la muestra que incluye el punto de inyecci3n, raz3n por la cual, la curva de depleci3n la realizamos utilizando las muestras normales.



Liquamicina - Laboratorio - Salm3n coho

$$\text{Ln OT ng g}^{-1} = 8,0831 - 0,0553 * x; 0,95 \text{ Pred.Int.}$$

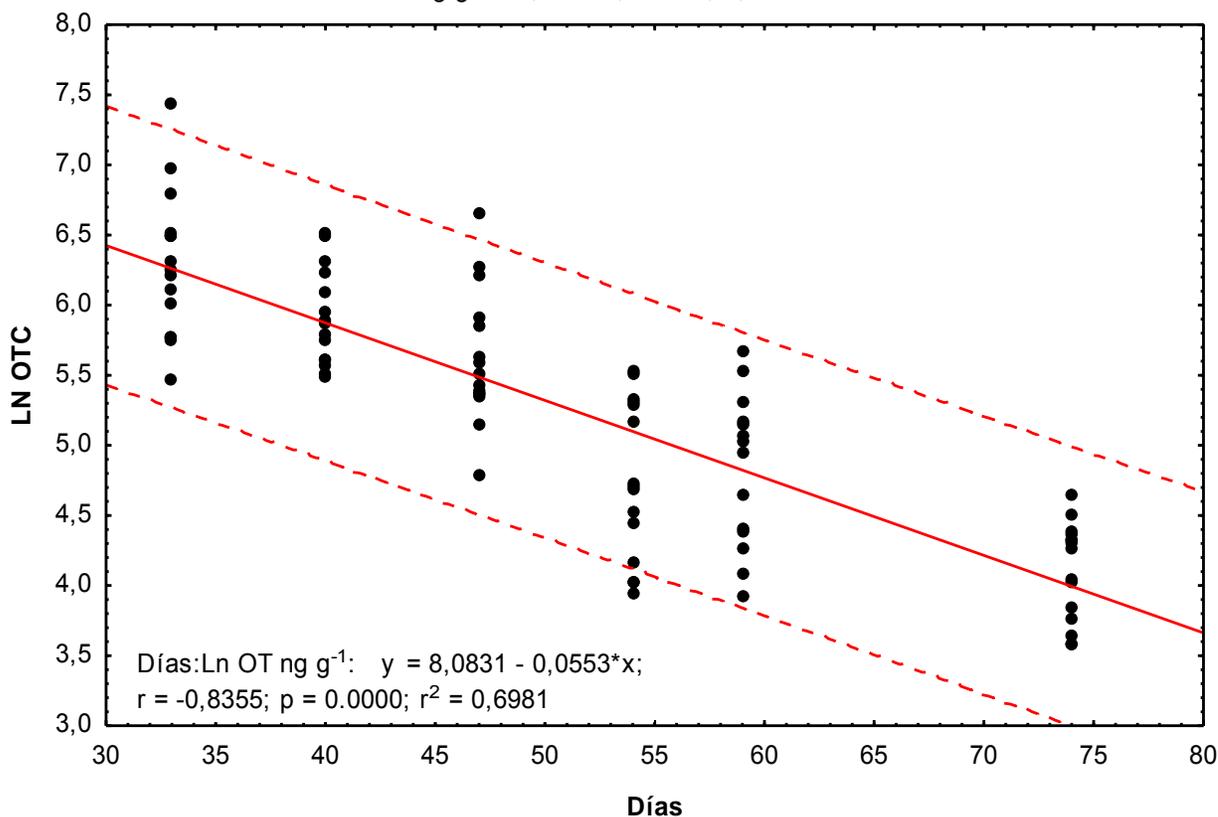


Figura 4. Curva de depleci3n de OTC en Coho, post-administraci3n de Liquamicina i.p. de 36. mg de OTC/Kg de P.V

El tiempo de vida media se calcul3 dividiendo 0,693 por la pendiente de la curva de depleci3n, dando un valor para Liquamicina de 12.5 d3as.

Utilizando el software "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4", se calcul3 el periodo de resguardo para un LMR de 100 ppb (Fig 5) y de 10 ppb (Fig 6). Los valores de periodo de resguardo calculado son de 81 d3as para un LMR de 100 ppb, y de 125 d3as para un LMR de 10 ppb. El c3lculo fue realizado con un l3mite de tolerancia superior del 95%, con un 95 % de confianza. Si se toma en cuenta la



temperatura promedio durante el ensayo de depleci3n ($12,7 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$), el per3odo de resguardo se puede expresar como 1029 3 d3as (LMR=100 ppb) y 1588 3 d3as (LMR=10 ppb).

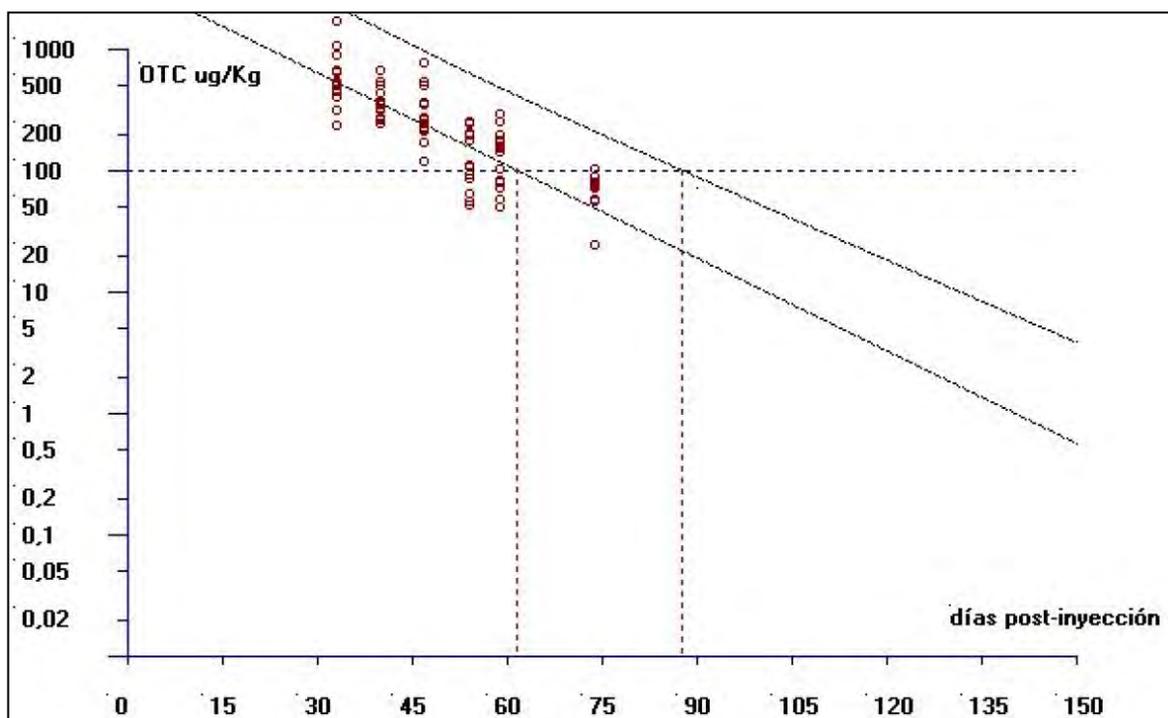


Figura 5. Gráfico de per3odo de resguardo de Liquamicina en Coho, con LMR de 100 ppb.

Para que las curvas de depleci3n sean consideradas v3lidas, es necesario que se cumplan los siguientes supuestos de la regresi3n utilizada:

- homogeneidad de las varianzas
- Linealidad de los datos de Ln vs tiempo
- distribuci3n normal de errores

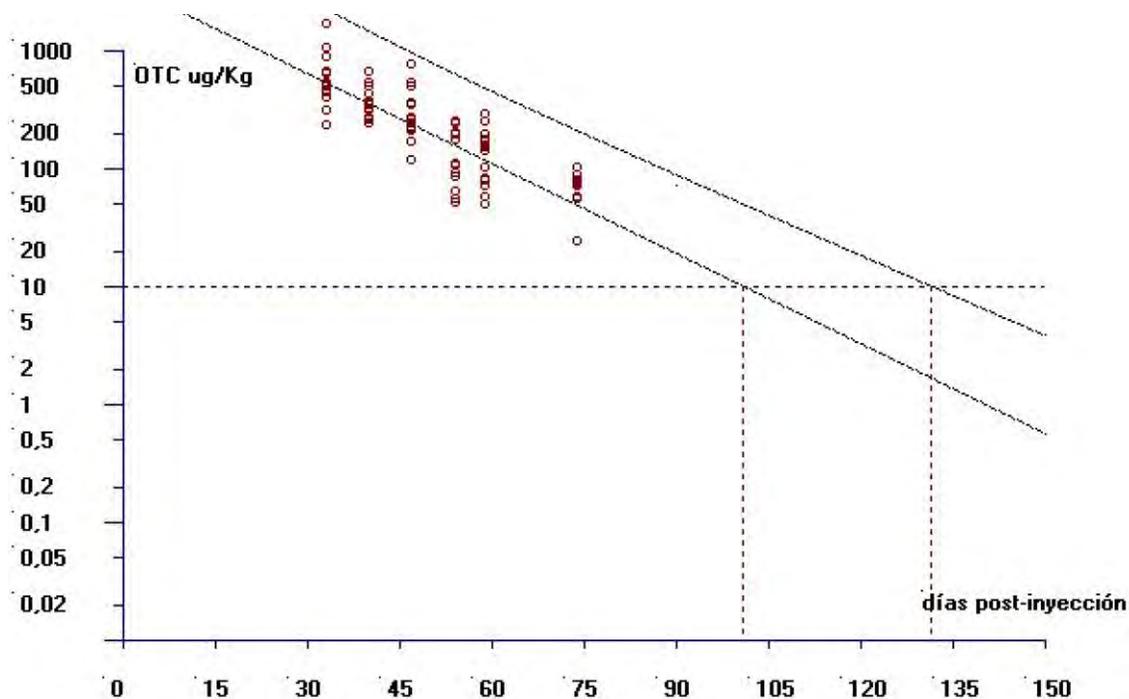


Figura 6. Gráfico de período de resguardo de Liquamicina en Coho, con LMR de 10 ppb.

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utilizó el test de Bartlett, que lo realiza el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”:

$$\text{Bartlett-test } 4,02256929464986 (5)(p > 0.05)$$

Para comprobar la linealidad, basta con la inspección visual de la curva de depleción (Fig 4).

Para comprobar la normalidad de errores, con el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” se obtiene el gráfico de residuales (Fig 7) y el gráfico de la frecuencia acumulativa de errores (Fig 8).

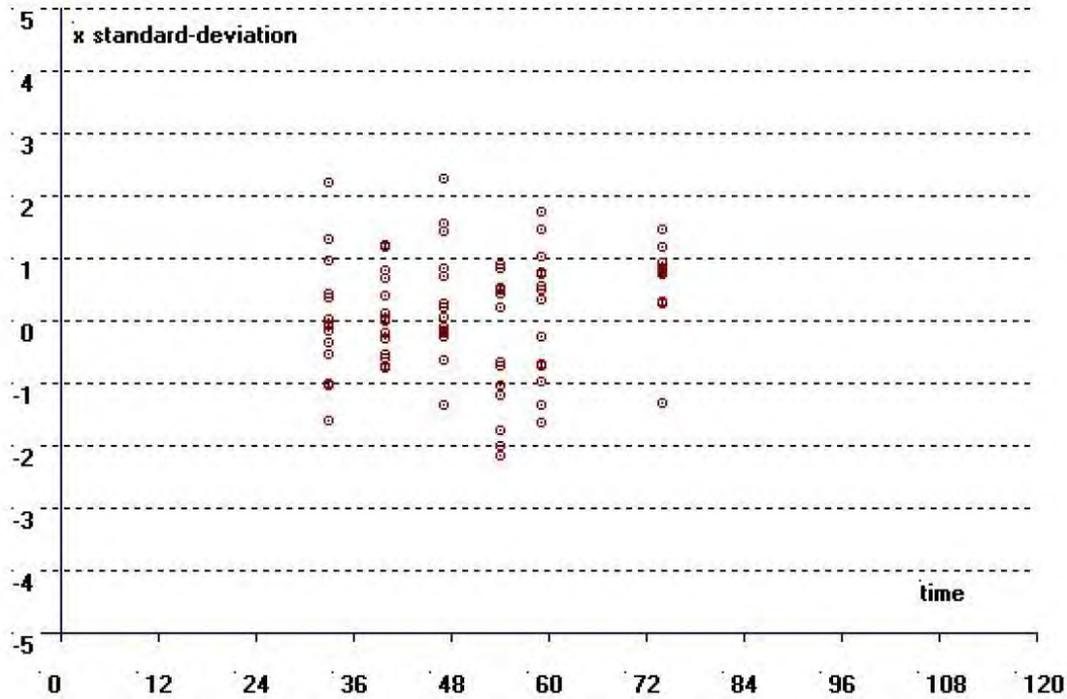


Figura 7. Gráfico de residuales de la curva de depleci3n de Liquamicina.

Para verificar los resultados del gráfcico de residuales, se realiz3 una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para lo que se utiliz3 el programa Statistica;

Shapiro-Wilk $W=,98819$, $p=,60611$



CUM.FREQ. DISTR. (PROBABILITY SCALE)

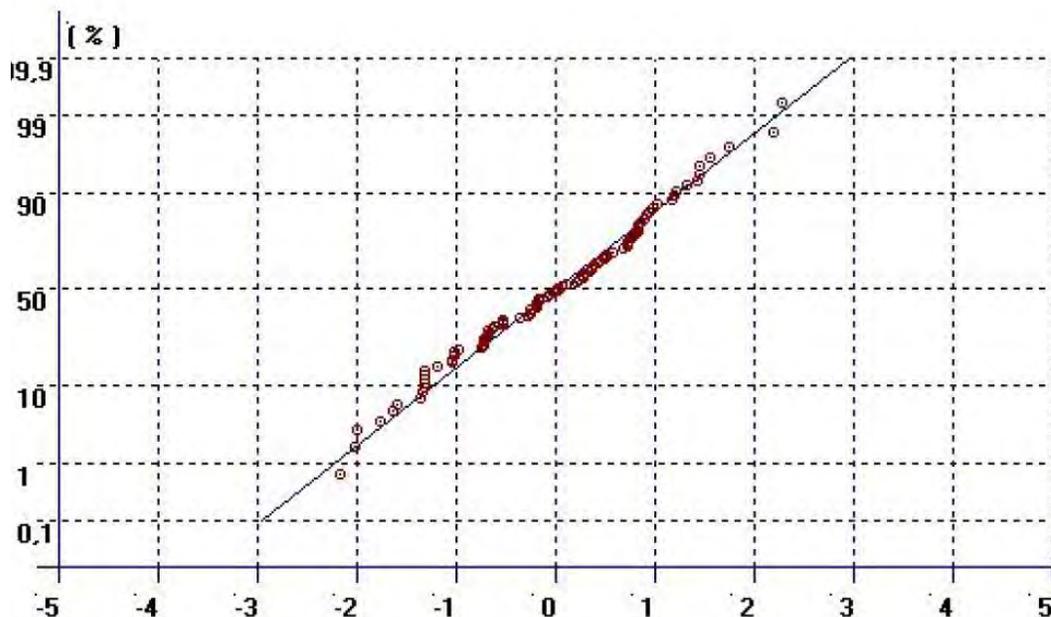


Figura 8. Gráfico de la frecuencia acumulativa de errores de la curva de depleci3n de Liqueamicina

5.5.2. Desarrollo de estudio de depleci3n en m3sculo del producto comercial Magnadur aplicado v3a intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salm3n Coho.

Obtenci3n de curva de depleci3n en m3sculo de OTC producto de la inyecci3n i.p. de Magnadur en Salm3n Coho, bajo condiciones controladas.

La curva depleci3n en m3sculo de OTC se realiz3 graficando el logaritmo natural (Ln) de la concentraci3n de OTC versus los d3as post administraci3n, para lo cual se utiliz3 el programa Statistica. Posteriormente, se realiz3 la revisi3n de la presencia de outliers en el conjunto de los datos mediante el criterio de dos



desviaciones estándar de la media de los residuales. La curva de depleción obtenida se observa en la figura 9, mientras que en el anexo 8 se presenta el detalle de los resultados obtenidos y sus respectivos cromatogramas.

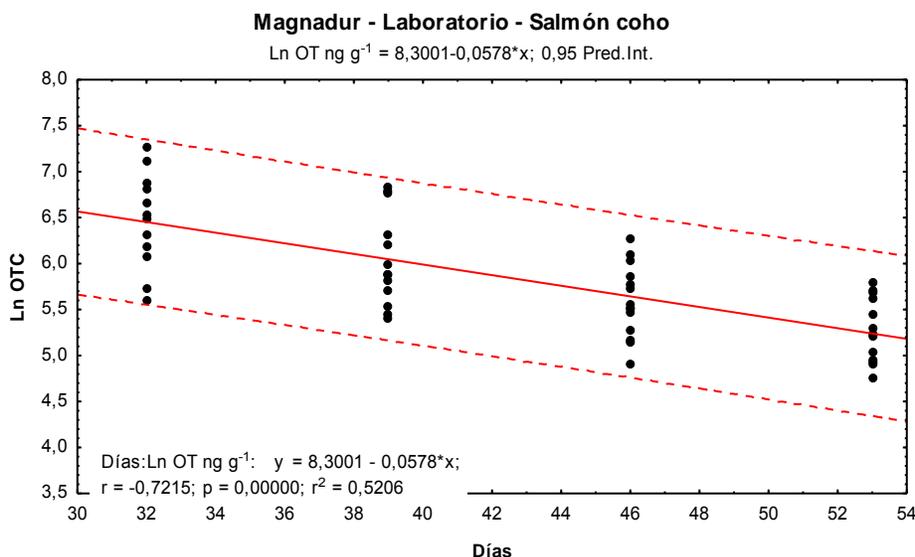


Figura 9. Curva de depleción de OTC en Coho, post-administración de Magnadur a 35 mg de OTC/Kg de P.V.

El tiempo de vida media se calculó dividiendo 0,693 por la pendiente de la curva de depleción, dando un valor para Magnadur de 12 días.

Utilizando el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”, se calculó el periodo de resguardo para un LMR de 100 ppb (Fig 10) y de 10 ppb (Fig 11). Los valores de periodo de resguardo calculados son de 87 días para un LMR de 100 ppb, y de 139 días para un LMR de 10 ppb. El cálculo fue realizado con un límite de tolerancia superior del 95%, con un 95 % de confianza. Si se toma en cuenta la temperatura promedio durante el ensayo de depleción (14,8 +/- 1,6°C), el período de resguardo se puede expresar como 1288 ° días (LMR=100 ppb) y 2057 ° días (LMR=10 ppb).

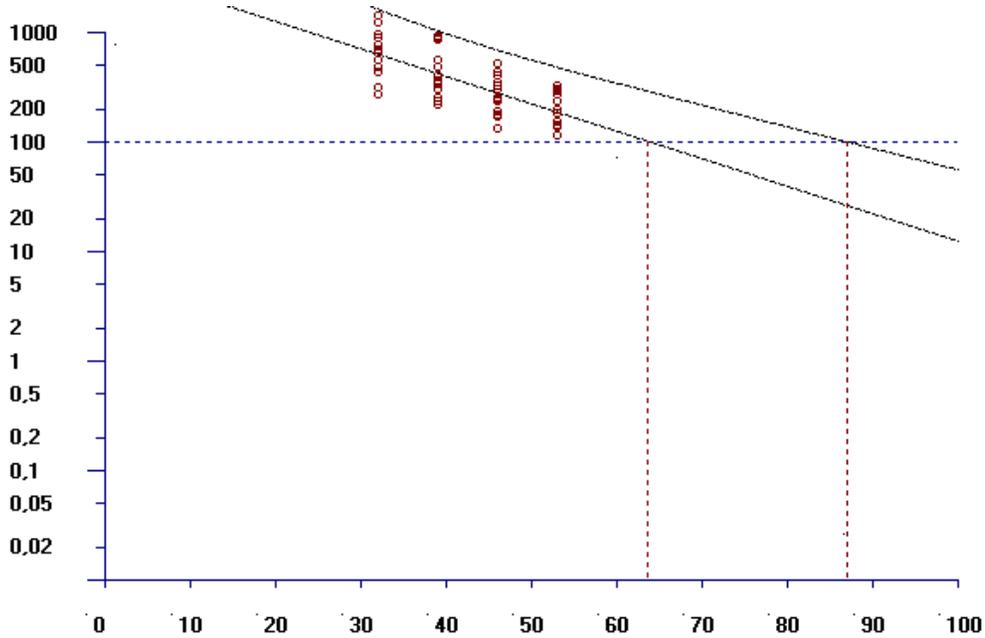


Figura 10. Gráfico de período de resguardo de Magnadur en Coho, con LMR de 100 ppb.

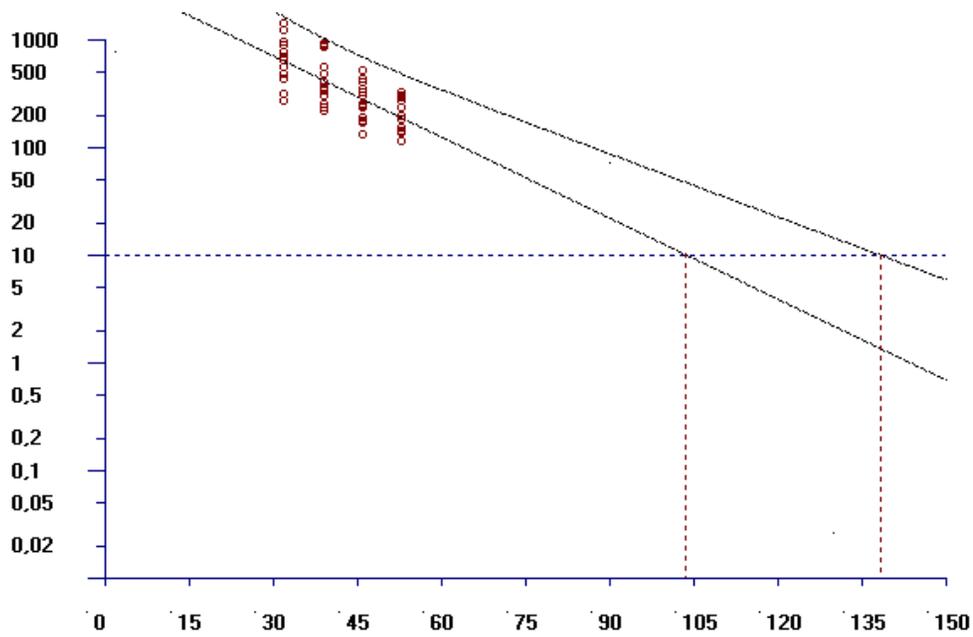


Figura 11. Gráfico de período de resguardo de Magnadur en Coho, con LMR de 10 ppb.



Para que las curvas de depleción sean consideradas válidas, es necesario que se cumplan los siguientes supuestos de la regresión utilizada:

- homogeneidad de las varianzas
- Linealidad de los datos de Ln vs tiempo
- distribución normal de errores

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utilizó el test de Bartlett, a través del software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”:

Bartlett-test: 2,33902159012121 (3) ($p > 0.05$)

Para comprobar la linealidad, basta con la inspección visual de la curva de depleción (Fig 9).

Para comprobar la normalidad de errores, con el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” se obtiene el gráfico de residuales (Fig 12) y el gráfico de la frecuencia acumulativa de errores (Fig 13).

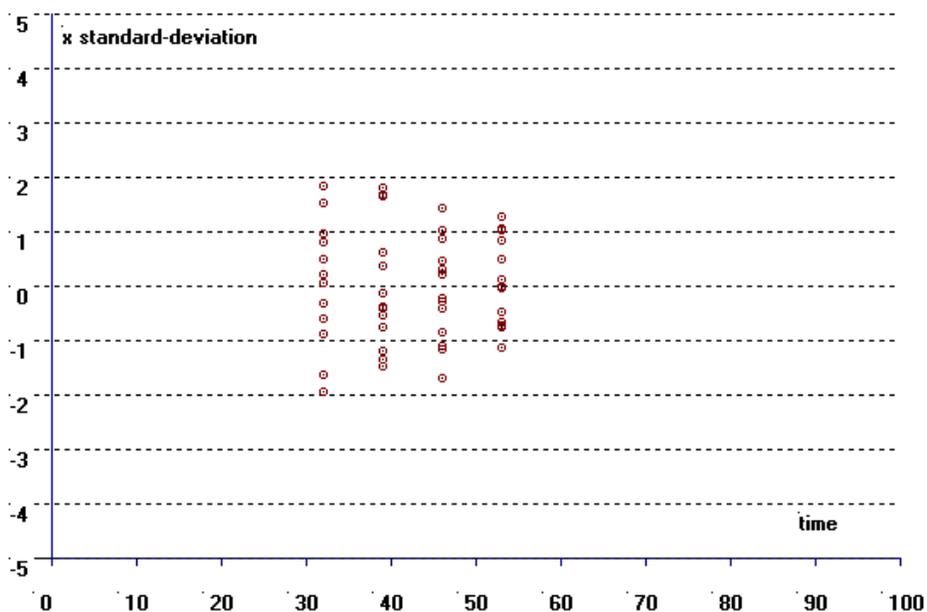


Figura 12. Gráfico de residuales de la curva de depleci3n de Magnadur en Salm3n Coho, condiciones controladas.

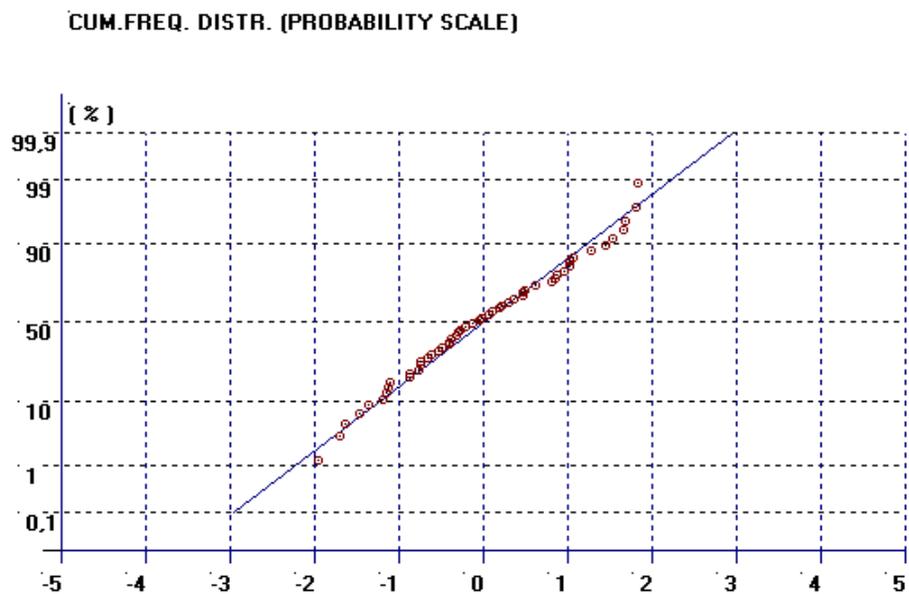


Figura 13. Gráfico de la frecuencia acumulativa de errores de la curva de depleci3n de Magnadur en Salm3n Coho en condiciones controladas.



Para verificar los resultados del gráfico de residuales, se realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para lo que se utilizó el programa Statistica; Shapiro/Wilk 0,9675 ($p = 0,1658$)

5.5.3. Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Terrivet F-200 aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Salmón Coho.

Obtención de curva de depleción en músculo de OTC producto de la inyección i.p. de Terrivet F-200 en Salmón Coho, bajo condiciones controladas.

La curva se realizó graficando el logaritmo natural (Ln) de la concentración de OTC versus los días post administración, para lo cual se utilizó el programa Statistica. Posteriormente, se realizó la revisión de la presencia de outliers en el conjunto de los datos mediante el criterio de dos desviaciones estándar de la media de los residuales. La curva de depleción obtenida se observa en la figura 14, mientras que el detalle de los resultados obtenidos y sus respectivos cromatogramas en el anexo 8.

El tiempo de vida media se calculó dividiendo 0,693 por la pendiente de la curva de depleción, dando un valor para Terrivet de 17 días.

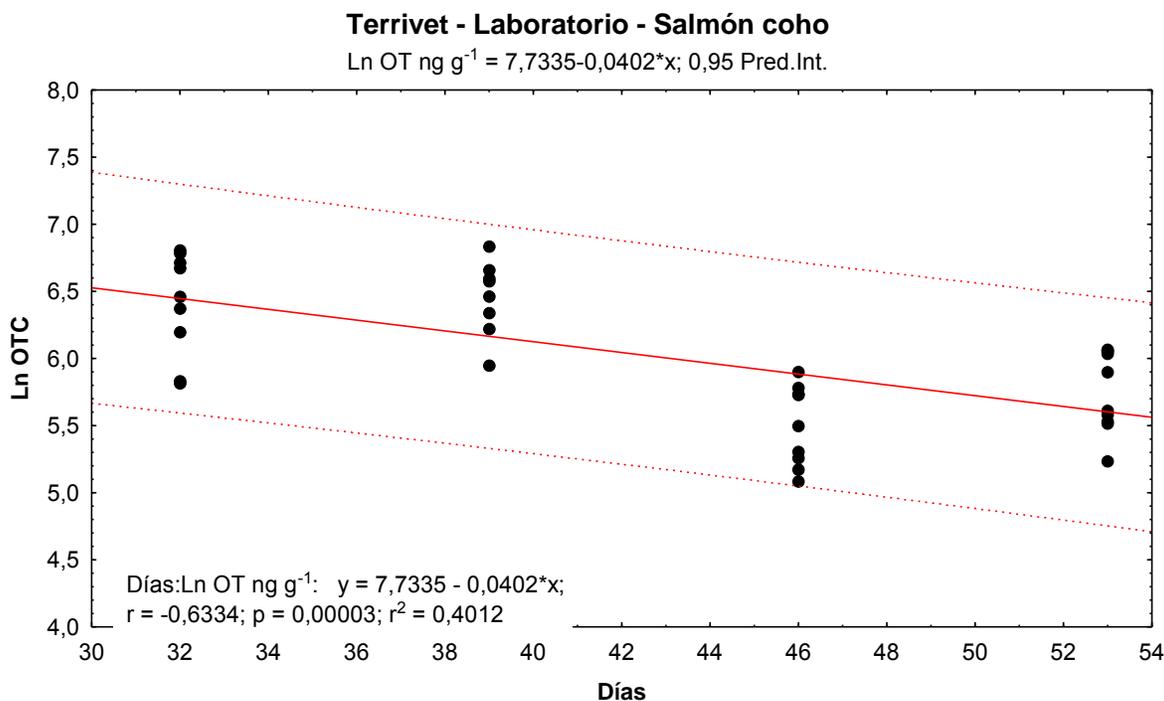


Figura 14. Curva de depleci3n de OTC en Coho, post-administraci3n de Terrivet F-200. de 36 mg de OTC/Kg de P.V.

Utilizando el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”, se calcul3 el periodo de resguardo para un LMR de 100 ppb (Fig 15) y de 10 ppb (Fig 16). Los valores de periodo de resguardo calculado son de 124 d3as para un LMR de 100 ppb, y de 213 d3as para un LMR de 10 ppb. El c3lculo fue realizado con un l3mite de tolerancia superior del 95%, con un 95 % de confianza. Si se toma en cuenta la temperatura promedio durante el ensayo de depleci3n (14,8 +/- 1,6°C), el periodo de resguardo se puede expresar como 1835 ° d3as (LMR=100 ppb) y 3046 ° d3as (LMR=10 ppb).

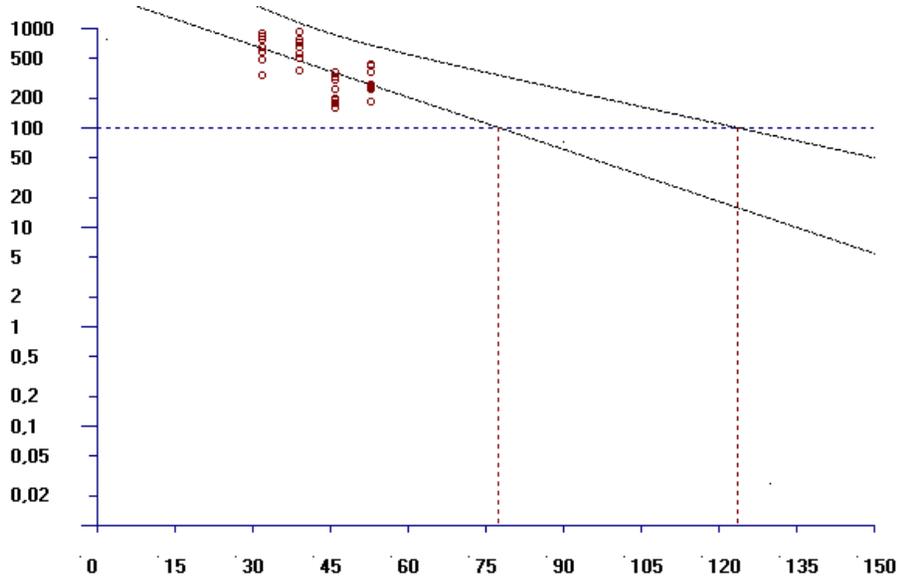


Figura 15. Gráfico de período de resguardo de Terrivet F-200 en Coho, con LMR de 100 ppb.

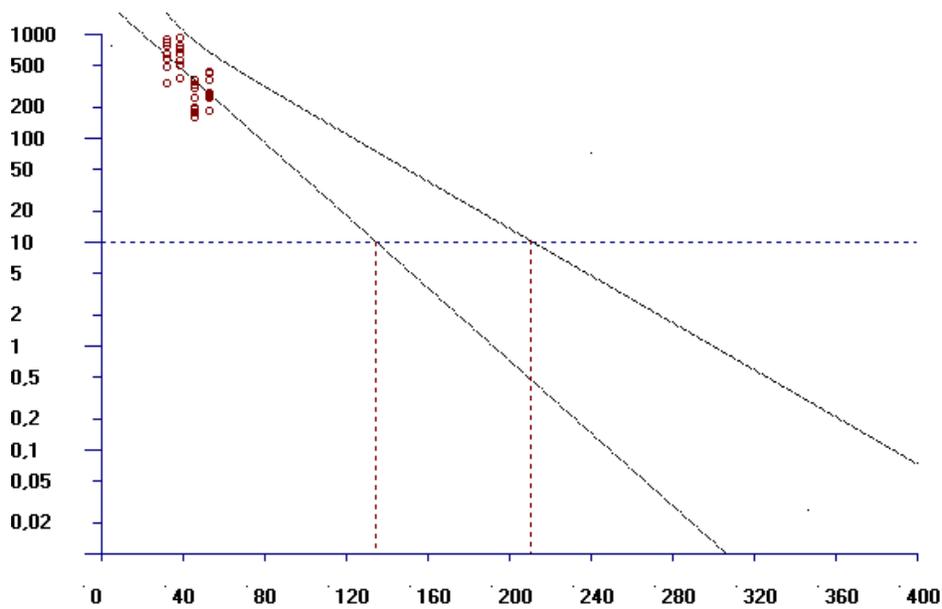


Figura 16. Gráfico de período de resguardo de Terrivet F-200 en Coho, con LMR de 10 ppb.



Para que las curvas de depleci3n sean consideradas v3lidas, es necesario que se cumplan los siguientes supuestos de la regresi3n utilizada:

- homogeneidad de las varianzas
- Linealidad de los datos de Ln vs tiempo
- distribuci3n normal de errores

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utiliz3 el test de Bartlett, a trav3s del software "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4":

Bartlett-test 0,980783742049181 (3) ($p > 0.05$)

Para comprobar la linealidad, basta con la inspecci3n visual de la curva de depleci3n (Fig 14).

Para comprobar la normalidad de errores, con el software "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4" se obtiene el gr3fico de residuales (Fig 17) y el gr3fico de la frecuencia acumulativa de errores (Fig 18).

Para verificar los resultados del gr3fico de residuales, se realiz3 una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para lo que se utiliz3 el programa "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4":

Shapiro/Wilk 0,940709488665926 (36) ($0.10 > p > 0.05$)

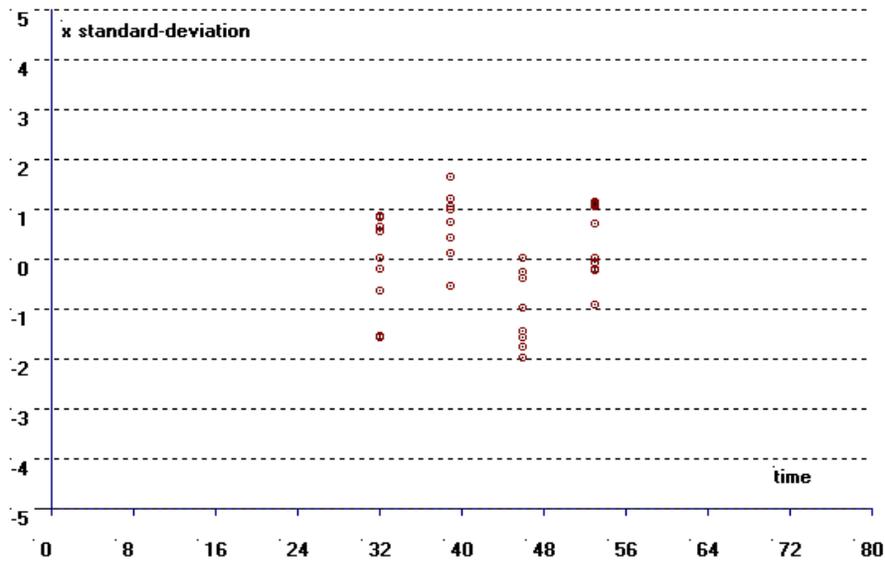


Figura 17. Gráfico de residuales de la curva de depleci3n de Terrivet F-200 en Salm3n Coho, condiciones controladas.

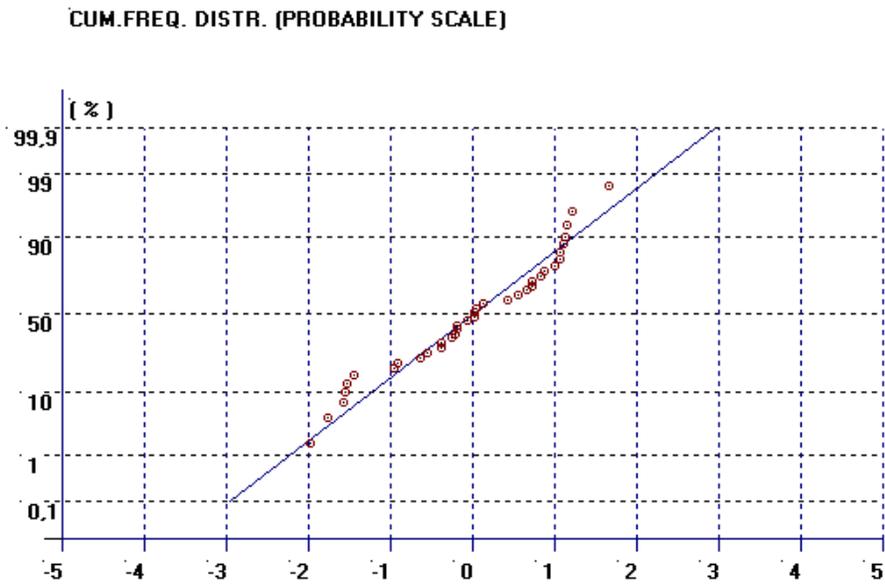


Figura 18. Gráfico de la frecuencia acumulativa de errores de la curva de depleci3n de Terrivet F-200 en Salm3n Coho en condiciones controladas.



5.5.4. Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Liquamicina aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Trucha arcoíris.

Obtención de curva de depleción en músculo de OTC producto de la inyección i.p. de Liquamicina en Trucha Arcoíris, bajo condiciones controladas.

La curva se realizó graficando el logaritmo natural (Ln) de la concentración de OTC versus los días post administración, para lo cual se utilizó el programa Statistica. Posteriormente, se realizó la revisión de la presencia de outliers en el conjunto de los datos mediante el criterio de dos desviaciones estándar de la media de los residuales. La curva de depleción obtenida se observa en la figura 19, mientras que en el anexo 8 se observan los resultados obtenidos y sus respectivos cromatogramas.

El tiempo de vida media se calculó dividiendo 0,693 por la pendiente de la curva de depleción, dando un valor para Liquamicina de 26 días.



Liquamicina - Laboratorio - Trucha arcoiris

$$\text{Ln OT} = 6,6836 - 0,0271 * x; 0,95 \text{ Pred.Int.}$$

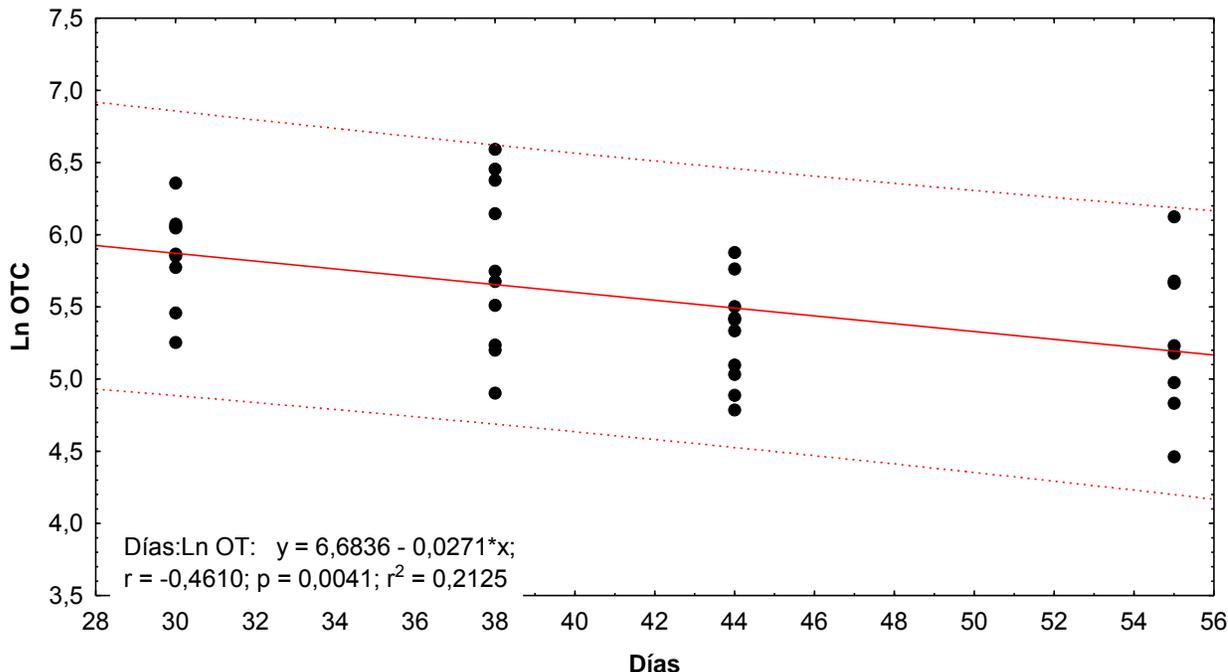


Figura 19. Curva de depleci3n de OTC en Trucha arcoiris, post-administraci3n de Liquamicina de 36 mg de OTC/Kg de P.V.

Utilizando el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”, se calcul3 el periodo de resguardo para un LMR de 100 ppb (Fig 20) y de 10 ppb (Fig 21). Los valores de periodo de resguardo calculado son de 187 d3as para un LMR de 100 ppb, y de 376 d3as para un LMR de 10 ppb. El c3lculo fue realizado con un l3mite de tolerancia superior del 95%, con un 95 % de confianza. Si se toma en cuenta la temperatura promedio durante el ensayo de depleci3n (12,3 +/- 0,4°C), el per3odo de resguardo se puede expresar como 2300 ° d3as (LMR=100 ppb) y 4625 ° d3as (LMR=10 ppb).

Para considerar v3lidas las curvas de depleci3n obtenidas, es necesario que se cumplan los siguientes supuestos de la regresi3n utilizada:

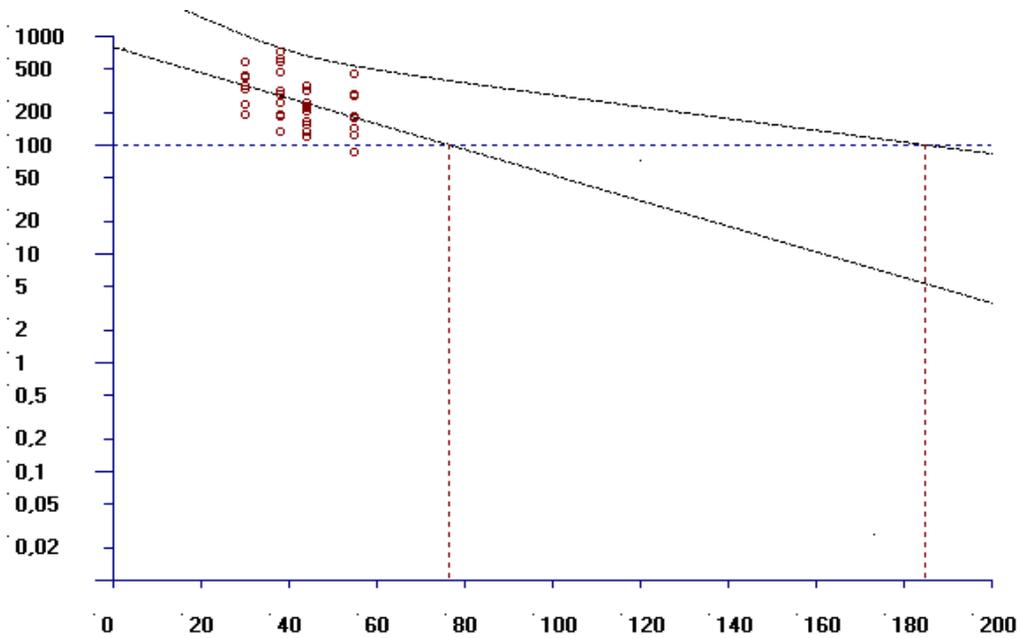


Figura 20. Gráfico de período de resguardo de Liquamicina en Trucha arcoíris, con LMR de 100 ppb.

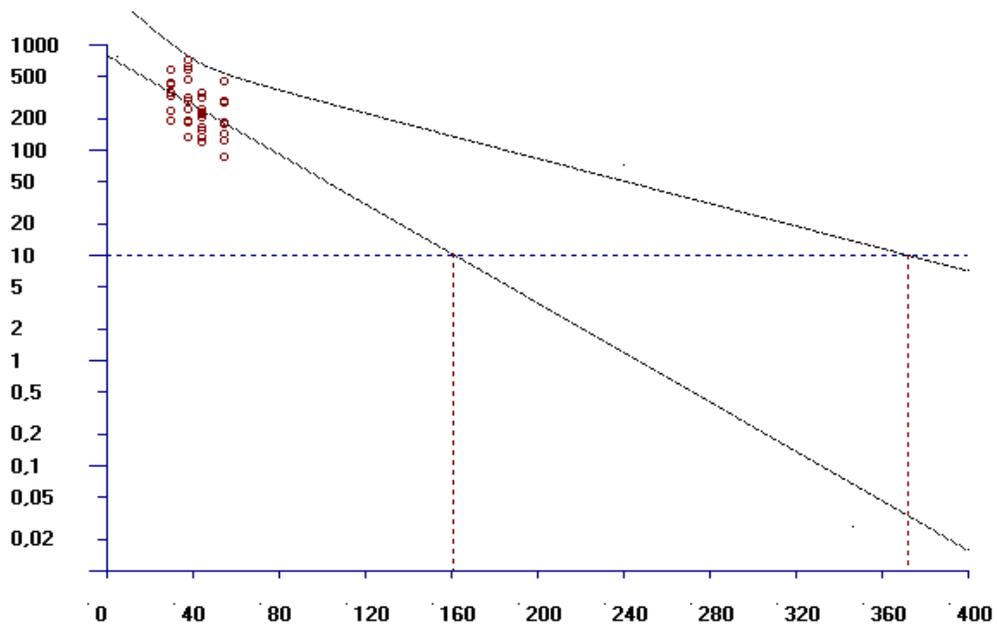


Figura 21. Gráfico de período de resguardo de Liquamicina en Trucha arcoíris, con LMR de 10 ppb.



- homogeneidad de las varianzas
- Linealidad de los datos de Ln vs tiempo
- distribuci3n normal de errores

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utiliz3 el test de Bartlett, a trav3s del software "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4":

Bartlett-test 3,61384989774327 (3) ($p > 0.05$)

Para comprobar la linealidad, basta con la inspecci3n visual de la curva de depleci3n (Fig 19).

Para comprobar la normalidad de errores, con el software "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4" se obtiene el gr3fico de residuales (Fig 22) y el gr3fico de la frecuencia acumulativa de errores (Fig 23).

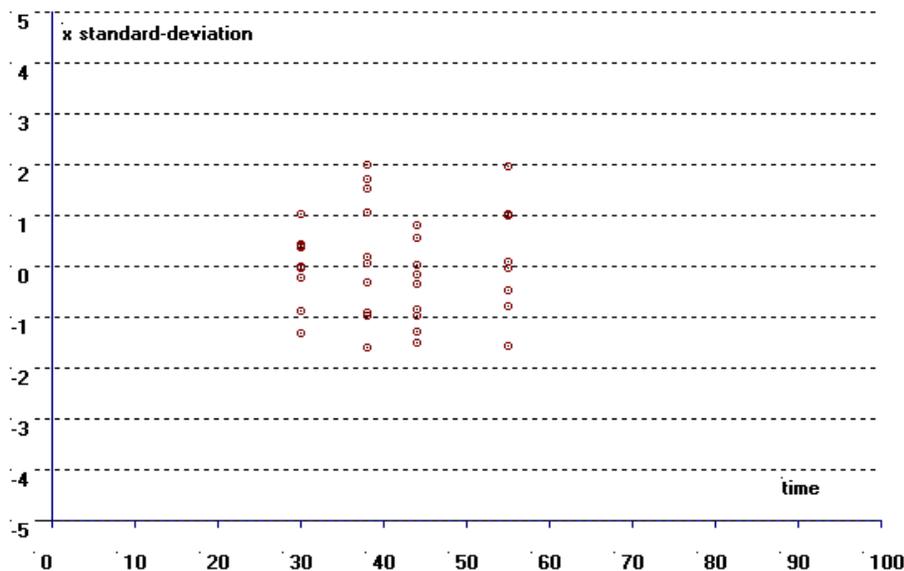


Figura 22. Gr3fico de residuales de la curva de depleci3n de Liquamicina en Trucha arco3ris, condiciones controladas.



Para verificar los resultados del gr1fico de residuales, se realiz3 una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para lo que se utiliz3 el programa "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4":

Shapiro/Wilk 0,959278041113244 (37) ($p > 0.10$)

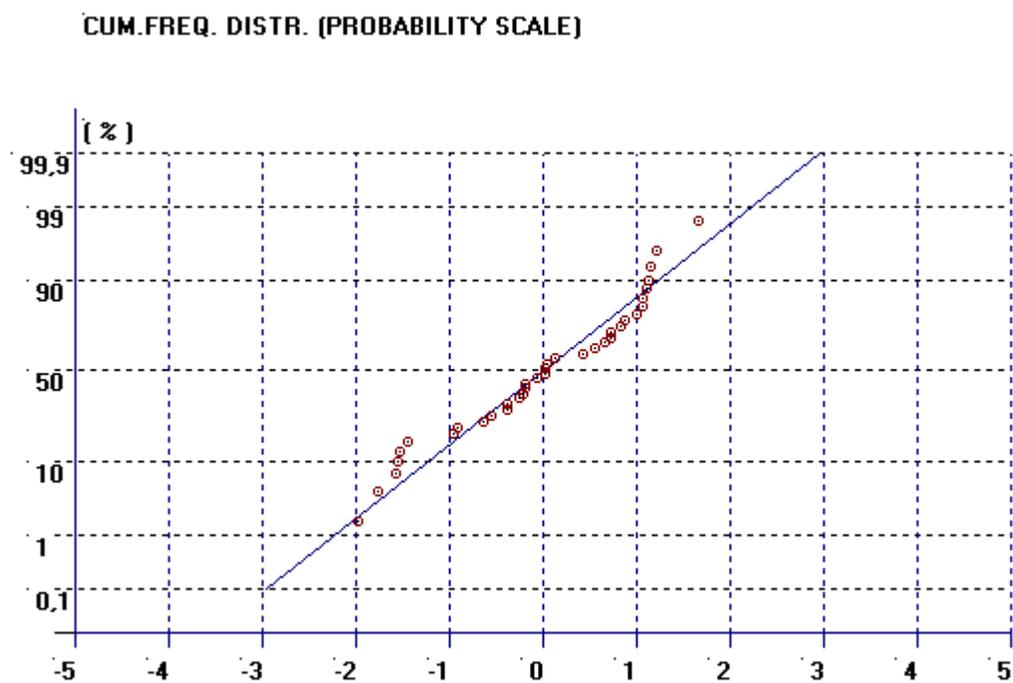


Figura 23. Gr1fico de la frecuencia acumulativa de errores de la curva de depleci3n de Liquamicina en Trucha arcoir3s en condiciones controladas



5.5.5. Desarrollo de estudio de depleci3n en m3sculo del producto comercial Magnadur aplicado v3a intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Trucha arco3ris.

Obtenci3n de curva de depleci3n en m3sculo de OTC producto de la inyecci3n i.p. de Magnadur en Trucha Arco3ris, bajo condiciones controladas.

La curva se realiz3 graficando el logaritmo natural (Ln) de la concentraci3n de OTC versus los d3as post administraci3n, para lo cual se utiliz3 el programa Statistica. Posteriormente, se realiz3 la revisi3n de la presencia de outliers en el conjunto de los datos mediante el criterio de dos desviaciones est3ndar de la media de los residuales. La curva de depleci3n obtenida se observa en la figura 24, en el anexo 8 se observan el detalle de los resultados obtenidos y sus respectivos cromatogramas.

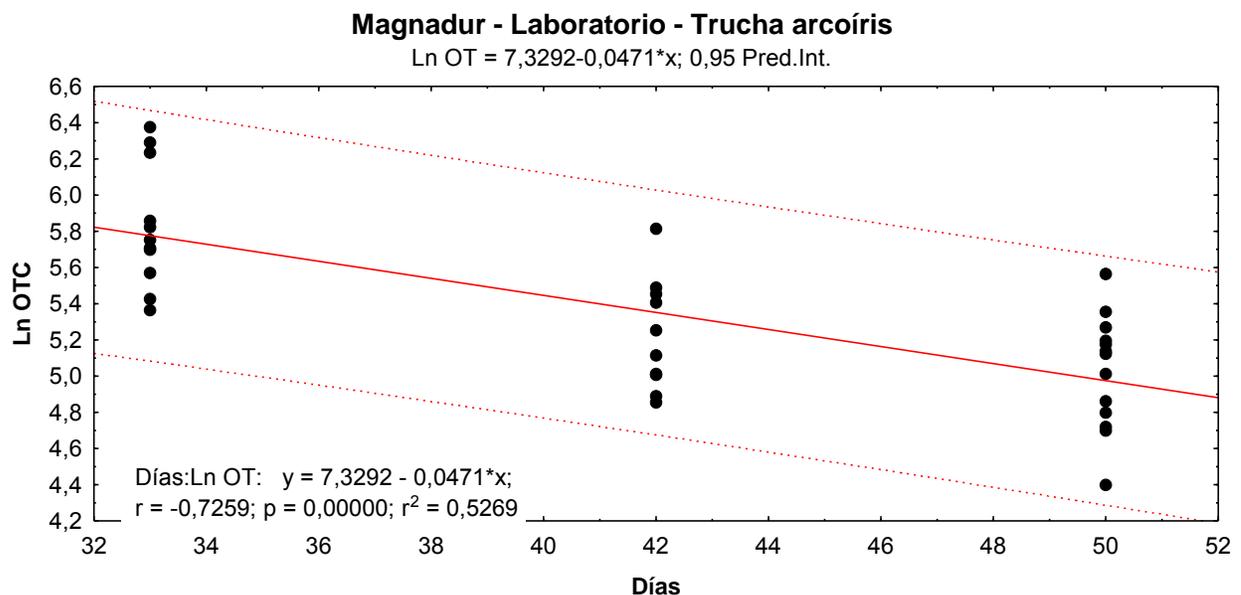


Figura 24. Curva de depleci3n de OTC en Trucha arco3ris, post-administraci3n de Magnadur. de 37 mg de OTC/Kg de P.V.



El tiempo de vida media se calculó dividiendo 0,693 por la pendiente de la curva de depleción, dando un valor para Liquamicina de 15 días.

Utilizando el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”, se calculó el periodo de resguardo para un LMR de 100 ppb (Fig 25) y de 10 ppb (Fig 26). Los valores de periodo de resguardo calculado son de 82 días para un LMR de 100 ppb, y de 149 días para un LMR de 10 ppb. El cálculo fue realizado con un límite de tolerancia superior del 95%, con un 95 % de confianza. Si se toma en cuenta la temperatura promedio durante el ensayo de depleción (12,3 +/- 0,4°C), el período de resguardo se puede expresar como 1009 ° días (LMR=100 ppb) y 1833 ° días (LMR=10 ppb).

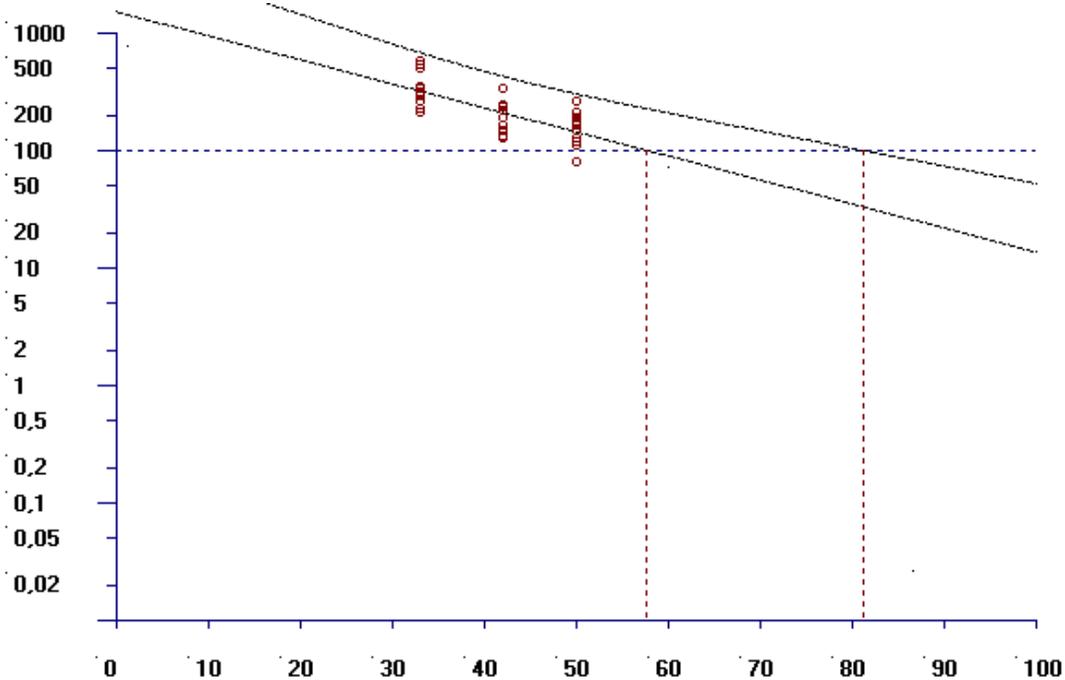


Figura 25. Gráfico de período de resguardo de Magnadur en Trucha arcoíris, con LMR de 100 ppb.



Para considerar v3lidas las curvas de depleci3n obtenidas, es necesario que se cumplan los siguientes supuestos de la regresi3n utilizada:

- homogeneidad de las varianzas
- Linealidad de los datos de Ln vs tiempo
- distribuci3n normal de errores

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utiliz3 el test de Bartlett, a trav3s del software "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4":

Bartlett-test 9,91005760024309E-02 (2)(p> 0.05)

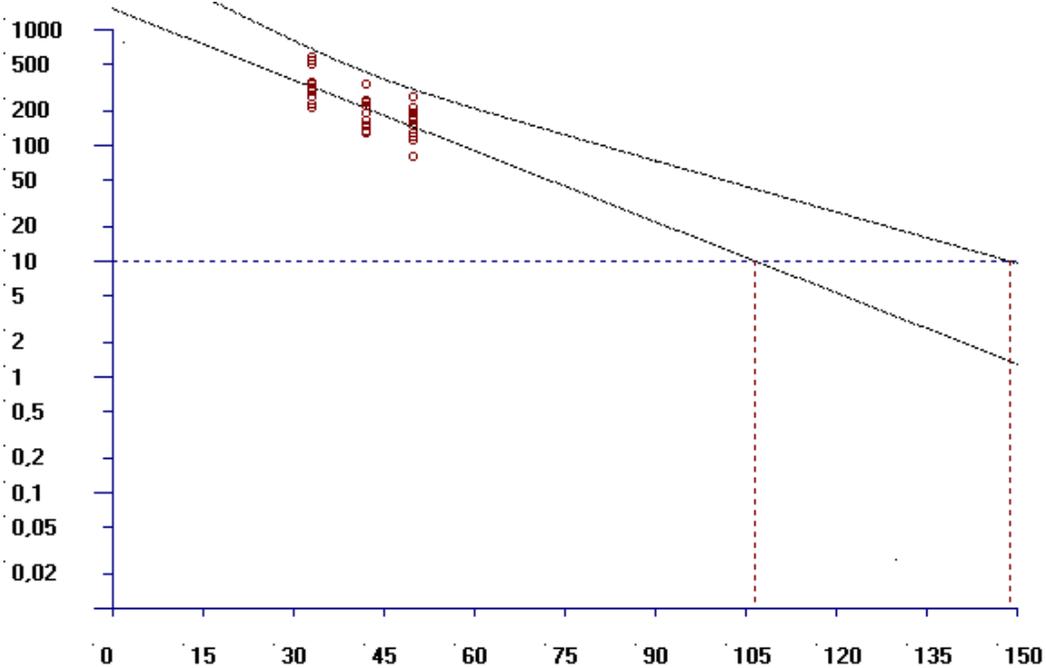


Figura 26. Gr3fico de per3odo de resguardo de Magnadur en Trucha arcoiris, con LMR de 10 ppb.



Para comprobar la linealidad, basta con la inspecci3n visual de la curva de depleci3n (Fig 24).

Para comprobar la normalidad de errores, con el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” se obtiene el gr3fico de residuales (Fig 27) y el gr3fico de la frecuencia acumulativa de errores (Fig 28).

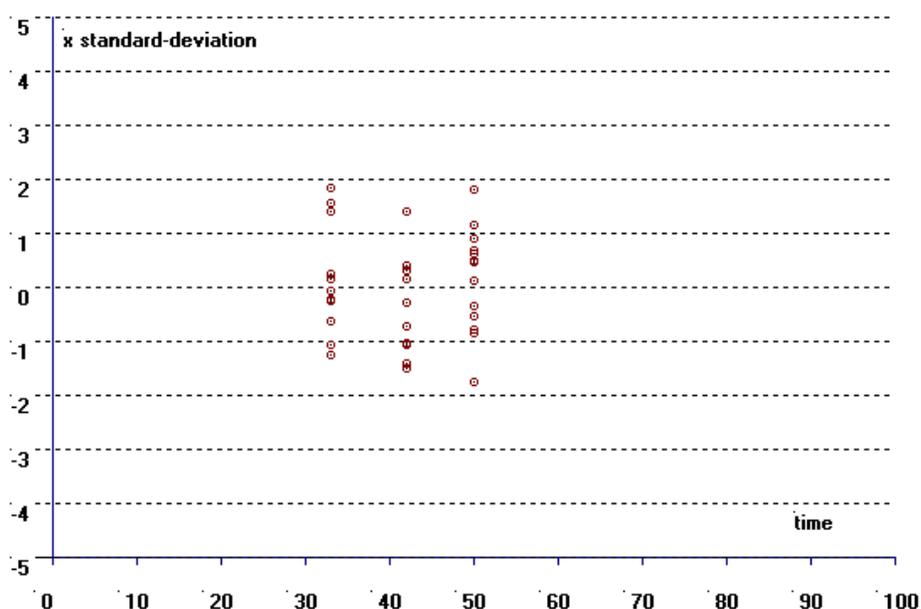


Figura 27. Gr3fico de residuales de la curva de depleci3n de Magnadur en Trucha arco3ris, condiciones controladas

Para verificar los resultados del gr3fico de residuales, se realiz3 una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para lo que se utiliz3 el programa “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”:

Shapiro/Wilk 0,966960142193571 (34) ($p > 0.10$)

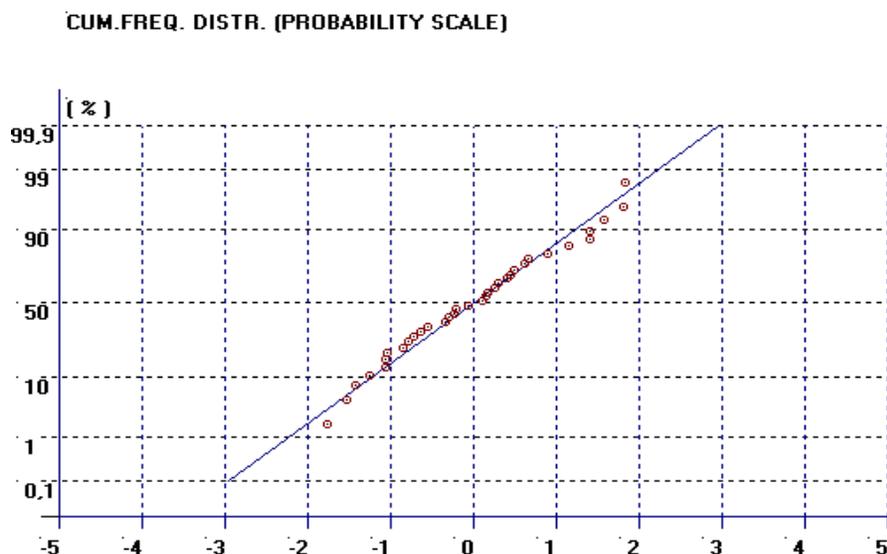


Figura 28. Gráfico de la frecuencia acumulativa de errores de la curva de depleci3n de Magnadur en Trucha arcoiris en condiciones controladas

5.5.6. Desarrollo de estudio de depleci3n en m3sculo del producto comercial Terrivet F-200 aplicado v3a intraperitoneal, bajo condiciones controladas en Trucha arco3ris.

Obtenci3n de curva de depleci3n en m3sculo de OTC producto de la inyecci3n i.p. de Terrivet F-200 en Trucha Arco3ris, bajo condiciones controladas.

La curva se realiz3 graficando el logaritmo natural (Ln) de la concentraci3n de OTC versus los d3as post administraci3n, para lo cual se utiliz3 el programa Statistica. Posteriormente, se realiz3 la revisi3n de la presencia de outliers en el conjunto de los datos mediante el criterio de dos desviaciones est3ndar de la media de los residuales. La curva de depleci3n obtenida se observa en la figura 29, mientras que en el anexo 8 se observan los resultados obtenidos y sus respectivos cromatogramas.

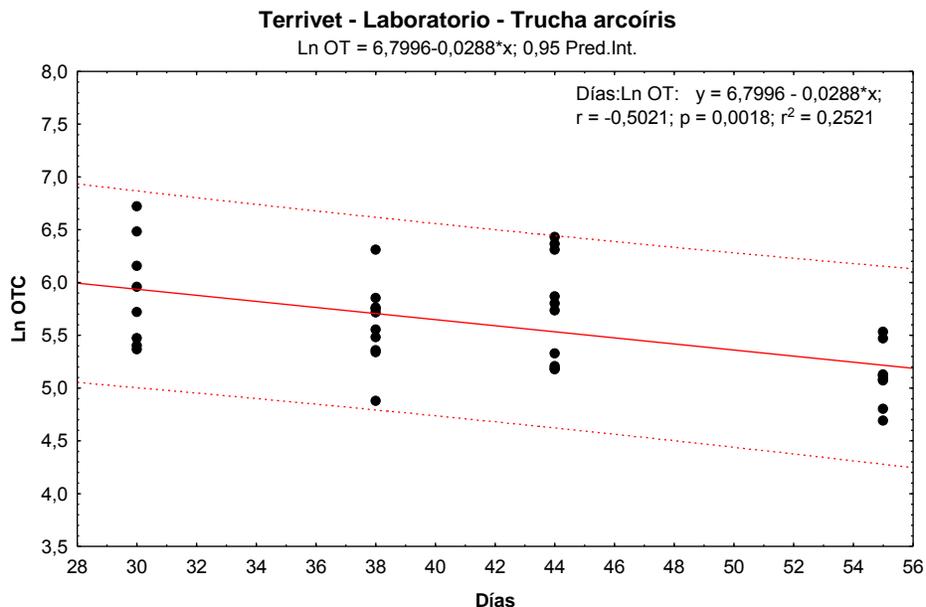


Figura 29. Curva de depleci3n de OTC en Trucha arcoiris, post-administraci3n de Terrivet. de 32 mg de OTC/Kg de P.V.

El tiempo de vida media se calcul3 dividiendo 0,693 por la pendiente de la curva de depleci3n, dando un valor para Liquamicina de 24 d3as.

Utilizando el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”, se calcul3 el periodo de resguardo para un LMR de 100 ppb (Fig 30) y de 10 ppb (Fig 31). Los valores de periodo de resguardo calculado son de 165 d3as para un LMR de 100 ppb, y de 324 d3as para un LMR de 10 ppb. El c3lculo fue realizado con un l3mite de tolerancia superior del 95%, con un 95 % de confianza. Si se toma en cuenta la temperatura promedio durante el ensayo de depleci3n (12,3 +/- 0,4°C), el periodo de resguardo se puede expresar como 2030 ° d3as (LMR=100 ppb) y 3985 ° d3as (LMR=10 ppb).

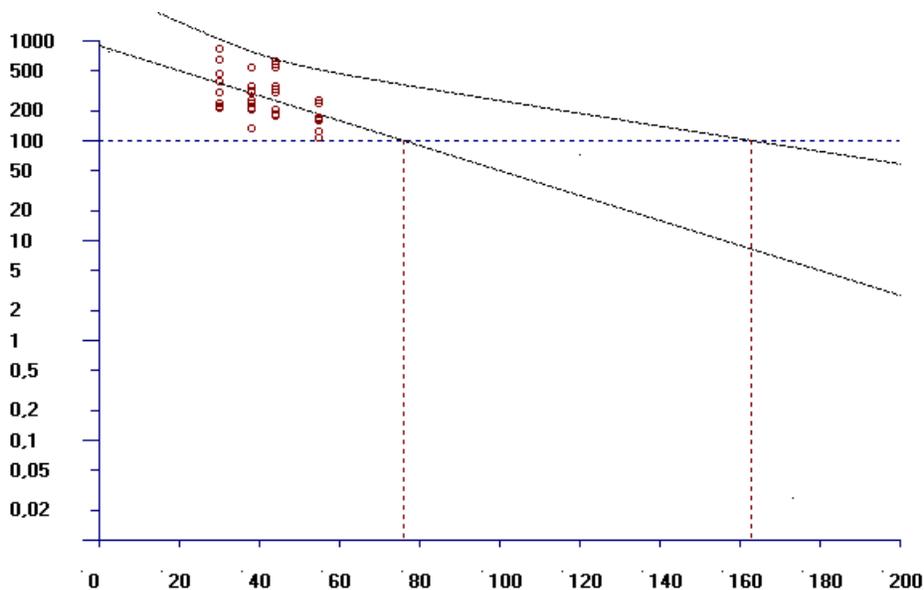


Figura 30. Gráfico de período de resguardo de Terrivet en Trucha arcoíris, con LMR de 100 ppb.

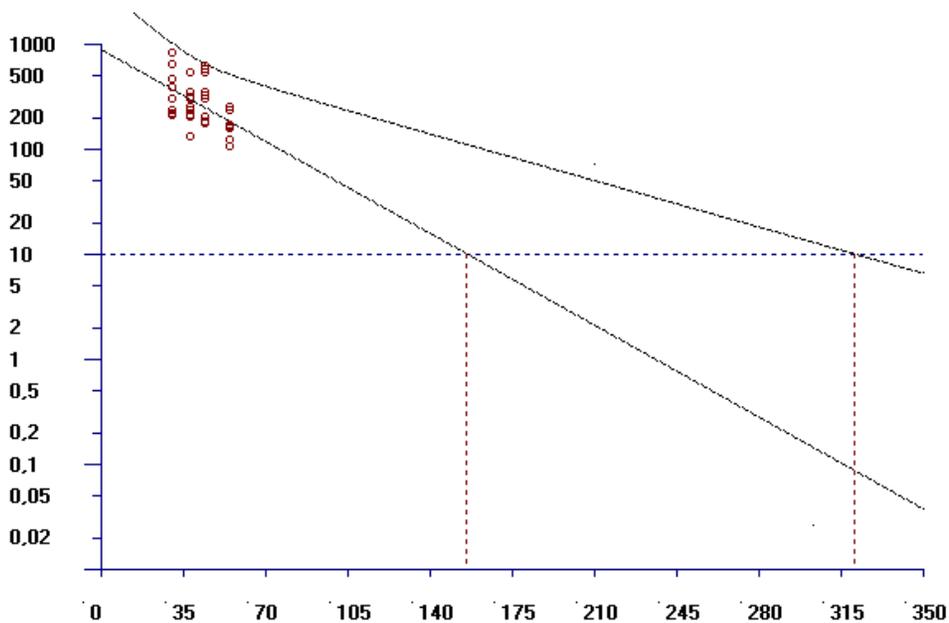


Figura 31. Gráfico de período de resguardo de Terrivet en Trucha arcoíris, con LMR de 10 ppb.



Para considerar v3lidas las curvas de depleci3n obtenidas, es necesario que se cumplan los siguientes supuestos de la regresi3n utilizada:

- homogeneidad de las varianzas
- Linealidad de los datos de Ln vs tiempo
- distribuci3n normal de errores

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utiliz3 el test de Bartlett, a trav3s del software "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4":

Bartlett-test 2,84722554365346 (3) ($p > 0.05$)

Para comprobar la linealidad, basta con la inspecci3n visual de la curva de depleci3n (Fig 29).

Para comprobar la normalidad de errores, con el software "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4" se obtiene el gr3fico de residuales (Fig 32) y el gr3fico de la frecuencia acumulativa de errores (Fig 33).

Para verificar los resultados del gr3fico de residuales, se realiz3 una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para lo que se utiliz3 el programa "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4":

Shapiro/Wilk 0,955130613108262 (36) ($p > 0.10$)

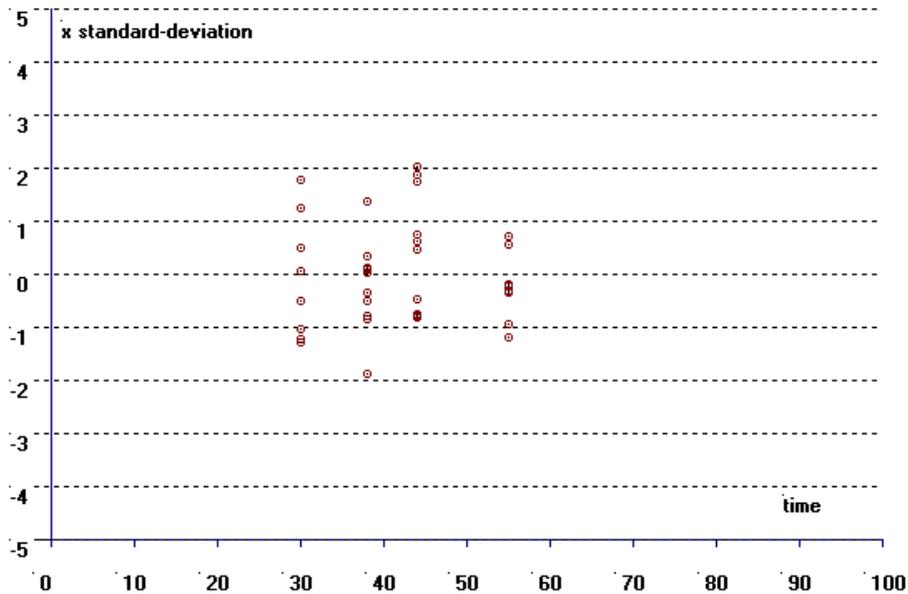


Figura 32. Gráfico de residuales de la curva de depleci3n de Terrivet en Trucha arcoíris, condiciones controladas.

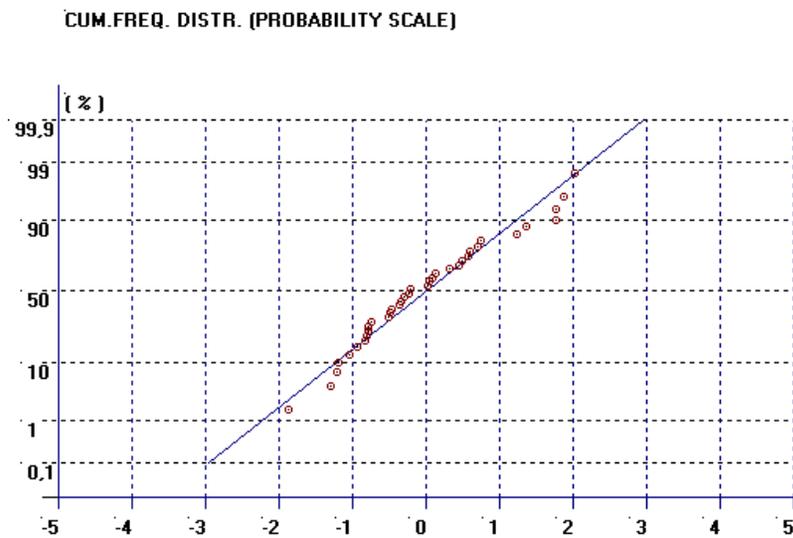


Figura 33. Gráfico de la frecuencia acumulativa de errores de la curva de depleci3n de Terrivet en Trucha arcoíris en condiciones controladas.



5.5.7. Desarrollo de estudio de depleci3n en m3sculo del producto comercial Liquamicina aplicado v3a intraperitoneal, bajo condiciones controladas en *Salmo salar*.

Obtenci3n de curva de depleci3n en m3sculo de OTC producto de la inyecci3n i.p. de Liquamicina en *Salmo salar*, bajo condiciones controladas.

La curva se realiz3 graficando el logaritmo natural (Ln) de la concentraci3n de OTC versus los d3as post administraci3n, para lo que se utiliz3 el programa Statistica. Posteriormente, se realiz3 la revisi3n de la presencia de outliers en el conjunto de los datos mediante el criterio de dos desviaciones est3ndar de la media de los residuales. La curva de depleci3n obtenida se observa en la figura 34. En el anexo 8 se observan los resultados obtenidos y sus respectivos cromatogramas.

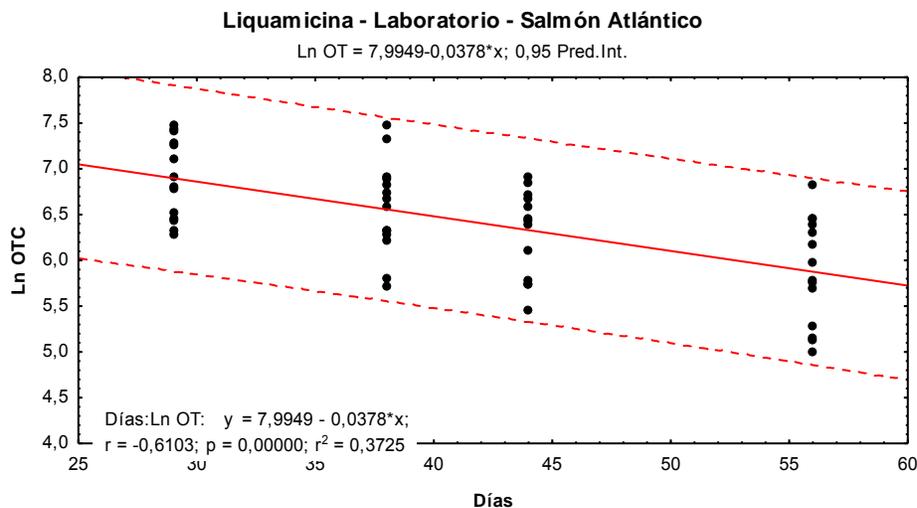


Figura 34. Curva de depleci3n de OTC en *Salmo salar*, post-administraci3n de Liquamicina de 28 mg de OTC/Kg de P.V.



El tiempo de vida media se calculó dividiendo 0,693 por la pendiente de la curva de depleción, dando un valor para Liquamicina de 18 días.

Utilizando el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”, se calculó el periodo de resguardo para un LMR de 100 ppb (Fig 35) y de 10 ppb (Fig 36). Los valores de periodo de resguardo calculado son de 142 días para un LMR de 100 ppb, y de 229 días para un LMR de 10 ppb. El cálculo fue realizado con un límite de tolerancia superior del 95%, con un 95 % de confianza. Si se toma en cuenta la temperatura promedio durante el ensayo de depleción (12,3 +/- 0,4°C), el período de resguardo se puede expresar como 1747 ° días (LMR=100 ppb) y 2817 ° días (LMR=10 ppb).

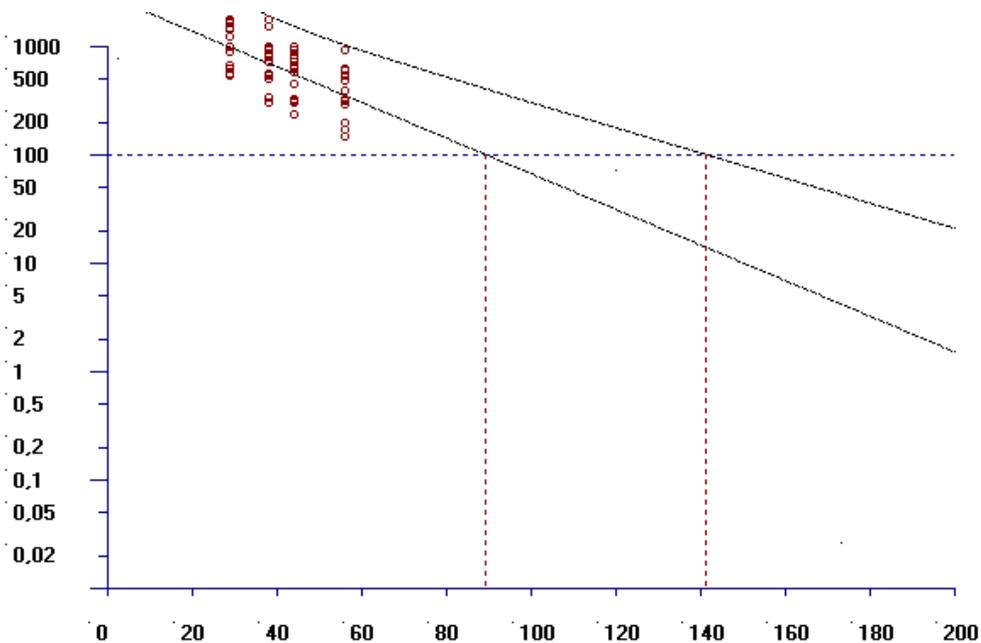


Figura 35. Gráfico de período de resguardo de Liguamicina en Salmo salar, con LMR de 100 ppb.

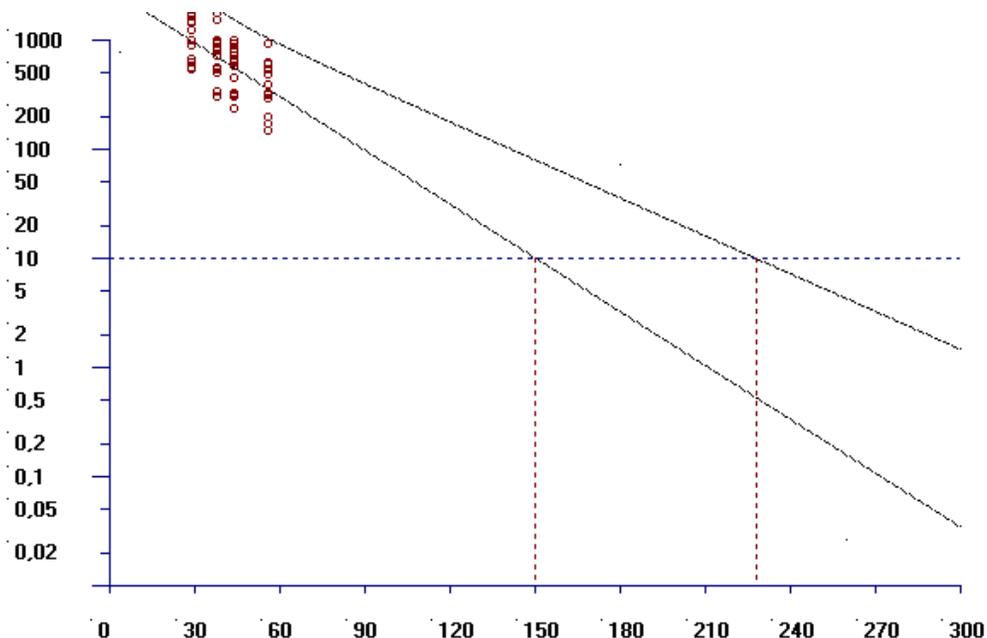


Figura 36. Gráfico de período de resguardo de Liquamicina en Salmo salar, con LMR de 10 ppb.

Para considerar válidas las curvas de depleción obtenidas, es necesario que se cumplan los siguientes supuestos de la regresión utilizada:

- homogeneidad de las varianzas
- Linealidad de los datos de Ln vs tiempo
- distribución normal de errores

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utilizó el test de Bartlett, a través del software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”:

Bartlett-test 1,05475367804654 (3) ($p > 0.05$)



Para comprobar la linealidad, basta con la inspecci3n visual de la curva de deplesi3n (Fig 35).

Para comprobar la normalidad de errores, con el software "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4" se obtiene el gr3fico de residuales (Fig 37) y el gr3fico de la frecuencia acumulativa de errores (Fig 38)

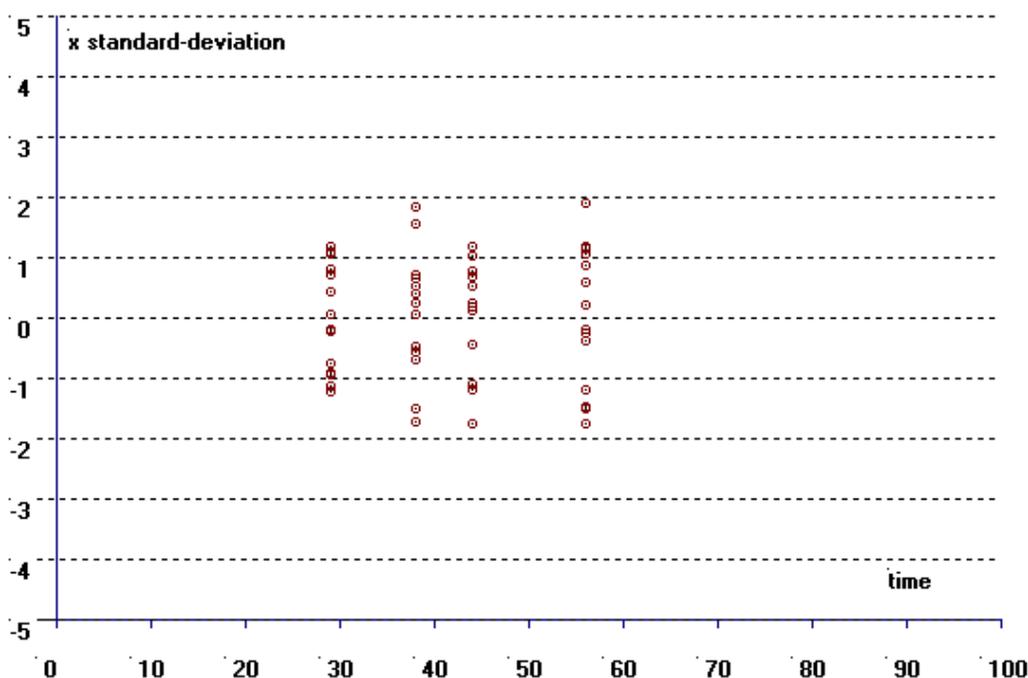


Figura 37. Gr3fico de residuales de la curva de deplesi3n de Liquamicina en Salmo salar, condiciones controladas.

Para verificar los resultados del gr3fico de residuales, se realiz3 una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para lo que se utiliz3 el programa Statistica

Shapiro/Wilk 0,9693 (p =0,1712)

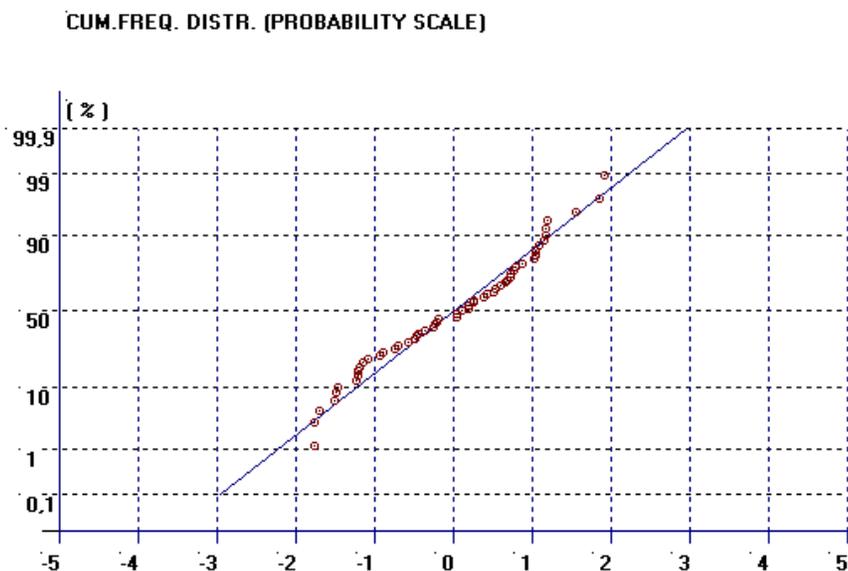


Figura 38. Gráfico de la frecuencia acumulativa de errores de la curva de depleción de Liquamicina en *Salmo salar* en condiciones controladas

5.5.8. Desarrollo de estudio de depleción en músculo del producto comercial Magnadur aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones controladas en *Salmo salar*.

Obtención de curva de depleción en músculo de OTC producto de la inyección i.p. de Magnadur en *Salmo salar*, bajo condiciones controladas.

La curva se realizó graficando el logaritmo natural (Ln) de la concentración de OTC versus los días post administración, para lo que se utilizó el programa Statistica. Posteriormente, se realizó la revisión de la presencia de outliers en el conjunto de los datos mediante el criterio de dos desviaciones estándar de la media de los residuales. La curva de depleción obtenida se observa en la figura



39, mientras que en el anexo 8 se observan los resultados obtenidos y en el anexo 7, sus respectivos cromatogramas.

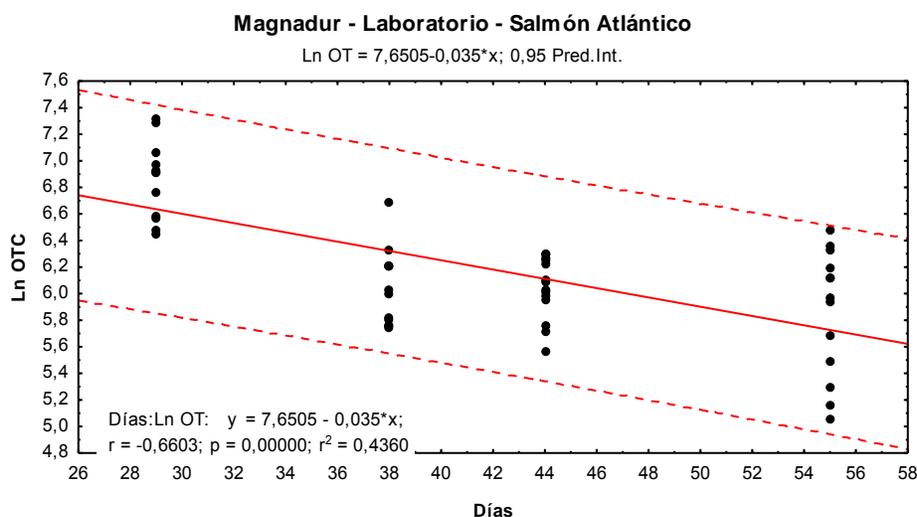


Figura 39. Curva de depleción de OTC en *Salmo salar*, post-administración de Magnadur. de 25 mg de OTC/Kg de P.V.

El tiempo de vida media se calculó dividiendo 0,693 por la pendiente de la curva de depleción, dando un valor para Liquamicina de 20 días.

Utilizando el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”, se calculó el periodo de resguardo para un LMR de 100 ppb (Fig 40) y de 10 ppb (Fig 341). Los valores de periodo de resguardo calculado son de 130 días para un LMR de 100 ppb, y de 220 días para un LMR de 10 ppb. El cálculo fue realizado con un límite de tolerancia superior del 95%, con un 95 % de confianza. Si se toma en cuenta la temperatura promedio durante el ensayo de depleción (12,3 +/- 0,4°C), el período de resguardo se puede expresar como 1599 ° días (LMR=100 ppb) y 2707 ° días (LMR=10 ppb).

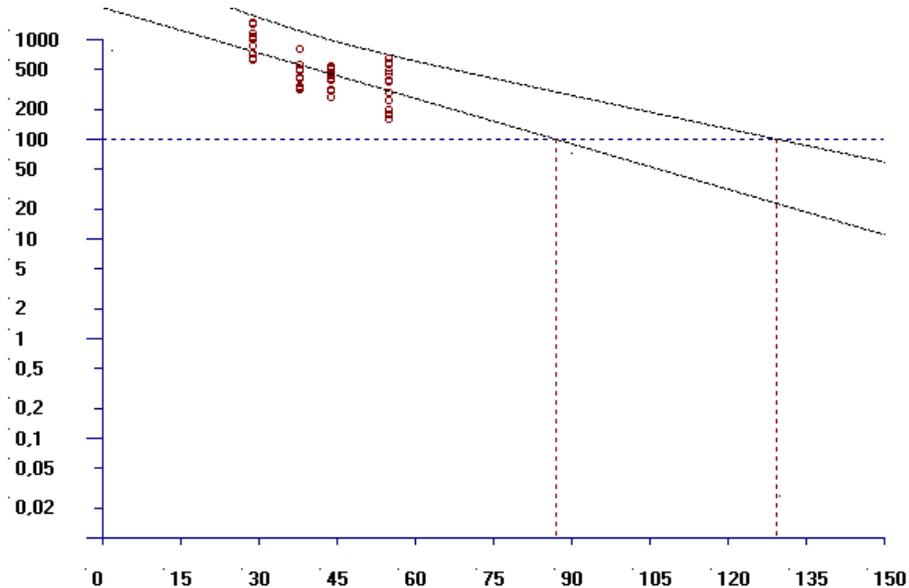


Figura 40. Gráfico de período de resguardo de Magnadur en *Salmo salar*, con LMR de 100 ppb.

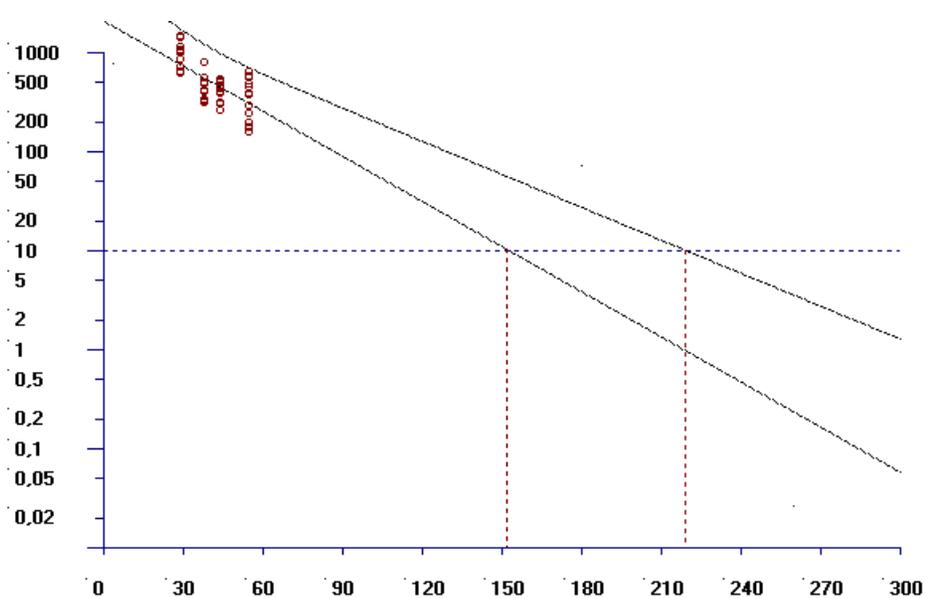


Figura 41. Gráfico de período de resguardo de Magnadur en *Salmo salar*, con LMR de 10 ppb.



Para considerar v3lidas las curvas de depleci3n obtenidas, es necesario que se cumplan los siguientes supuestos de la regresi3n utilizada:

- homogeneidad de las varianzas
- Linealidad de los datos de Ln vs tiempo
- distribuci3n normal de errores

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utiliz3 el test de Bartlett, a trav3s del software "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4":

Bartlett-test 7,23586481897198 (3)(p> 0.05)

Para comprobar la linealidad, basta con la inspecci3n visual de la curva de depleci3n (Fig 39).

Para comprobar la normalidad de errores, con el software "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4" se obtiene el gr3fico de residuales (Fig 42) y el gr3fico de la frecuencia acumulativa de errores (Fig 43)

Para verificar los resultados del gr3fico de residuales, se realiz3 una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para lo que se utiliz3 el programa Statistica

Shapiro/Wilk 0,9814 (p =0,6002)

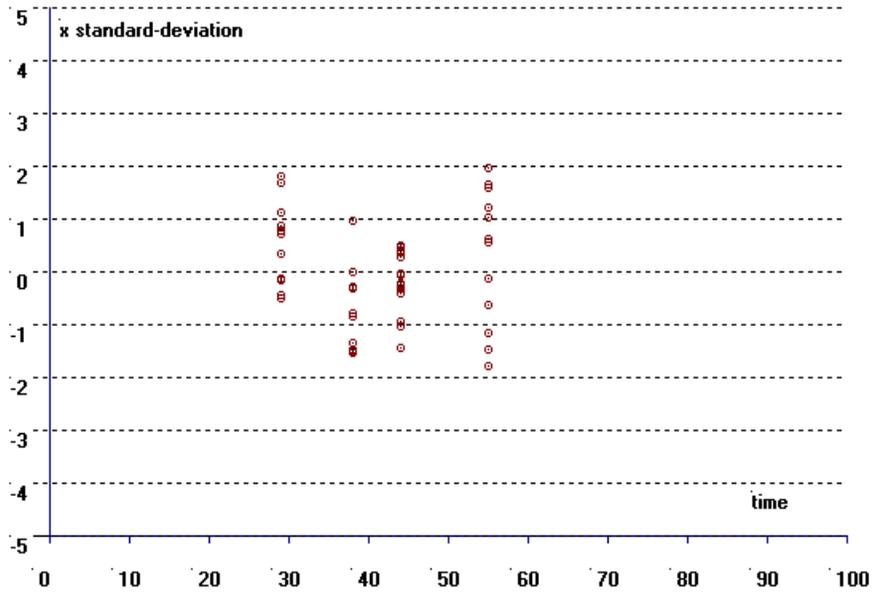


Figura 42. Gráfico de residuos de la curva de depleci3n de Magnadur en *Salmo salar*, condiciones controladas

CUM.FREQ. DISTR. (PROBABILITY SCALE)

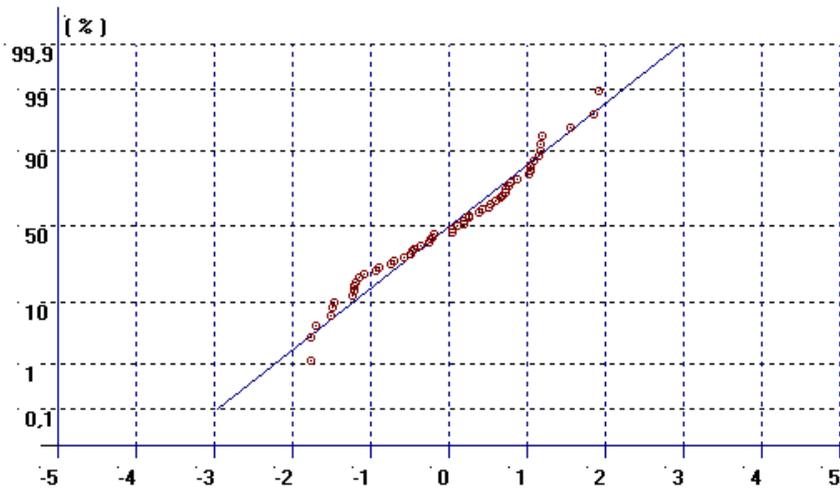


Figura 43. Gráfico de la frecuencia acumulativa de errores de la curva de depleci3n de Magnadur en *Salmo salar* en condiciones controladas.



5.5.9. Desarrollo de estudio de depleci3n en m3sculo del producto comercial Terrivet F-200 aplicado v3a intraperitoneal, bajo condiciones controladas en *Salmo salar*.

Obtenci3n de curva de depleci3n en m3sculo de OTC producto de la inyecci3n i.p. de Terrivet F-200 en *Salmo salar*, bajo condiciones controladas.

La curva se realiz3 graficando el logaritmo natural (Ln) de la concentraci3n de OTC versus los d3as post administraci3n, para lo que se utiliz3 el programa Statistica. Posteriormente, se realiz3 la revisi3n de la presencia de outliers en el conjunto de los datos mediante el criterio de dos desviaciones est3ndar de la media de los residuales. La curva de depleci3n obtenida se observa en la figura 44, mientras que en el anexo 8 se observan los resultados obtenidos y sus respectivos cromatogramas.

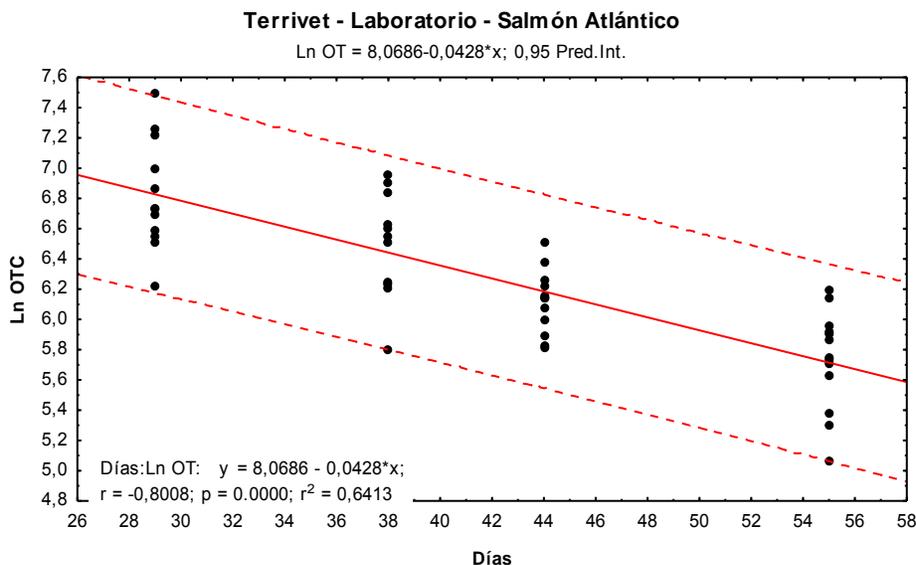


Figura 44. Curva de depleci3n de OTC en *Salmo salar*, post-administraci3n de Terrivet. de 26 mg de OTC/Kg de P.V.



El tiempo de vida media se calculó dividiendo 0,693 por la pendiente de la curva de depleción, dando un valor para Liquamicina de 16 días.

Utilizando el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”, se calculó el periodo de resguardo para un LMR de 100 ppb (Fig 45) y de 10 ppb (Fig 46). Los valores de periodo de resguardo calculado son de 114 días para un LMR de 100 ppb, y de 186 días para un LMR de 10 ppb. El cálculo fue realizado con un límite de tolerancia superior del 95%, con un 95 % de confianza. Si se toma en cuenta la temperatura promedio durante el ensayo de depleción (12,3 +/- 0,4°C), el período de resguardo se puede expresar como 1402 ° días (LMR=100 ppb) y 2288 ° días (LMR=10 ppb).

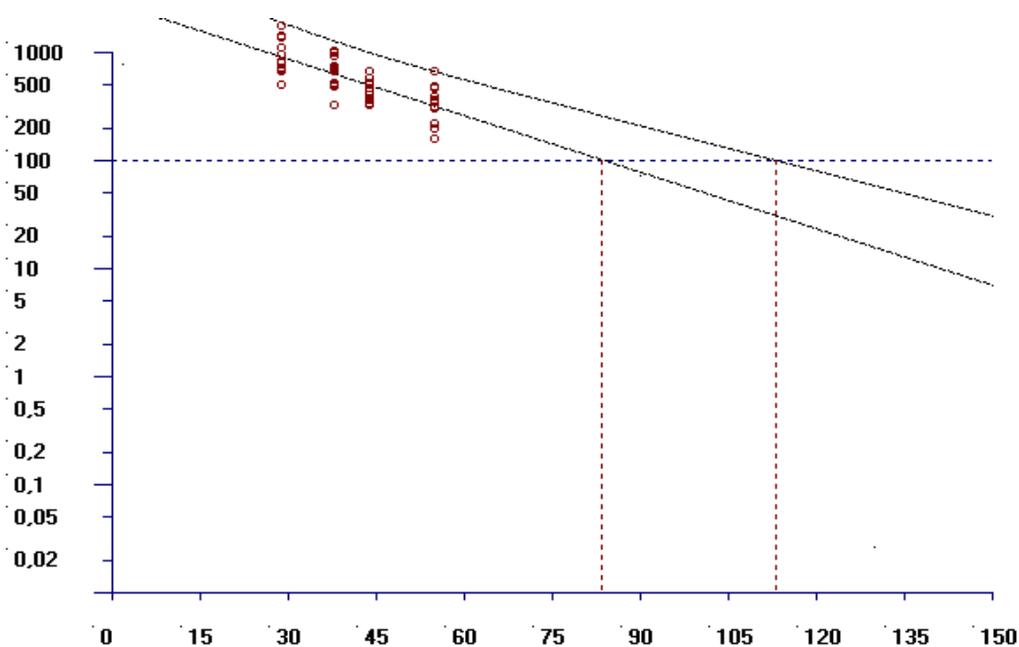


Figura 45. Gráfico de período de resguardo de Terrivet en Salmo salar, con LMR de 100 ppb.

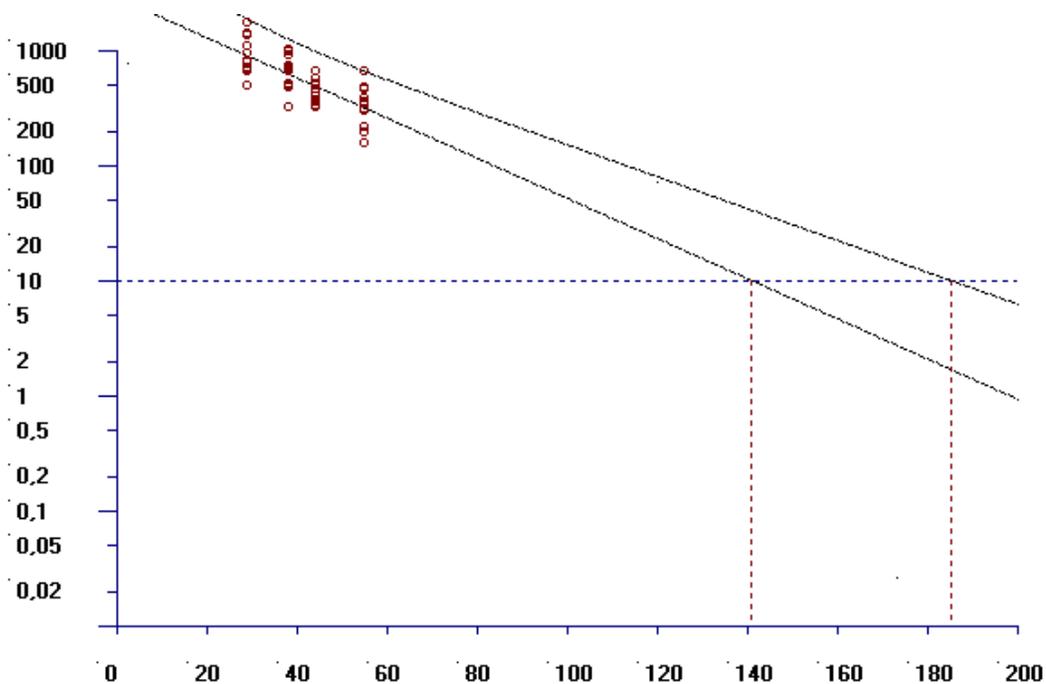


Figura 46. Gráfico de período de resguardo de Terrivet en *Salmo salar*, con LMR de 10 ppb

Para considerar válidas las curvas de depleci3n obtenidas, es necesario que se cumplan los siguientes supuestos de la regresi3n utilizada:

- homogeneidad de las varianzas
- Linealidad de los datos de Ln vs tiempo
- distribuci3n normal de errores

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utiliz3 el test de Bartlett, a trav3s del software "Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4":

Bartlett-test 3,92200287531181 (3)(p> 0.05)



Para comprobar la linealidad, basta con la inspecci3n visual de la curva de depleci3n (Fig 44).

Para comprobar la normalidad de errores, con el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” se obtiene el gr3fico de residuales (Fig 47) y el gr3fico de la frecuencia acumulativa de errores (Fig 48)

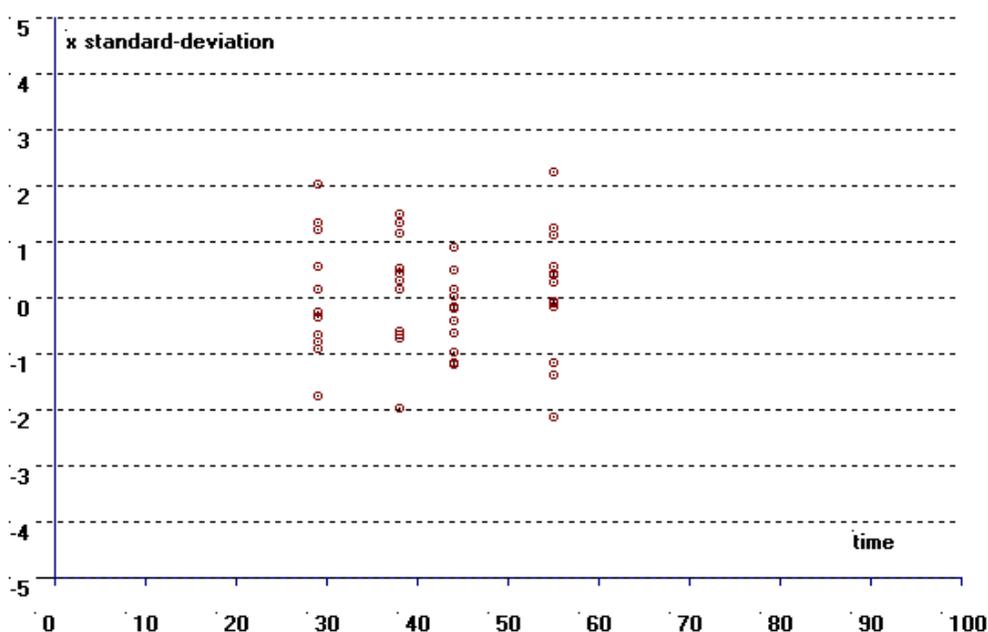


Figura 47. Gr3fico de residuales de la curva de depleci3n de Terrivet en Salmo salar, condiciones controladas

Para verificar los resultados del gr3fico de residuales, se realiz3 una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para lo que se utiliz3 el programa “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”:

Shapiro/Wilk 0,983624919562892 (48)(p > 0.10)

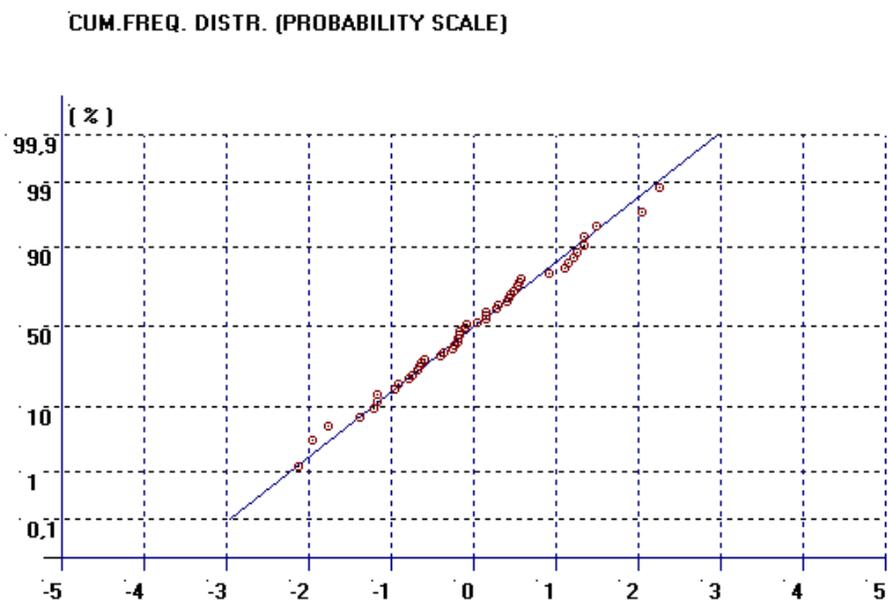


Figura 48. Gráfico de la frecuencia acumulativa de errores de la curva de depleción de Terrivet en *Salmo salar* en condiciones controladas

5.6. Desarrollo de estudios de depleción en músculo del principio activo oxitetraciclina aplicado vía intraperitoneal, bajo condiciones de campo.

Obtención de curva de depleción en músculo de OTC producto de la inyección i.p. de Magnadur en Trucha arcoíris, bajo condiciones de campo

La curva se realizó graficando el logaritmo natural (Ln) de la concentración de OTC versus los días post administración, para lo que se utilizó el programa Statistica. Posteriormente, se realizó la revisión de la presencia de outliers en el conjunto de los datos mediante el criterio de dos desviaciones estándar de la media de los residuales. La curva de depleción obtenida se observa en la figura



49, mientras que en el anexo 8 se observan los resultados obtenidos y sus respectivos cromatogramas.

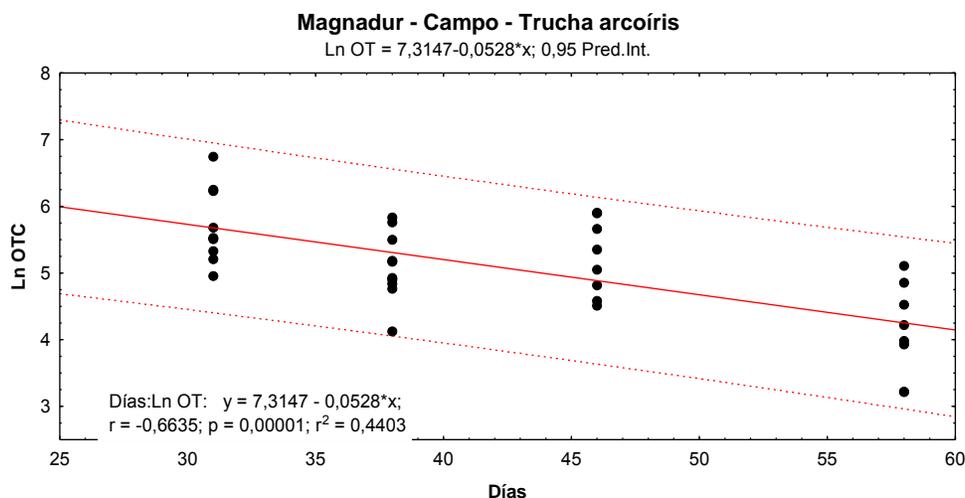


Figura 49. Curva de depleci3n de OTC en Trucha arcoíris, post-administraci3n de Magnadur de 35 mg de OTC/Kg de P.V., condiciones de campo

El tiempo de vida media se calcul3 dividiendo 0,693 por la pendiente de la curva de depleci3n, dando un valor para Liquamicina de 13 días.

Utilizando el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”, se calcul3 el periodo de resguardo para un LMR de 100 ppb (Fig 50) y de 10 ppb (Fig 51). Los valores de periodo de resguardo calculado son de 87 días para un LMR de 100 ppb, y de 151 días para un LMR de 10 ppb. El c3lculo fue realizado con un límite de tolerancia superior del 95%, con un 95 % de confianza. Si se toma en cuenta la temperatura promedio durante el ensayo de depleci3n (10,7 +/- 0,5°C), el periodo de resguardo se puede expresar como 1402 ° días (LMR=100 ppb) y 2288 ° días (LMR=10 ppb).

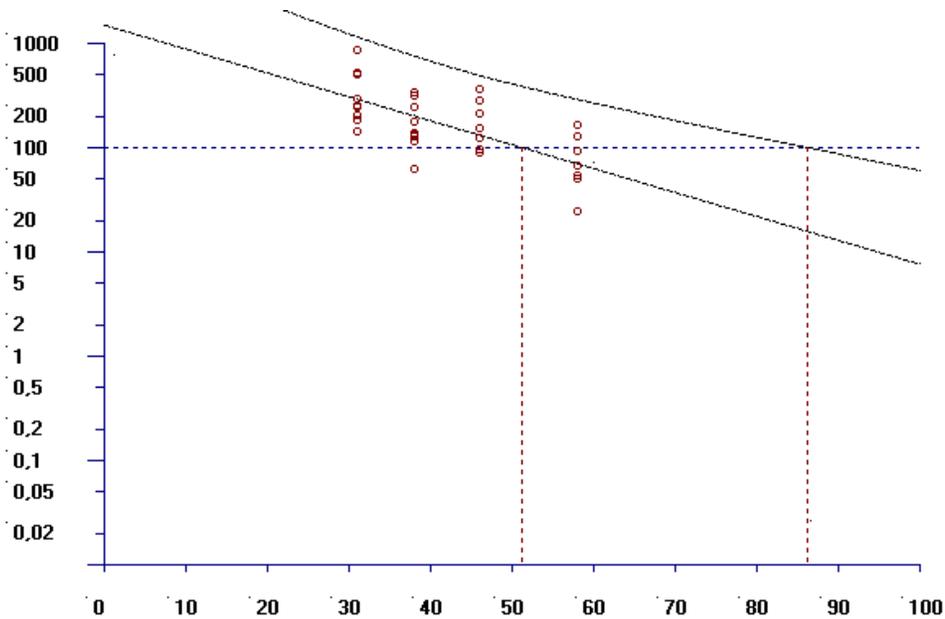


Figura 50. Gráfico de período de resguardo de Magnadur en Trucha arcoiris, con LMR de 100 ppb en condiciones de campo.

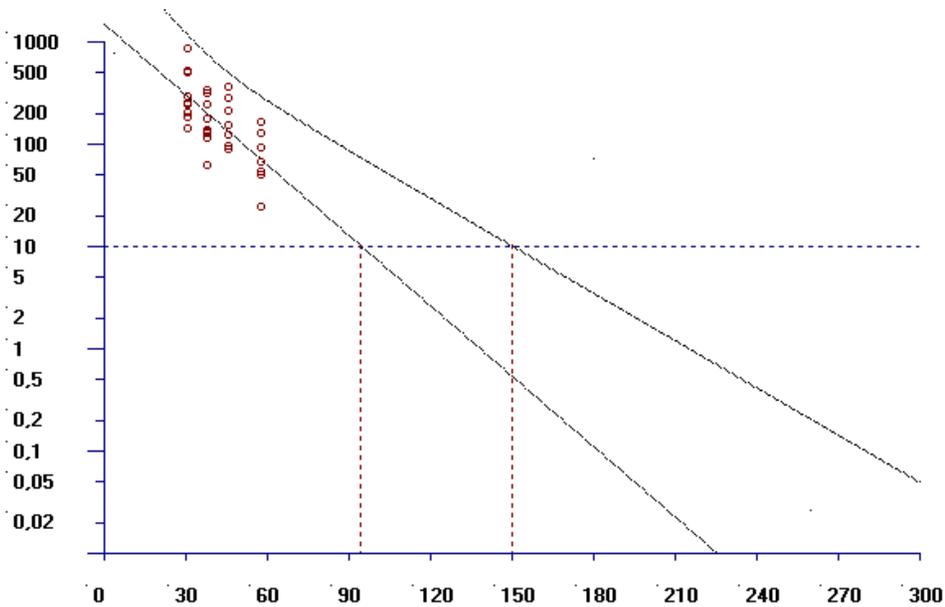


Figura 51. Gráfico de período de resguardo de Magnadur en Trucha arcoiris, con LMR de 10 ppb en condiciones de campo.



Para validar las curvas de depleción obtenidas, es necesario que se cumplan los siguientes supuestos de la regresión utilizada:

- homogeneidad de las varianzas
- Linealidad de los datos de Ln vs tiempo
- distribución normal de errores

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utilizó el test de Bartlett, a través del software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”:

Bartlett-test 0,728847440536376 (3) ($p > 0.05$)

Para comprobar la linealidad, basta con la inspección visual de la curva de depleción (Fig 49).

Para comprobar la normalidad de errores, con el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” se obtiene el gráfico de residuales (Fig 52) y el gráfico de la frecuencia acumulativa de errores (Fig 53).

Para verificar los resultados del gráfico de residuales, se realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para lo que se utilizó el programa “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”:

Shapiro/Wilk 0,961804248776217 (35) ($p > 0.10$)

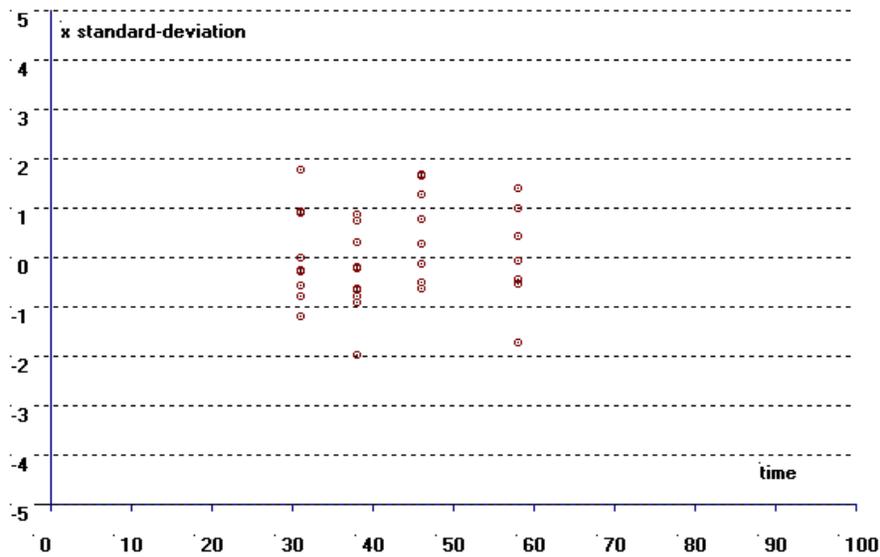


Figura 52. Gráfico de residuales de la curva de depleci3n de Magnadur en Trucha arcoiris, en condiciones de campo.

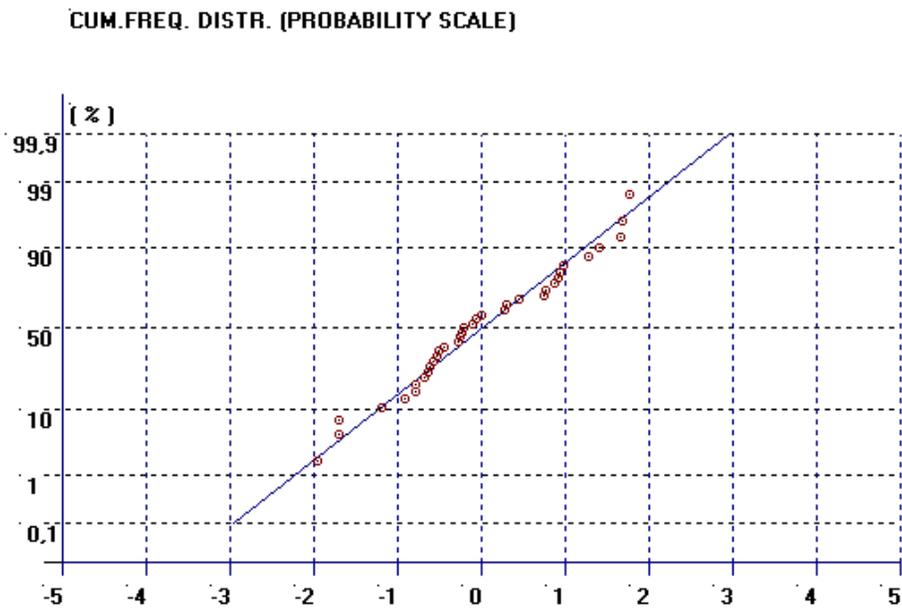


Figura 53. Gráfico de la frecuencia acumulativa de errores de la curva de depleci3n de Magnadur en Trucha arcoiris en condiciones de campo.



Objetivo específico 2: *Analizar las curvas de depleción obtenidas y evaluar los impactos que éstas podrían tener sobre el actual programa de control de fármacos vigente.*

5.7. Comparación de las curvas de depleción obtenidas bajo condiciones controladas y las obtenidas bajo condiciones de campo.

Resumen de resultados de curvas de depleción, T ½ y periodo de resguardo a 10 y 100 ppb de estudios bajo condiciones controladas y de campo.

En la tabla N° 2 se presentan el resumen de los resultados obtenidos de las curvas de depleción de todos los estudios realizados tanto en condiciones controladas, como el realizado en condiciones de campo. Se incluye la dosis efectiva realizada en cada uno de los estudios, el producto utilizado, la especie estudiada y la temperatura promedio del estudio. Adicionalmente a los periodos de resguardo calculados en días (WT 10 y 100 ppb), se incluyó el cálculo del periodo de resguardo en ° días.

Tabla 2

Resultados de curvas de depleción, T1/2 y periodo de resguardo a 10 y 100 ppb.

Producto	Dosis	Especie	peso prom	r	r2	T 1/2	° prom	WT 10 ppb	° dia	WT 100 PPB	° dia
Liq	38,7	Coho	1040	-0,84	0,70	12,5	12,70	125	1585	81	1026
Mag lab	34,8	Coho	1727	-0,72	0,52	12,0	14,80	139	2052	87	1292
Terr	35,8	Coho	1117	-0,63	0,40	17,2	14,80	213	3149	124	1841
Producto		Especie		r	r2	T 1/2		WT 10 ppb		WT 100 PPB	
Liq	27,5	Salar	735	-0,61	0,37	18,3	12,30	229	2812	142	1748
Mag lab	24,8	Salar	620	-0,66	0,44	19,8	12,30	220	2707	130	1597
Terr	26	Salar	770	-0,80	0,64	16,2	12,30	186	2286	114	1397
Producto		Especie		r	r2	T 1/2		WT 10 ppb		WT 100 PPB	
Liquamicina	28,1	Trucha A	357	-0,46	0,21	25,6	12,30	376	4621	187	2302
Magnadur campo	35	Trucha A	820	-0,66	0,44	13,1	10,70	151	1618	87	927
Terrivet	31,6	Trucha A	316	-0,50	0,25	24,1	12,30	324	3985	165	2024
Magnadur lab	38,7	Trucha A	1645	-0,73	0,53	14,7	13,10	149	1957	82	1068



Los $T_{1/2}$ obtenidos en los diferentes estudios se observan desde los 12 días (en el caso de Magnadur, condiciones controladas) a los 25 días (Trucha Liquamicina, condiciones controladas).

Comparación entre productos para Salmón Atlántico en condiciones controladas.

Mediante el análisis de comparación de pendientes de las curvas obtenidas (Fig 54), se obtuvieron diferencias significativas entre los productos para trucha arcoíris en condiciones controladas. La pendiente correspondiente al producto Terrivet ($b = -0,0428$, IC95%: $-0,052312$ y $-0,033307$) es más pronunciada que el resto de los productos Liquamicina ($b = -0,0378$, IC95%: $-0,051373$ y $-0,024311$) y Magnadur ($b = -0,035$; IC95% $-0,046398$ y $-0,023555$). Esto es concordante con el tiempo de vida media, el cual es 16,19 días para el producto Terrivet, menor que para Liquamicina (18,33 días) y Magnadur (19,80 días).

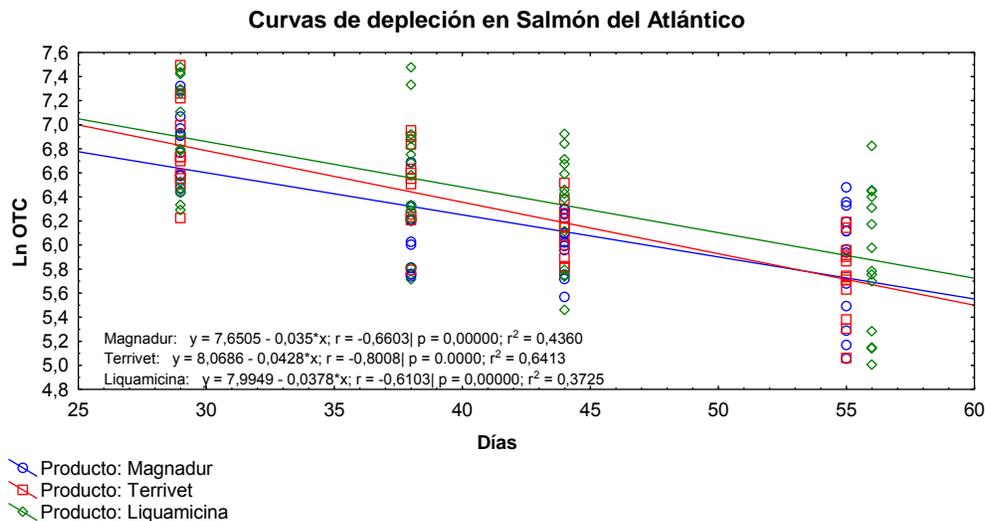


Figura 54. Regresiones lineales entre el Ln de OTC y los días post inyección para los productos Magnadur, Terrivet y Liquamicina en Salmón del Atlántico en condiciones controladas.



Comparación entre productos para Trucha arcoíris

Mediante el análisis de comparación de pendientes de las curvas obtenidas (Fig 55), se obtuvieron diferencias significativas entre los productos para trucha arcoíris en condiciones de laboratorio. La pendiente correspondiente al producto Magnadur ($b = -0,0471$, IC95%: $-0,063160$ y $-0,031022$) es más pronunciada que el resto de los productos Liquamicina ($b = -0,0271$, IC95%: $-0,044971$ y $-0,009193$) y Terrivet ($b = -0,0288$; IC95% $-0,046057$ y $-0,011505$). Esto es concordante con el tiempo de vida media, el cual es 14,71 días para el producto Magnadur, menor que para Liquamicina (25,57 días) y Terrivet (24,06 días).

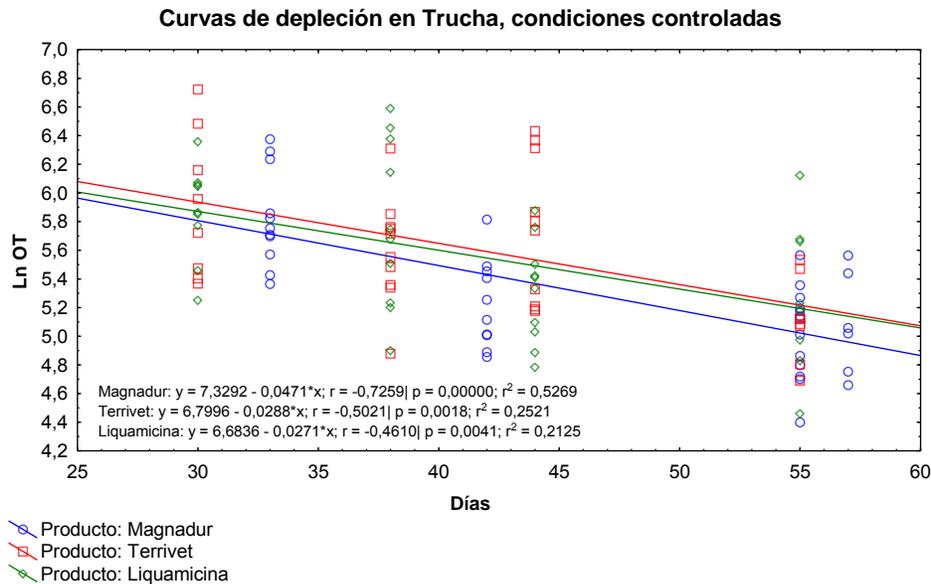


Figura 55. Regresiones lineales entre el Ln de OTC y los días post inyección para los productos Magnadur, Terrivet y Liquamicina en Trucha Arcoíris en condiciones controladas.



Comparación entre productos para Salmón coho.

Mediante el análisis de comparación de pendientes de las curvas obtenidas (Fig 56), se obtuvieron diferencias significativas entre los productos para salmón coho. La pendiente correspondiente al producto Terrivet ($b = -0,0402$, IC95%: $-0,057338$ y $-0,023091$) es menos pronunciada que el resto de los productos Liquamicina ($b = -0,0553$, IC95%: $-0,062999$ y $-0,047512$) y Magnadur ($b = -0,0578$; IC95%: $-0,073498$ y $-0,042011$). Esto es concordante con el tiempo de vida media, el cual es 17,24 días para el producto Terrivet, mayor que Liquamicina (12,53 días) y Magnadur (11,99 días).

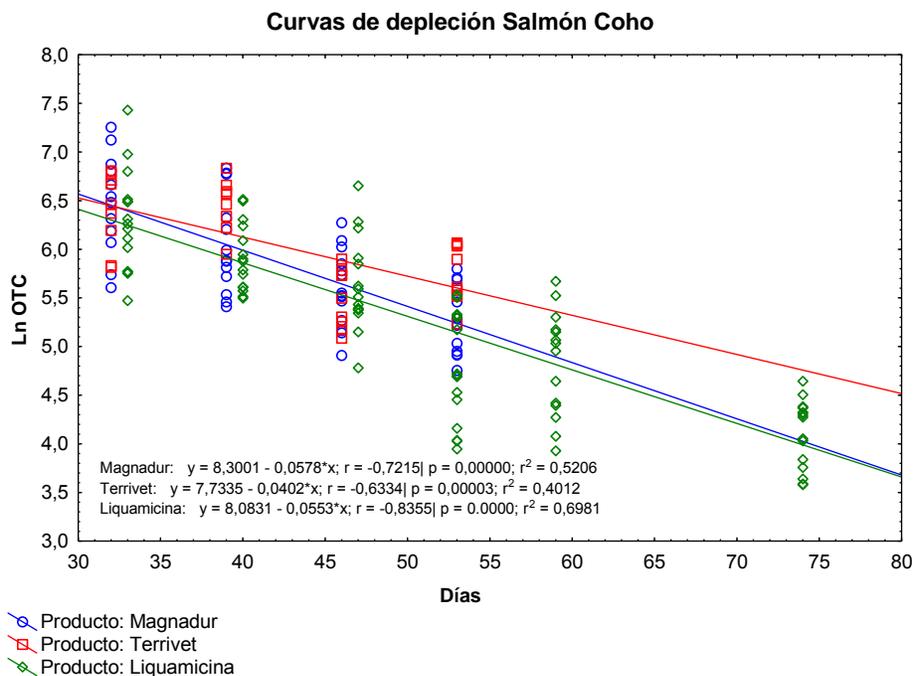


Figura 56. Regresiones lineales entre el Ln de OTC y los días post inyección para los productos Magnadur, Terrivet y Liquamicina en salmón coho.



Comparaci3n entre condiciones de campo y controladas para el producto Magnadur en trucha arco3ris.

Mediante el an3lisis de comparaci3n de pendientes de las curvas de depleci3n obtenidas (Fig 57), se determin3 que se presentan diferencias significativas entre las condiciones campo y laboratorio para Magnadur en Trucha arco3ris. La pendiente correspondiente a campo ($b=-0,0528$, IC95%: $-0,073905$ y $-0,031724$) es m3s pronunciada que las condiciones de laboratorio ($b=-0,0471$, IC95%: $-0,063160$ y $-0,031022$). Esto es concordante con el tiempo de vida media, el cual es 13,13 d3as para el producto Magnadur en campo, menor que el producto Magnadur en laboratorio (14,71 d3as).

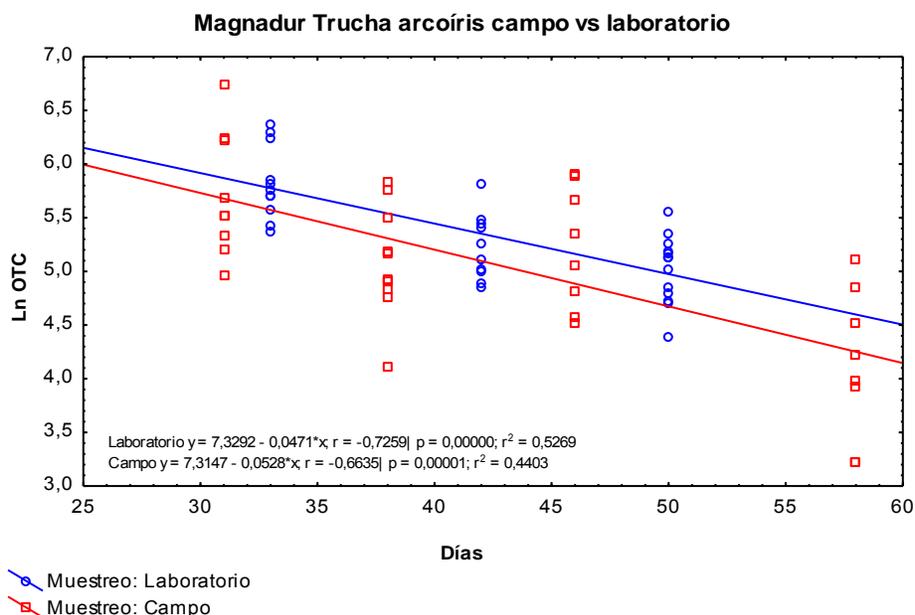


Figura 57. Regresiones lineales entre el Ln de OTC y los d3as post inyecci3n para el producto Magnadur en trucha arco3ris bajo condiciones controladas y de campo.



Diferencia de resultados de OTC en el grupo de peces de menor peso con respecto al grupo de peces de mayor peso en los diferentes estudios realizados.

La posible diferencia de concentraciones obtenidas entre los grupos de peces mayor peso y los de menor peso, en todos los estudios realizados y en todos los tiempos de muestreo, se presentan en las tablas 3 al 6.

Tabla 3
Diferencia de concentraciones obtenidas en el grupo de menor peso, con respecto al grupo de mayor peso en Salmón Coho en condiciones controladas

Liquamicina en Salmón coho.					Magnadur en Salmón coho.					Terrivet en Salmón coho.				
Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif	Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif	Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif
33	7 Mas bajos	1204,3	784,5	39,3	32	7 Mas bajos	1539,3	828,5	45,7	32	7 Mas bajos	882,1	710,1	26,5
	7 Mas altos	1687,1	476,5			7 Mas altos	2137,9	450,0			7 Mas altos	1290,0	521,9	
40	7 Mas bajos	1314,3	468,2	28,0	38	7 Mas bajos	1132,9	780,5	62,1	39	7 Mas bajos	935,7	772,1	16,4
	7 Mas altos	1791,4	337,2			7 Mas altos	1883,6	295,5			7 Mas altos	1290,7	645,5	
47	7 Mas bajos	1320,0	364,5	25,4	46	7 Mas bajos	1447,9	332,3	39,0	46	7 Mas bajos	1056,4	430,1	51,5
	7 Mas altos	1788,6	271,8			7 Mas altos	2012,1	202,6			7 Mas altos	1500,7	208,6	
54	7 Mas bajos	1300,7	199,0	58,9	53	7 Mas bajos	1445,7	321,2	44,7	53	7 Mas bajos	875,8	417,6	49,4
	7 Mas altos	2074,3	81,9			7 Mas altos	1988,6	177,6			7 Mas altos	1197,5	211,1	

El grupo de peces mayor peso presenta en todos los casos valores inferiores de concentración de OTC que los del grupo de menor peso, por lo que el % de diferencia es positivo. El grupo de peces de mayor peso presenta en la mayoría de los casos valores inferiores de concentración de OTC que los del grupo de peces de menor peso, por lo que el % de diferencia es positivo. En el día 44 de Liquamicina en Trucha arcoíris, los valores son prácticamente iguales.



Tabla 4
Diferencia de concentraciones obtenidas en el grupo de menor peso, con respecto al grupo de mayor peso en trucha arcoíris en condiciones controladas

Liquamicina en Trucha arcoíris					Magnadur en Trucha arcoíris.					Terrivet en Trucha arcoíris.				
Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif	Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif	Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif
30	5 Mas bajos	354,0	358,1	14,3	33	7 Mas bajos	1475,7	318,5	19,2	30	5 Mas bajos	312,4	654,7	64,5
	5 Mas altos	594,8	307,0			7 Mas altos	2205,0	257,4			5 Mas altos	488,4	232,1	
38	5 Mas bajos	374,8	520,6	54,8	42	7 Mas bajos	1166,0	222,0	30,4	38	5 Mas bajos	348,4	333,8	27,1
	5 Mas altos	704,8	235,1			7 Mas altos	1997,0	154,4			5 Mas altos	552,0	243,3	
44	5 Mas bajos	359,2	214,8	-0,1	50	7 Mas bajos	1316,4	163,5	20,9	44	5 Mas bajos	239,6	487,9	56,8
	5 Mas altos	532,4	215,0			7 Mas altos	1808,6	129,4			5 Mas altos	558,4	211,0	
55	5 Mas bajos	420,8	214,0	32,1						55	5 Mas bajos	332,8	187,1	46,2
	5 Mas altos	616,4	145,3									5 Mas altos	606,8	



Tabla 5
Diferencia de concentraciones obtenidas en el grupo de menor peso, con respecto al grupo de mayor peso en salm3n del atl3ntico en condiciones controladas

Liquamicina en Salm3n Atl3ntico.					Magnadur en Salm3n Atl3ntico.					Terrivet en Salm3n Atl3ntico.				
Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif	Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif	Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif
29	7 Mas bajos	646,0	1726,8	54,5	29	7 Mas bajos	554,0	903,4	9,6	29	7 Mas bajos	770,3	1039,9	10,7
	7 Mas altos	1160,0	786,6			7 Mas altos	833,0	816,2			7 Mas altos	1269,4	928,3	
38	7 Mas bajos	772,3	1002,9	50,0	38	7 Mas bajos	674,3	465,4	31,2	38	7 Mas bajos	651,1	1100,3	43,1
	7 Mas altos	1198,0	501,1			7 Mas altos	1067,7	320,4			7 Mas altos	1210,3	626,4	
44	7 Mas bajos	756,1	551,6	19,4	44	7 Mas bajos	729,1	380,1	-7,4	44	7 Mas bajos	810,9	320,2	-43,9
	7 Mas altos	1283,4	444,8			7 Mas altos	1120,3	408,4			7 Mas altos	1352,6	460,6	
56	7 Mas bajos	648,0	576,2	44,1	56	7 Mas bajos	685,4	440,7	11,5	56	7 Mas bajos	765,1	366,3	17,1
	7 Mas altos	1245,4	322,3			7 Mas altos	1028,9	390,1			7 Mas altos	1120,3	303,8	



El grupo de peces de mayor peso presenta en la mayoría de los casos valores inferiores de concentración de OTC que los del grupo de menor peso, por lo que él % de diferencia es positivo. En el tercer tiempo de muestreo (día 44) de Magnadur y Terrivet en Salmón del Atlántico, se presenta el efecto contrario, pero lo más probable es que sea un efecto del azar al elegir los peces, considerando la variabilidad de los resultados obtenida.

Tabla 6

Diferencia de concentraciones obtenidas en el grupo de menor peso, con respecto al grupo de mayor peso en trucha arcoíris en condiciones de campo

Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif
31	3 Mas bajos	830,7	288,4	9,3
	3 Mas altos	1147,3	261,7	
38	3 Mas bajos	710,7	215,7	-8,1
	3 Mas altos	1538,7	233,3	
46	3 Mas bajos	1056,7	411,3	62,9
	3 Mas altos	1383,3	152,6	
58	3 Mas bajos	1203,3	146,1	70,4
	3 Mas altos	1810,0	43,2	

El grupo de mayor peso presenta en la mayoría de los casos valores inferiores de concentración de OTC que los del grupo de menor peso, por lo que él % de diferencia es positivo. En el segundo tiempo de muestreo (día 38) de Magnadur en



Trucha Arcoiris, se presenta el efecto contrario, pero lo más probable, al igual que en el caso anterior, se deba a un efecto del azar.

5.8. Identificación y evaluación de los impactos del uso extraetiqueta de oxitetraciclina aplicada intraperitonealmente sobre el actual programa de control de fármacos vigente.

Una vez obtenidos y analizados los resultados de los estudios con 3 presentaciones farmacéuticas de oxitetraciclina inyectable, para tres especies de salmónidos, tanto en condiciones controladas como de campo, se pudieron establecer algunas conclusiones generales que permiten identificar singularidades de este tipo de aplicación, sobre las curvas de depleción y respectivos periodos de carencia según mercado de destino, respecto de la aplicación por alimento medicado, y que es la que fue considerada al momento de la elaboración de la normativa atingente, principalmente el programa de Control de Fármacos del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca).

Se identificaron los procesos que pudieran ser modificados, detallándose su justificación, aplicabilidad y costos generales, así como el estamento implicado.

En términos generales, se analizaron las nuevas actividades exigidas para la implementación de modificaciones en los muestreos pre-cosecha exigidos por la Autoridad a los productores, actividades que a su vez, implican consumo de nuevos recursos, siendo el costo la expresión cuantificada en términos monetarios de los recursos o factores productivos consumidos por la actividad.



Elaboraci3n de Diagrama de Flujo

A partir de la informaci3n obtenida respecto de los procesos de muestreo pre-cosecha asociados al Programa de Control de F3rmacos vigente, se define el siguiente diagrama de flujo, en el cual se destacan las actividades de la cual participan los distintos centros de actividad (Figura 58).

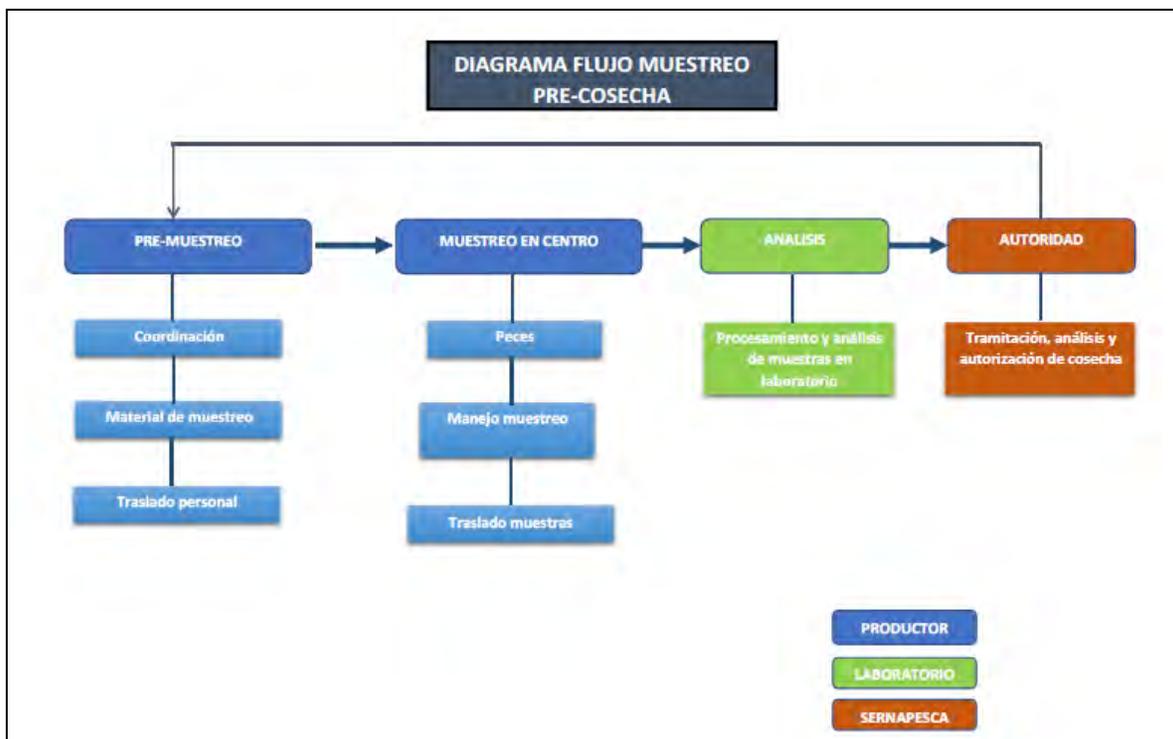


Figura 58. Diagrama de Flujo para el muestreo pre-cosecha del Programa de Control de F3rmacos de Sernapesca.

Recopilaci3n y registro de informaci3n

Para obtener los antecedentes asociados al costeo de actividades modificadas con las propuestas presentadas, se consult3 a representantes de los estamentos involucrados. Ello consider3 a las empresas salmonicultoras, jefes de centro y representantes de la industria en general, a los laboratorios que prestan el servicio



de detecci3n de analitos en m3sculo y a la Autoridad pertinente. La memoria de c3lculo del Anexo 11 da cuenta de esta informaci3n.

Implementaci3n Costeo ABC

Para la ejecuci3n de la fase 1, espec3ficamente en lo relacionado a la definici3n de las actividades, se ha considerado que el muestreo pre-cosecha se abastece de los siguientes productos:

- Coordinaci3n previa muestreo
- Disposici3n de materiales de muestreo
- Manejo de jaula para muestreo (personal externo e interno empresa)
- Muestras de peces
- Transporte de muestras
- Transporte de personal
- An3lisis de muestras
- Procesamiento y gesti3n para autorizaci3n

Los generadores de costos y las actividades asociadas a cada uno de estos productos se muestran en la Anexo 11, con sus respectivos costos unitarios.

La fase 2 consider3 la asignaci3n de los costos de las actividades y los costos directos a cada uno de los 8 productos identificados obteniendo su costo total unitario, para posteriormente calcular el costo total de la modificaci3n por unidad muestreada para pre-cosecha. Las propuestas representan costos adicionales que recaen directamente en el estamento productor, asign3ndose a dicho estamento gran parte de dichos costos, por efecto del mayor n3mero de an3lisis, costo de env3o de muestras, costos de transporte de muestras, costos en dedicaci3n de



horas/hombre para el muestreo, etc., cuyo detalle es presentado en la memoria de c3lculo del Anexo 11.

De esta forma se determin3 que el costo total de la aplicaci3n de las modificaciones propuestas, que en la pr3ctica, representan el aumento del n3mero de peces muestreados por evento de muestreo precosecha (de 10 a 20 unidades) genera un valor adicional \$ 1.264.050 (por cada 10 peces/muestreo/jaula), el que debe ser asumido por el productor, considerando que el estamento laboratorio de servicio solamente aplicar3 un mayor cobro del servicio por un aumento en las unidades de an3lisis ingresado. Por su parte, la Autoridad tendr3a un costo adicional te3rico por el an3lisis de las solicitudes con m3s antecedentes (10 datos extra), en un aumento en la dedicaci3n de las horas de dedicaci3n.

5.9. Propuesta de ajustes para que el uso extra etiqueta de oxitetraciclina intraperitoneal, no se traduzca en un rechazo del producto final debido a presencia de residuos de antimicrobianos.

En consideraci3n de todos los antecedentes previamente presentados, vale decir, los resultados de los estudios de depleci3n en m3sculo de aplicaciones intraperitoneales de oxitetraciclina en salm3nidos de cultivo en condiciones controladas y de campo, m3s el an3lisis de factibilidad y costos, y los comentarios preliminares de las autoridades pertinentes a las propuestas presentadas, se elabor3 un listado de propuestas de modificaci3n o validaci3n al programa de Control de F3rmacos vigente, buscando el resguardo del cumplimiento de las normativas y evitar rechazo del producto final debido a presencia de residuos de antimicrobianos en los mercados de destino.



El listado y su justificación se presentan a continuación:

Propuesta 1: Los peces que hayan sido tratados con oxitetraciclina por vía inyectable deben ser siempre muestreados, independiente de que el tratamiento haya sido aplicado en un periodo superior a los 6 meses.

Justificación: En consideración de las altas concentraciones de OTC que se logran con este tipo de tratamiento, y a lo lento que se elimina del músculo, que dependiendo del mercado de destino puede superar los 10 meses a 10°C.

Propuesta 2: El muestreo pre-cosecha debe ser siempre por jaula cuando se haya utilizado este tipo de productos.

Justificación: Esta propuesta se basa en la variabilidad de los resultados que se obtienen al realizar los tratamientos por esta vía, por lo que debe evitarse el efecto de “dispersión de datos de concentración” por efecto de jaulas que pueden haber sido tratadas por vía oral, o no haber sido tratadas.

Propuesta 3: El N° de peces en los muestreos debiese aumentarse a un mínimo de 20, considerando la variabilidad de las concentraciones en los grupos, y sin importar si han recibido tratamiento oral o no.

Justificación: En el FAR-MP-1 vigente, se indica que para el tratamiento de este tipo de productos, se debe muestrear 10 peces, que aumentan a 20 si es que han sido tratados adicionalmente con OTC por vía oral. La propuesta es que siempre se tomen 20 muestras, ya que por la variabilidad de concentraciones encontrada, esta mayor representatividad permite disminuir la incerteza estadística del



muestreo, y en consecuencia, el riesgo de detección de concentraciones fuera de norma según mercado de destino.

Propuesta 4: Se debe propender a obtener una muestra para liberación de pre-cosecha, con los ejemplares de peces de menor tamaño (peso) dentro de la jaula bajo muestreo.

Justificación: El estudio de diferencias entre muestras de peces de mayor y menor peso para las concentraciones de oxitetraciclina en músculo, indica que la mayor concentración en los peces de menor peso es un factor que da mayor seguridad para determinar los periodos de carencia respectivos.

Propuesta 5: En el caso de re-muestreos, el número de peces no puede ser inferior al número de peces del muestreo original (actualmente el FAR-MP-1 indica que el número de muestras en estos casos es de 5).

Justificación: El número exigido actualmente es muy bajo considerando los argumentos presentados en la propuesta anterior.

Propuesta 6: En forma complementaria, se debería modificar el texto de la norma FAR-MP-1 en lo que a re-muestreos se refiere, debiendo realizarse este re-muestreo luego de transcurrida al menos 1 semana después del primer muestreo.

Justificación: Considerando las curvas de depleción obtenidas en el estudio, y que para la determinación de periodos de carencia, existe un error estadístico implícito, muestreos realizados antes de una semana, no tendrían implicancia mayor en la obtención de resultados diferentes del muestro precedente.



5.10. Actividades generales

5.10.1. Reuniones de Coordinación:

Con fecha 27 de mayo de 2015 se realizó la primera reunión de coordinación entre el equipo de trabajo ejecutor de IFOP, y representantes del FIPA, Sernapesca y Subpesca.

Dicha reunión fue realizada en las dependencias del FIPA en Valparaíso. El acta de la reunión se detalla en el Anexo 9.

El pasado 27 de julio de 2016, se efectuó una reunión en la oficina regional de Los Lagos del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, con representantes de Sernapesca y Subpesca para hacerles la presentación general de resultados del estudio y darles a conocer las propuestas de modificación consideradas pertinentes al programa de control de fármacos. Dicha reunión se efectuó de forma presencial con 4 representantes del Servicio y mediante videoconferencia con Sernapesca Valparaíso, donde asistieron otras 8 personas.

5.10.2. Taller de difusión de resultados:

Con fecha 28 de septiembre de 2016 se realizó el taller de difusión de resultados del proyecto en el Hotel Gran Pacífico en Puerto Montt, con la asistencia de personal de Sernapesca, Subpesca, laboratorios farmacéuticos, empresas



salmonicultoras y laboratorios de servicio (anexo 13), la presentación de dicho taller efectuada por el Sr. Luis Norambuena se adjunta en el anexo 14.

5.10.3. Publicación de resultados:

A la fecha del presente informe se ha elaborado un manuscrito científico con los resultados de la presente investigación, para ser remitido a la revista *Aquaculture*. El detalle puede revisarse en el Anexo 15.



6. DISCUSI3N Y AN3LISIS

Los resultados de la revisi3n bibliogr3fica asociada a curvas de depleci3n en f3rmacos en peces en los 3ltimos cinco a3os fue escasa, raz3n por la cual la b3squeda fue extendida a estudios publicados desde 1990 a la fecha. Sin embargo en su gran mayor3a los trabajos ten3an relaci3n con la administraci3n por v3a oral y no por v3a intraperitoneal, objetivo que tuvo el presente estudio. En cuanto a la bibliograf3a encontrada con relaci3n a productos inyectables, 3sta tiene relaci3n principalmente con administraci3n por v3a intravenosa o arterial, no encontr3ndose trabajos por v3a intraperitoneal.

En los estudios analizados, la cantidad de animales utilizados por tiempo de muestreo fue variable, como as3 tambi3n la cantidad de tiempos de muestreo. El tiempo de vida media de oxitetraciclina (OTC) en m3sculo obtenido fue de aproximadamente 5,5 d3as en promedio, coherente con los resultados obtenidos para este mismo f3rmaco en estudio realizado por IFOP en 2014 (datos no publicados), donde se obtuvieron valores de entre 5,6 y 6,8 d3as

Con estos antecedentes y tomando como base normas internacionales de la Food and Drugs Administration de EUA (FDA, 2005) y European Medicine Agency (EMA, 1997), se desarrollaron protocolos base de depleci3n de oxitetraciclina para condiciones controladas y de campo.

En el protocolo en condiciones controladas se propuso realizar 8 tiempos de muestreo, siendo el 3ltimo tiempo de 98 d3as post-medicaci3n, de manera que una vez obtenidos los resultados de concentraci3n de oxitetraciclina, se puedan seleccionar para los siguientes estudios, los cuatro tiempos de muestreo cuya



concentración sea más baja y entregaran resultados cuantificables. Se debe tener en cuenta que las guías de EMEA (1997) y FDA (2005) indican que para poder realizar una curva de depleción, se deben obtener un mínimo de 3 tiempos de muestreo cuantificables.

El tipo de muestra a utilizar es un aspecto muy sensible en este tipo de estudios. Tal como ya fue mencionado, de acuerdo a las recomendaciones de EMEA (1997) y VICH (2015), las muestras deben corresponder al producto comestible, que sin lugar a dudas en este caso, corresponde a músculo más piel en proporciones naturales. No obstante lo anterior, en una guía de EMEA (2003) se indica que en productos inyectables, los tiempos de depleción pueden ser diferentes dependiendo del lugar muestreado dentro del mismo animal.

El sitio de inyección de este tipo de productos no corresponde a la muestra solicitada por Sernapesca en los ensayos de pre-cosecha (Sernapesca, 2015c), razón por la cual se propuso realizar una curva de depleción con la muestra actualmente utilizada por la autoridad, y otra considerando la muestra que incluya el sitio de inyección. De esta manera se pudo obtener información fundamental para evaluar eventuales diferencias en las curvas de depleción, dependiendo del sitio de muestreo, y en casos donde se utilizan tratamientos inyectables

Con la información entregada por Sernapesca se pudo tener una visión general de la utilización por parte del sector productor de salmones de cultivo, de la OTC vía intraperitoneal en la aplicación de tratamientos en los últimos años. Liquamicina LA 20% es el producto extra etiqueta más utilizado por la industria los últimos años.



Si bien, a fines del año 2014 se autorizó para uso en acuicultura, el primer producto comercial de OTC inyectable con registro del SAG para salmónidos, Terrivet F200, su participación en el mercado todavía no desplaza a los productos extra-etiqueta.

De acuerdo a reuniones con representantes de la industria salmonicultura, se determinó que sería importante evaluar al producto comercial Magnadur LA 300 30%, ya que según lo señalado por éstos, tendría un periodo de carencia menor a los otros dos productos previamente señalados. De hecho, según la información de las formas farmacéuticas, obtenidas desde el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Magnadur LA 300 30% es una solución inyectable, a diferencia de Liquamicina LA 20 % y Terrivet F200 que corresponden a una suspensión inyectable. Considerando estos antecedentes, y pese a que Magnadur LA 300 30%, es el quinto producto comercial extra etiqueta mayormente utilizado por la industria, se propuso realizar estudios con dicho producto, quedando seleccionados finalmente Liquamicina LA 20%, Magnadur LA 300 30% y Terrivet F 200.

La ficha técnica de Terrivet F200 indica que la dosis a utilizar es de 20 mg OTC/Kg de P.V., no obstante, de acuerdo a conversaciones con productores de salmónidos, la dosis más utilizada por la industria es de 30 mg OTC/Kg de P.V. Debido a esto, y con la finalidad de obtener resultados de acorde a lo que sucede en la realidad, se realizaron los estudios de Terrivet con una dosis de 26 a 35,8 mg OTC/Kg P.V. Los estudios con Liquamicina se realizaron a una dosis de 27,5 a 38,7 mg OTC/Kg P.V. Los estudios con Magnadur se realizaron a una dosis de 24,8 a 38,7 mg OTC/Kg P.V.

Finalmente, y considerando todos los antecedentes antes descritos, se pudieron confeccionar los protocolos específicos para obtener las curvas de depleción de



oxitetraciclina, administrada vía intraperitoneal, para las especies Salmón Coho, Trucha Arcoíris y Salmón del Atlántico, en condiciones controladas y de campo. En relación al estudio de depleción de Liquamicina bajo condiciones controladas para la especie salmón Coho, los resultados en los primeros cuatro tiempos de muestreo demuestran que la concentración de OTC en la muestra normalmente utilizada en los ensayos de pre-cosecha (Sernapesca, 2015a), y los obtenidos en la muestra que incluye el punto de inyección son iguales. En una guía de EMEA (2003) se indica que luego de la administración intramuscular de los antibióticos en animales, se pueden producir fenómenos de fibrosis, encapsulación o necrosis, que eventualmente pueden provocar que la depleción en los lugares del sitio de inyección sea más larga y errática. Es probable que como en este caso la inyección es intraperitoneal, no se produzcan los efectos anteriormente señalados, por lo que es perfectamente válido seguir realizando los controles de pre-cosecha en la muestra que actualmente se utiliza, independiente si la administración del fármaco es intraperitoneal o vía alimento.

La concentración máxima de OTC lograda en músculo, luego de aplicar Liquamicina a una dosis de 36 mg/Kg PV fue de 7000 ppb (7ppm) a los 12 días post-tratamiento. Como comparación, las concentraciones máximas alcanzadas en músculo luego de la aplicación vía alimento, indicadas en diversos estudios, no superan los 4000 ppb a los 2-4 días de haber finalizado el tratamiento. Las altas concentraciones medidas en músculo se podrían deber a que por vía intraperitoneal (i.p.), la OTC ingresa de mejor forma al organismo, con respecto a las dosis entregadas por vía de alimento, donde se absorbe muy poca cantidad del principio activo. Por vía i.p. la biodisponibilidad del fármaco es mejor, ya que a pesar de utilizar menos principio activo, la concentración lograda en músculo es mayor que con los tratamientos orales, lo que implica que se podrían utilizar hasta 100 veces menos antimicrobianos utilizando este tipo de vía (considerando como



base un tratamiento estándar vía alimento medicado de 21 días, a una dosis de 100mg/kilo P.V. versus un tratamiento i.p., a una dosis de 20mg/kilo P.V.).

En todos los estudios realizados se observa una gran variabilidad de los resultados de concentración de OTC, lo que es normal en este tipo de estudios, razón por la cual se indica que el número mínimo de muestras por tiempo de muestreo debe ser de 10 (Rigos and Smith, 2013).

Al analizar las curvas de depleción de los tres productos comerciales en condiciones controladas en Coho, se obtienen valores de $T_{1/2}$ que van desde los 12 días (Magnadur) hasta 17,2 días (Terrivet). Estadísticamente se demuestra que la pendiente de la curva de depleción de Terrivet es menos pronunciada a la de los otros dos productos, lo que trae como consecuencia que el $T_{1/2}$ de Terrivet es mayor que el de Liquamicina y Magnadur, que son muy similares. Esto implica que Terrivet en este estudio, presenta una eliminación más lenta que los otros dos productos.

En cuanto al periodo de carencia o resguardo calculado para Coho en condiciones controladas, para los tres productos comerciales, con un LMR de 100 ppb, se observa que éste va desde los 81 días (Liquamicina) a los 124 días (Terrivet), que considerando la temperatura del agua en el estudio, corresponden a 1026°/día y 1841°/día, respectivamente. Si consideramos 10 ppb, la situación aumenta de 125 días (Liquamicina) a 213 días (Terrivet), correspondiendo a 1585°/día y 3149 °/día, respectivamente.

En los resultados de las curvas de depleción de los tres productos comerciales en condiciones controladas en Salmón del Atlántico, se obtienen valores de $T_{1/2}$ que van desde los 16,2 días (Terrivet) a los 19,8 días (Magnadur). Se demuestra



estadísticamente que el $T_{1/2}$ de Terrivet es menor que el de los otros dos productos, es decir en este caso se elimina más rápido. Cabe hacer notar que la temperatura promedio de este estudio es un poco menor que en el estudio con Coho.

El periodo de carencia en Salar para un LMR de 100 ppb, va de 114 días (Terrivet) a 142 días (Liquamicina), que corresponde a $1397^\circ/\text{día}$ y $1748^\circ/\text{día}$, respectivamente. Considerando como LMR 10 ppb el resguardo va de 186 días (Terrivet) a 229 días (Liquamicina), correspondiendo a $2286^\circ/\text{día}$ y $2812^\circ/\text{día}$, respectivamente. En este caso Liquamicina, pese a tener $T_{1/2}$ levemente inferior a Magnadur, tiene tiempos de resguardo mayores, lo que es explicado con los límites de tolerancia superior de la curva de depleción, que en el caso de Liquamicina es un poco mayor producto de la menor correlación (r) entre las variables, lo que trae como consecuencia periodos de resguardo mayores.

En los resultados de las curvas de depleción de los tres productos comerciales en condiciones controladas en Trucha arcoíris se obtienen valores de $T_{1/2}$ que van desde los 14,7 días (Magnadur) a 25,6 días (Liquamicina). Se demuestra estadísticamente que el $T_{1/2}$ de Magnadur es menor que el de los otros dos productos (que son prácticamente iguales), es decir en este caso se elimina más rápido. Cabe hacer notar que la correlación entre las variables de las dos curvas de depleción de Liquamicina y Terrivet son las más bajas de todos los estudios realizados, el % de explicación del modelo es muy bajo, en consecuencia es posible que sus $T_{1/2}$ estén sobreestimados.

El periodo de carencia en Trucha en condiciones controladas para un LMR de 100 ppb, va desde los 82 días (Magnadur) a 187 días (Liquamicina), que corresponde a $1068^\circ/\text{día}$ a los $2302^\circ/\text{día}$. Considerando como LMR 10 ppb el resguardo va de 149 días (Magnadur) a 376 días (Liquamicina), correspondiendo a $1957^\circ/\text{día}$ y



4621º/día, respectivamente. Como ya se mencionó en los casos de Liquamicina y Terrivet al tener una baja correlación, hacen que el límite de tolerancia superior aumente mucho, entregando valores que pueden ser sobreestimados.

Al comparar las curvas de depleción de Magnadur en Trucha arcoíris en condiciones de campo y condiciones controladas, se demuestran diferencias estadísticas entre ambas curvas, con las que se obtienen $T_{1/2}$ menores para el caso del estudio en condiciones de campo. Concordantemente se obtienen periodos de resguardo mayores para el estudio en condiciones controladas, tanto para LMR de 10 y 100 ppb. Pese a ser estadísticamente diferentes ambas curvas, estas diferencias son leves, y pueden explicarse porque en el estudio en condiciones controladas solamente pudieron realizarse 3 tiempos de muestreo. Sin embargo, en cada punto de muestreo en el estudio en condiciones controladas se utilizaron más peces que en el de campo, siendo el % de explicación del modelo, mejor en el caso de condiciones controladas.

Cabe destacar que la comparación del estudio en condiciones de laboratorio con el estudio en condiciones de campo, es completamente comparable, con diferencias mínimas entre éstos, a diferencia de lo que ocurre cuando los estudios son realizados con OTC administrados por vía oral, donde hay una gran diferencia al comparar ambos tipos de estudios. Esto indicaría que todos los estudios realizados en condiciones controladas son comparables a lo que sucedería en condiciones de campo.

El valor de $T_{1/2}$ calculado en todos los estudios realizados, sin considerar los resultados obtenidos en Trucha con Terrivet y Liquamicina, fue de 12 días a 19,8 días, lo que es superior al valor obtenido en un estudio previo realizado por IFOP (2014b) luego de la administración de OTC vía alimento, y que fue de 5,6 y 6,8 días.



Sin embargo el T $\frac{1}{2}$ varía mucho dependiendo de la dosis, vía de administración, especie y edad (Rigos and Smith, 2013). En la revisión de otros trabajos, se pudo observar una variación en los resultados de T $\frac{1}{2}$ que varía desde los 2 hasta los 15 días (Black et al., 1991; Meinertz et al., 2001; Namdari et al., 1996; Namdari et al., 1999). Sin embargo es importante hacer notar que la mayoría de los trabajos revisados el T $\frac{1}{2}$ bordea los 5 días, siendo el único trabajo que muestra un T $\frac{1}{2}$ de 15 días (Namdari *et al.*, 1999), el realizado en Trucha Arcoíris y Chinook (de 300 gr. c/1), luego de la administración intra-venosa de OTC a dosis de 50 y 5 mg/Kg, respectivamente. En consecuencia los resultados obtenidos y la bibliografía revisada, sugieren que la OTC administrada por vía inyectable, es eliminada de forma más lenta que al ser administrada por vía oral.

Representantes de la industria salmoniculora, señalan que Magnadur tendría un período de resguardo menor, a los otros productos estudiados. Incluso en el sistema en línea de búsqueda de medicamentos autorizados por el SAG, se señala que Magnadur es una solución inyectable, mientras Liquamicina y Terrivet son suspensión inyectable. Pese a estos antecedentes, no observamos esta situación en los estudios realizados. Sin considerar los resultados obtenidos en trucha para los productos Liquamicina y Terrivet (por tener una correlación muy baja), no se observan diferencias en los resultados de Magnadur sobre los otros productos. De hecho para salmón Coho el T $\frac{1}{2}$ de Magnadur es efectivamente el más bajo, casi igual a Liquamicina, siendo el T $\frac{1}{2}$ mayor el de Terrivet. En Salar la situación es diferente, Magnadur es el que posee un mayor T $\frac{1}{2}$, casi igual a Liquamicina, siendo Terrivet el de menor T $\frac{1}{2}$. Esta situación puede deberse a que de haber diferencias en la eliminación de Magnadur frente a los otros productos, esta diferencia no es muy grande, y por la variabilidad de los resultados ésta no puede ser demostrada.



Se observa en la mayoría de los casos, que los peces de menor peso tienen una concentraci3n de OTC mayor que los peces de mayor peso, lo que se explica considerando que la aplicaci3n se hace a toda la poblaci3n de peces con un mismo volumen de producto, por lo que la dosis recibida por los primeros es mayor.

En relaci3n al c3lculo de tiempo de resguardo, debe considerarse que 3ste fue realizado con un l3mite de tolerancia superior del 95%, con un 95 % de confianza (EMEA, 1997). Para 100 ppb en todos los estudios realizados sin considerar los resultados obtenidos en Trucha con Terrivet y Liquamicina, el per3odo de resguardo calculado fue de 81 d3as (1026 ° d3as, Coho-Liquamicina) a 142 d3as (1748° d3as, Salar-Liquamicina). Para 10 ppb el periodo de resguardo calculado va de 125 d3as (1585° d3as, Coho-Liquamicina) a 229 d3as (2812° d3a, Salar-Liquamicina). Considerando solo los grados-d3a, el que present3 un mayor tiempo de resguardo tanto a 10 como a 100 ppb, fue Terrivet-Coho (10 ppb: 3149° d3a y 100 ppb: 1841 ° d3as), lo que se debe a que la temperatura del agua fue de 14,8°C.

Para casi todos los estudios realizados, los valores de periodo de resguardo calculados para 100 ppb son superiores a lo declarado en la Ficha T3cnica de Terrivet F-200, 3nico producto autorizado para salmones (1060/grados/d3as). Al respecto cabe se3alar que la concentraci3n recomendada por el fabricante es de 20 mg/Kg P.V. En el presente estudio se utiliz3 como dosis desde 26 a 36 mg/Kg P.V., que est3 de acuerdo a lo que se utiliza actualmente en la industria.

Sin dudas, el asunto m3s relevante de destacar en los resultados obtenidos es que en la aplicaci3n de tratamientos por la v3a i.p., se logran concentraciones en m3sculo mucho mayores a las que se logran cuando la administraci3n es v3a oral, pudiendo utilizarse hasta 100 veces menos principio activo. Por otro lado y



dependiendo del destino del producto, el período de resguardo puede ser de hasta 1841^o/días en el caso de un LMR de 100 ppb o hasta 3149^o/días cuando el LMR es de 10 ppb, lo que equivale a 6 a 10 meses a 10°C, respectivamente.

En las propuestas de modificación al Programa de Control de Fármacos de Sernapesca, FAR-MP 1, se respalda científicamente que frente a la administración de OTC vía i.p., los muestreos pre-cosecha se realicen independiente de que el tratamiento haya sido aplicado en un periodo superior a los 6 meses. Esto se debe a que con este tipo de tratamiento se logra una mayor concentración de OTC en músculo, que con el tratamiento vía oral. Por otro lado, la eliminación de OTC del músculo es más lenta por lo que, dependiente del mercado de destino, el tiempo requerido para lograr los LMR puede superar los 10 meses a 10°C.

Por otro lado, se propone que se mantenga la obligación de realizar muestreos pre-cosecha por jaula y no por centro, siempre cuando se haya realizado un tratamiento de OTC vía i.p. De acuerdo a los resultados obtenidos y a la bibliografía revisada, la variabilidad de los resultados de concentración es muy alta, por lo que debe evitarse el efecto de “dispersión de datos de concentración” por efecto de jaulas que pueden haber sido tratadas por vía oral, o no haber sido tratadas.

Se propone tomar siempre 20 muestras en los muestreos pre-cosecha cuando el tratamiento de OTC haya sido realizado vía i.p., sin importar si han recibido tratamiento oral en forma adicional. Esta modificación apunta a resguardar la seguridad de cumplimiento normativo en la liberación de cosecha con un margen de error menor, considerando que con este tipo de tratamiento, la variabilidad de concentraciones es alta, por lo que se necesita aumentar la representatividad del muestreo para disminuir el riesgo de detección de concentraciones fuera de norma según mercado de destino.



Por las mismas razones dadas anteriormente, se propuso que en los remuestreos el n3mero de muestras a tomar debe ser el mismo que el n3mero de peces muestreados originalmente. Considerando que no hay argumentos estad3sticos para tomar un menor n3mero de muestras, dado que el riesgo de detecci3n de concentraciones fuera de norma en los remuestreos es el mismo que para los muestreos.

Como se demostr3 que los peces de menor peso presentan una concentraci3n de OTC en m3sculo mayor que los de mayor peso, se debe seguir propendiendo a obtener los peces de menor peso en los muestreos pre-cosecha. De esta manera, al igual que con las otras propuestas efectuadas, se disminuye el riesgo de detecci3n de concentraciones de residuos de oxitetraciclina en m3sculo de salm3nidos para consumo humano, fuera de norma en los diferentes mercados de destino.



7. CONCLUSIONES

1. Se realizó la primera reunión de coordinación del proyecto en dependencias del FIPA en Valparaíso, lográndose acuerdos y aclaraciones respecto de detalles metodológicos y el plan de trabajo.
2. Se efectuó la revisión bibliográfica asociada a la búsqueda de información respecto de curvas de depleción de fármacos en peces.
3. Los trabajos que tienen relación con oxitetraciclina (OTC) inyectable son escasos y sólo fue posible revisar estudios de farmacocinética que consideraron administración intravenosa y arterial, pero no intraperitoneal.
4. No se encontraron trabajos de depleción de oxitetraciclina inyectable vía intraperitoneal en salmónidos publicados desde 1990 a la fecha.
5. Considerando la revisión bibliográfica asociada a estudios de depleción de fármacos en peces de cultivo, y tomando como base normas internacionales de la FDA y EMEA, más el apoyo de la información obtenida desde el SAG, se desarrollaron los protocolos base de depleción para pruebas en condiciones controladas y de campo.
6. Del mismo modo, con la información entregada por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, se pudo determinar los principales productos de OTC inyectable utilizados por la industria salmonicultora nacional.



7. Luego de analizar los productos de OTC más utilizados por la industria, y tomando en cuenta sugerencias aportadas por profesionales de la misma industria, se sugirió a Sernapesca y Subpesca los productos a evaluar.
8. Considerando que de acuerdo a recomendaciones internacionales, este tipo de estudios se deben realizar en el producto que será consumido por la población humana, se determinó que la matriz a analizar fuese músculo más piel.
9. Se confeccionaron los protocolos específicos de depleción para OTC administrada vía intraperitoneal en salmón coho, trucha arcoíris y salmón del Atlántico, en condiciones controladas y de campo. En los protocolos, se propone estudiar el producto comercial mayormente utilizados en Chile (Liquamicina LA 20%), adicionalmente se propone estudiar Magnadur (Norbrook Laboratories LTD) y Terrivet F-200 (Veterquímica).
10. Considerando las observaciones realizadas por los representantes de las autoridades sectoriales a los protocolos base de los estudios de depleción en condiciones controladas y de campo, se confeccionó una nueva versión de los mismos, la que finalmente se aplicó.
11. Se realizaron los estudios en condiciones controladas en las especies Coho, Salar y Trucha con la utilización de los productos comerciales Liquamicina, Magnadur y Terrivet F-200.
12. Se realizó un estudio en condiciones de campo en Trucha arcoíris, con la utilización de Magnadur.



13. Se confeccionaron las curvas de depleción de todos los estudios realizados, calculando el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) y el periodo de resguardo a 100 y 10 ppb.
14. No hubo diferencias de concentración de OTC en muestras de músculo obtenidas en el corte “normal” con respecto al corte que incluye el punto de inyección.
15. En todos los estudios realizados se obtiene una gran variabilidad en las concentraciones de OTC, las que son parcialmente explicadas por la variabilidad de pesos, situación esperada en este tipo de estudios.
16. Se observa en la mayoría de los casos, que los peces de menor peso tienen una concentración de OTC mayor, lo que se explica considerando que la aplicación se hace a toda la población de peces con un mismo volumen de producto, por lo que la dosis recibida por éstos es mayor.
17. El tiempo de vida media obtenido va desde los 12 días (Coho Magnadur, condiciones controladas) a los 25 días (Trucha Liquamicina, condiciones controladas).
18. En un estudio previo realizado por IFOP, pero con alimento medicado con OTC para 2 productos comerciales, se obtuvieron $T_{1/2}$ de 5 y 7 días.
19. En la bibliografía revisada, los estudios de depleción con alimento medicado en especies salmónidas de diferentes tamaños, a diferentes temperaturas y tipos de agua, reportan valores de $T_{1/2}$ entre 4 a 15 días, siendo la mayoría cercano a los 5 días.



20. La diferencia de T $\frac{1}{2}$ de tratamiento con OTC intraperitoneal, sugiere que el f3rmaco es eliminado del m3sculo en forma m3s lenta respecto al entregado por v3a oral, por lo que el per3odo de resguardo o carencia, es mayor.
21. La concentraci3n m3xima de OTC lograda en m3sculo, luego de aplicar Liquamicina a una dosis de 36 mg/Kg PV fue de 7000 ppb (7 ppm) a los 12 d3as post-tratamiento. Como comparaci3n, las concentraciones m3ximas alcanzadas en m3sculo luego de la aplicaci3n v3a alimento, indicadas en diversos estudios, no superan las 4000 ppb a los 2-4 d3as de haber finalizado el tratamiento.
22. Las altas concentraciones medidas en m3sculo se podr3an deber a que por v3a i.p., la OTC ingresa de mejor forma al organismo, con respecto a las dosis entregadas por v3a de alimento, donde se absorbe muy poca cantidad del principio activo.
23. Por v3a intraperitoneal, la biodisponibilidad del f3rmaco es mejor y se podr3an utilizar hasta 100 veces menos cantidad de antimicrobianos.
24. A pesar de utilizar menos cantidad de principio activo, la concentraci3n lograda en los tejidos, es mayor y se mantiene por m3s tiempo que con los tratamientos entregados por v3a oral.
25. Por otro lado, el per3odo de carencia es mucho mayor, por lo que habr3a que evitar el tratamiento con este producto si se pretende cosechar dentro



de los próximos 5-6 meses (dependiendo de la Tº del agua y del LMR de destino del producto).

26. Se realizó una propuesta de modificaciones al Manual de Procedimientos FAR-MP 1 de Sernapesca, con la finalidad de que el uso de oxitetraciclina intraperitoneal, no se traduzca en un rechazo del producto final debido a la presencia de residuos de antimicrobianos.
27. Se realizó un taller de difusión de los resultados con la asistencia de personal de Sernapesca, Subpesca, laboratorios farmacéuticos, empresas salmoniculoras y laboratorios de servicio.
28. Se elaboró un manuscrito científico con los resultados del presente estudio, para ser publicada en la revista Aquaculture.



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedini, S., Namdari, R., Law, F.C.P., 1998. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in rainbow trout and chinook salmon. *Aquaculture*. 162, 23-32.
- Alday-Sanz, V., Corsin, F., Irde, E., Bondad-Reantaso, M.G., 2012. Survey on the use of veterinary medicines in aquaculture. in: Bondad-Reantaso, M.G., Arthur, J.R., Subasinghe, R.P. (Eds.), *Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production* pp 29-45. *Fao Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, Rome, pp. 29-45.
- Alderman, D.J., Hastings, T.S., 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks*. *International Journal of Food Science & Technology*. 33, 139-155.
- Anonymous, 1998. Control de enfermedades es clave para consolidar la acuicultura. *Aquanoticias internacional*. 10(40), 62-65.
- Baggot, J.D., 2001. *The physiological basis of veterinary clinical pharmacology*. Blackwell Science Ltd.
- Barnes, A., Hastings, T., Amyes, S., 1995. Aquaculture antibacterials are antagonized by seawater cations. *Journal of Fish Diseases*. 18, 463-465.
- Bebak-Williams, J., Bullock, G., Carson, M.C., 2002. Oxytetracycline residues in a freshwater recirculating system. *Aquaculture*. 205, 221-230.
- Bernoth, E., 1991. Possible hazards due to fish drugs. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 11, 17-21.



- Björklund, H., Bylund, G., 1990. Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*. 84, 363-372.
- Björklund, H., Bondestam, J., Bylund, G., 1990. Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*. 86, 359-367.
- Björklund, H., Eriksson, A., Bylund, G., 1992. Temperature-related absorption and excretion of oxolinic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 102, 17-27.
- Björklund, H.V., Råbergh, C.M.I., Bylund, G., 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*. 97, 85-96.
- Bruno, D., 1989. An investigation into oxytetracycline residues in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*. 12, 77-86.
- Black, W., Ferguson, H., Byrne, P., Claxton, M., 1991. Pharmacokinetic and tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout following bolus intravenous administration. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 14, 351-358.
- Coyne, R., Samuelsen, O., Bergh, Ø., Andersen, K., Pursell, L., Dalsgaard, I., Smith, P., 2004a. On the validity of setting breakpoint minimum inhibition concentrations at one quarter of the plasma concentration achieved following oral administration of oxytetracycline. *Aquaculture*. 239, 23-35.
- Coyne, R., Samuelsen, O., Kongshaug, H., Andersen, K., Dalsgaard, I., Smith, P., Bergh, Ø., 2004b. A comparison of oxolinic acid concentrations in farmed and laboratory held rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following oral therapy. *Aquaculture*. 239, 1-13.



- Coyne, R., Smith, P., Dalsgaard, I., Nilsen, H., Kongshaug, H., Bergh, Ø., Samuelsen, O., 2006. Winter ulcer disease of post-smolt Atlantic salmon: An unsuitable case for treatment? *Aquaculture*. 253, 171-178.
- Dempster, T., Uglem, I., Sanchez-Jerez, P., Fernandez-Jover, D., Bayle-Sempere, J., Nilsen, R., Bjørn, P.A., 2009. Coastal salmon farms attract large and persistent aggregations of wild fish: an ecosystem effect.
- Elema, M.O., Hoff, K.A., Kristensen, H.G., 1996. Bioavailability of oxytetracycline from medicated feed administered to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater. *Aquaculture*. 143, 7-14.
- EMA, 1997. Committee for veterinary medicinal products. Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods. EMA/CVMP/036/95-Final.
- EMA, 2003. Committee for medicinal products (CVMP). Guideline on injection site residues. EMA/CVMP/542/03-FINAL.
- EMA, 2011. Guideline on demonstration of target animal safety and efficacy of veterinary medicinal products intended for use in farmed finfish. EMA/CVMP/EWP/459868/2008.
- FDA, 2005. Guidance for Industry No. 3, General Principles for Evaluating the Safety of Compounds Used in Food-Producing Animals. Rockville, MD, Section IV.
- Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, K., Hasegawa, T., Ohta, M., 2003. Similarity of Tetracycline Resistance Genes Isolated from Fish Farm Bacteria to Those from Clinical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 5336-5342.



- Gratzek, J.B., 1983. Control and therapy of fish diseases. *Advances in veterinary science and comparative medicine*. 27, 297.
- Grave, K., Lingaas, E., Bangen, M., R3nning, M., 1999. Surveillance of the overall consumption of antibacterial drugs in humans, domestic animals and farmed fish in Norway in 1992 and 1996. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43, 243-252.
- Grondel, J., Nouws, J., Schutte, A., Driessens, F., 1989. Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 12, 157-162.
- Hansen, P.K., Lunestad, B.T., O.B., S., 1992. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming. Pages 174-178. In: C. Michel and D. Alderman (Editors). *Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality*. Office International des Epizootics, Paris.
- Haug, T., Hals, P.A., 2000. Pharmacokinetics of oxytetracycline in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) in freshwater at low temperature. *Aquaculture*. 186, 175-191.
- Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V., Yndestad, M., 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture*. 133, 175-184.
- IFOP, 2014a. INFORME T3CNICO FINAL: Establecimiento y armonizaci3n de protocolos para la elaboraci3n, entrega y evaluaci3n de alimentos medicados para la industria del salm3n INNOVACHILE 09MCSS-6706 /Enero 2014.



- IFOP, 2014b. INFORME FINAL: Monitoreo de la eficacia y seguridad de productos biológicos y determinación de las curvas de depleción de productos farmacológicos utilizados en la salmonicultura 2013. Subsecretaría de Economía- Convenio I: Asesoría Integral Para la Pesca y Acuicultura, 2013.
- Jacobsen, P., Berglind, L., 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture*. 70, 365-370.
- Jacobsen, M., 1989. Withdrawal times of freshwater rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimetoprim. *Journal of Fish Diseases*. 12, 29-36.
- Lunestad, B.T., Goksøyr, J., 1990. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Diseases of aquatic organisms*. 9, 67-72.
- Martinsen, B., Horsberg, T.E., 1995. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin, and enrofloxacin, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater at 10 degrees C. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 39, 1059-1064.
- Martinsen, B., Myhr, E., Reed, E., HåStein, T., 1991. In vitro antimicrobial activity of sarafloxacin against clinical isolates of bacteria pathogenic to fish. *Journal of aquatic animal health*. 3, 235-241.
- Meinertz, J.R., Gaikowski, M.P., Stehly, G.R., Gingerich, W.H., Evered, J.A., 2001. Oxytetracycline depletion from skin-on fillet tissue of coho salmon fed oxytetracycline medicated feed in freshwater at temperatures less than 9°C. *Aquaculture*. 198, 29-39.



- Miller, R.A., 2007. Development of Standardized Antimicrobial Susceptibility Testing Methods and *Aeromonas Salmonicida* Epidemiologic Cutoff Values for Antimicrobial Agents Used in Aquaculture. ProQuest.
- Miller, R.A., Pelsor, F.R., Kane, A.S., Reimschuessel, R., 2012. Oxytetracycline pharmacokinetics in rainbow trout during and after an orally administered medicated feed regimen. *Journal of aquatic animal health*. 24, 121-128.
- MINAGRI, 2012. Decreto 25. Fecha Promulgación: 14-02-2005. Versión: 12-07-2012. Aprueba reglamento de productos farmaceuticos de uso exclusivamente veterinario.
- Ministerio de Salud, S.d.S.P., 2015. Resolución 551 Exenta. Fija Límites Máximos de Residuos De Medicamentos Veterinarios En Alimentos Para Consumo Humano. Fecha de Publicación: 19-08-2014. Inicio Vigencia: 16-01-2015.
- Namdari, R., Abedini, S., Law, F.C.P., 1996. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in seawater chinook and coho salmon following medicated-feed treatment. *Aquaculture*. 144, 27-38.
- Namdari, R., Abedini, S., Law, F., 1999. A comparative tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture research*. 30, 279-286.
- Norambuena, L., Gras, N., Contreras, S., 2013. Development and validation of a method for the simultaneous extraction and separate measurement of oxytetracycline, florfenicol, oxolinic acid and flumequine from marine sediments. *Marine pollution bulletin*. 73, 154-160.



- Nygaard, K., Lunestad, B.T., Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V., 1992. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture*. 104, 31-36.
- Pursell, L., Samuelsen, O.B., Smith, P., 1995. Reduction in the in-vitro activity of flumequine against *Aeromonas salmonicida* in the presence of the concentrations of Mg²⁺ and Ca²⁺ ions found in sea water. *Aquaculture*. 135, 245-255.
- Reeves, P.T., 2011. Drug residues. In: *Comparative and Veterinary Pharmacology*, F. Cunningham Ed., 265-290.
- Reimschuessel, R., Stewart, L., Squibb, E., Hirokawa, K., Brady, T., Brooks, D., Shaikh, B., Hodsdon, C., 2005. Fish drug analysis—Phish-pharm: A searchable database of pharmacokinetics data in fish. *AAPS J.* 7, E288-E327.
- Rigos, G., Smith, P., 2013. A critical approach on pharmacokinetics, pharmacodynamics, dose optimisation and withdrawal times of oxytetracycline in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*.
- Riviere, J., Mason, S., 2011. Tissue residues and withdrawal times. In: *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications*, Second Edition, Edited by Jim E. Riviere, 413-424.
- Riviere, J.E., 2011. *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications*, Second Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Rogstad, A., Hormazabal, V., Ellingsen, O.F., Rasmussen, K.E., 1991. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish. I. Absorption, distribution and accumulation in rainbow trout in freshwater. *Aquaculture*. 96, 219-226.



- Ross, L.G., Ross, B., Ross, B., 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals.
- Samuelsen, O.B., 1989. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture*. 83, 7-16.
- Samuelsen, O.B., 1992. The fate of antibiotics/chemotherapeutics in marine aquaculture sediments. Pages 162-173. In: C. Michel and D. Alderman (Editors). *Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality*. Office International des Epizootics, Paris.
- Samuelsen, O.B., Lunestad, B.T., Ervik, A., Fjelde, S., 1994. Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture*. 126, 283-290.
- Samuelsen, O.B., Lunestad, B.T., Hannisdal, R., Bannister, R., Olsen, S., Tjensvoll, T., Farestveit, E., Ervik, A., 2015. Distribution and persistence of the anti sea-lice drug teflubenzuron in wild fauna and sediments around a salmon farm, following a standard treatment. *Science of the Total Environment*. 508, 115-121.
- Schlotfeldt, H.J., 1992. Current practices of chemotherapy in fish culture. Pages 25-38. In: C. Michel and D. Alderman (Editors). *Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality*. Office International des Epizootics, Paris.
- Sernapesca, 2015a. LAB/NT1/Enero 2015. Programa de Laboratorios. Norma Técnica. Métodos de Muestreo de Productos Pesqueros de Exportación.
- Sernapesca, 2015b. FAR/MP1/Mayo 2015. Programa de Control de Fármacos. Manual de Procedimientos. Programa de Control de Residuos de



Productos Farmacéuticos, Sustancias Prohibidas, Sustancias No Autorizadas y Contaminantes.

Sernapesca, 2015c. CER/NT3/Noviembre 2015. Programa de Certificación. Norma Técnica. Requisitos Sanitarios para la Certificación de Productos Pesqueros de Exportación, de acuerdo a los Mercados de Destino.

Sernapesca, 2015d. LAB/NT4/Marzo 2015. Programa de Laboratorios. Norma Técnica. Métodos de Análisis de Residuos de Productos Farmacéuticos y Contaminantes para Productos Pesqueros de Exportación..

Smith, P., 1996. Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence. *Aquaculture*. 146, 157-169.

Toutain, P., Ferran, A., Bousquet-Melou, A., 2011. Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: *Comparative and Veterinary Pharmacology*, F. Cunningham Ed., 19-48.

Uno, K., Aoki, T., Ueno, R., Maeda, I., 1997. Pharmacokinetics of Oxytetracycline in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Following Bolus Intravenous Administration. *Fisheries science*. 63, 90-93.

Van der Heijden, M.H.T., Van Muiswinkel, W.B., Grondel, J.L., Boon, J.H., 1992. Immunomodulating effects of antibiotics. Pages 219-230. In: C. Michel and D. Alderman (Editors). *Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality*. Office International des Epizootics, Paris.

Van der Heijden, M.H.T., Keukens, H.J., van den Nieuwboer, W.H.F.X., Mengelers, M.J.B., Boon, J.H., 1994. Plasma disposition of flumequine in common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758), African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell,



1822) and European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) after a single peroral administration. *Aquaculture*. 123, 21-30.

Vaughan, S., Coyne, R., Smith, P., 1996. The critical importance of sample site in the determination of the frequency of oxytetracycline resistance in the effluent microflora of a fresh water fish farm. *Aquaculture*. 139, 47-54.

VICH GL48 (R), 2015. Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods.

A N E X O S

A N E X O 1

Listado de solicitudes efectuadas al servicio para
autorización de uso extra-etiqueta de OTC en
salmonicultura por las empresas salmoneras
los últimos 5 años.



550

IFOP/DIA/Nº 057/2015/DIR/ 451
SERNAPESCA

Ant.: No hay.

Adj.: No hay.

Mat.: Solicitud de información para proyecto FIP Nº 2014-91.

RECIBIDO POR *Pastina*
IFOP PUERTO MONTI

Con fecha 2 de julio de 2015.

Valparaiso, 30 de junio de 2015

A : Director Nacional del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura

DE : Director Ejecutivo del Instituto de Fomento Pesquero

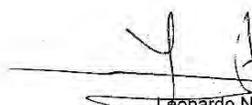
Con el propósito de dar cumplimiento con los objetivos definidos en el proyecto FIP Nº 2014-91: "Impactos asociados con el uso extraetiqueta del principio activo oxitetraciclina, vía intraperitoneal en centros de cultivo de salmónidos sobre el programa de control de fármacos vigente", solicito a usted tenga a bien, aportar los siguientes antecedentes:

- Listado de solicitudes efectuadas al Servicio para autorización de uso extra etiqueta de oxitetraciclina en salmonicultura, con detalle de empresa, cantidad y producto, para los últimos 5 años.
- Información de la cantidad utilizada de oxitetraciclina inyectable del producto registrado para uso en salmones (registro SAG Nº 2252-B).

Toda la información entregada por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura será manejada por el Instituto de forma estrictamente confidencial.

Finalmente hago presente a usted, la disposición de este Instituto para aclarar o complementar cualquier antecedente relacionado con esta materia.

Sin otro particular, saluda atentamente a usted,


 Leonardo Núñez
 Director Ejecutivo
 Instituto de Fomento Pesquero



Distribución:
1. SERNAPESCA
2. IFOP

c.c: DIR
CP
DIA
DSH ✓
Rodrigo Leiva
Crono

SERVICIO NACIONAL
DE PESCA Y ACUICULTURA
01 JUL 2015
Angelo Pizarro Gallardo
Rut: 16.753.515-1

FC-3 / IT-2 / PD-4-1

1

A N E X O 2

Respuestas a Observaciones a los
protocolos Estudios IFOP.



Respuestas a Observaciones a los Protocolos Estudios IFOP

A. Observaciones comunes a los 2 protocolos:

1. Introducción:

- a) El planteamiento de que solo un 30% del alimento medicado es consumido por lo peces es obsoleto (referencia es del año 1992), pues en la actualidad no menos de 85% del alimento suministrado es totalmente ingerido por los peces y jamás, salvo accidentes o errores durante los procesos de alimentación, cae más del 5% sin consumirse al lecho marino. Por lejos, el mayor aporte de residuos orgánicos lo constituye el material fecal de los peces. La diferencia entre ambos valores se asigna a pérdidas o mermas (alimento pulverizado y/o alterado).

Se requiere modificar la información con referencias de bibliografía actualizada de alimentación de peces.

Respuesta IFOP: Se actualizará la referencia y se modificará la información.

- b) La afirmación de que la oxitetraciclina presenta baja tasa de absorción carece de referencias cuantitativas.

Se requiere justificar la información con referencias actualizadas y cuantificadas de la farmacocinética de distribución de los antimicrobianos de mayor empleo, incluyendo los de interés para este estudio.

Respuesta IFOP: Se justificará la información con referencias que se disponen.

- c) La definición de Período de Resguardo señalada indica que es el “*tiempo de espera entre el termino de la medicación y el sacrificio de los peces*”, lo que no es correcto, pues corresponde al tiempo entre el término del tratamiento y el momento en que los niveles residuales de cualquier medicamento (o su residuo marcador), en el tejido blanco, se hallan por debajo del Límite Máximo Residual (LMR) definido por la autoridad (percentil 99, con 95% de confianza).



Respuesta IFOP: Se aclarará la afirmación. Corresponde al tiempo necesario para que las concentraciones estén bajo el límite aceptado (LMR o tolerancia).

- d) Se sugiere indicar aquéllos antibióticos, en que la extensión de la depleción es dosis-dependiente, a diferencia de los tiempo-dependientes

Respuesta IFOP: La extensión de la depleción siempre será dependiente de la concentración que alcance el antibiótico en el músculo a determinada dosis. Por su parte, el tiempo de vida media, no es dependiente de la concentración inicial del antibiótico en el músculo, ya que es el tiempo que demora en bajar la concentración del antibiótico a la mitad.

I. Protocolo para la obtención de curvas de depleción de OTC administrada vía intraperitoneal en trucha arcoíris, salmón coho y salmón del Atlántico en salmónidos en condiciones controladas.

B. Protocolo Estudio Controlado:

1. Diseño del estudio:

- a) **Animales:** como criterio de selección los peces a utilizar no debieran haber sido tratados previamente con oxitetraciclina.

Respuesta IFOP: Será explicitado en el protocolo.

- b) **Temperatura del estudio:** no basta con llevar un registro de la temperatura durante el estudio. Dado que la duración de la depleción en especies poiquilothermas (peces) es dependiente de la temperatura ambiental, es necesario establecer una temperatura fija (o con mínima variación), que refleje



las condiciones usuales de cultivo, y no dejar esta variable libre, pues dificultaría la interpretación de los resultados.

Respuesta IFOP: La temperatura de los estanques corresponde a la usual de cultivo en la zona de Chiloé norte. En este sentido se cumple con el parámetro de ser equivalente las condiciones de campo.

Fármaco Utilizado:

- a) Se considera que la depleción debiera evaluarse al menos para salmón del Atlántico y trucha arcoiris.

Respuesta IFOP: Los protocolos indican que se realizarán estudios de depleción en salmón del Atlántico, trucha arcoiris y salmón Coho.

No se indican las dosis a las cuales serán administrados los antimicrobianos y la justificación.

Respuesta IFOP: En el punto 3.2 del protocolo se indica: “dosis única equivalente a 30 mg de Oxitetraciclina/Kg de P.V.” La dosis seleccionada es producto de encuestas realizadas a encargados del tema en empresas productoras, donde indicaron que era esta la dosis más utilizada por la industria.

Al respecto, se espera un consenso con Sernapesca, para dejar o no esta dosis como la definitiva.

En relación al producto Magnadur, respecto al cual se indica que “de acuerdo a conversaciones con productores es un producto muy diferente”, se solicita objetivar con antecedentes de su composición que justifique su selección.



Respuesta IFOP: En el sistema en línea de búsqueda de medicamentos veterinarios autorizados por el SAG se puede observar que la forma farmacéutica de Terrivet F200 y Liquamicina LA corresponden una suspensión inyectable. Magnadur en cambio, es una solución inyectable. Se explicitará en el protocolo.

2. Metodología de muestreo:

- a) Considerar el envío de contramuestras al laboratorio FAVET para todos los tiempos de muestreo.

Respuesta IFOP: Se considera el envío de parte de las contramuestras, para todos los tiempos que se soliciten por parte de Sernapesca, al Laboratorio de Referencia, de acuerdo a lo consensuado en la reunión de inicio del proyecto con representantes del Servicio.

3. Programación:

- a) Se solicita justificar los tiempos de muestreos seleccionados.

Respuesta IFOP: Los 8 tiempos de muestreo inicialmente propuestos en el protocolo a realizar bajo condiciones controladas, se aplicarán con el primer producto a estudiar. Una vez obtenidos los resultados de los análisis, se seleccionarán los 4 tiempos de muestreo que entreguen resultados cuantificables con una menor concentración, y con los que se pueda confeccionar una curva de depleción válida.

Una vez realizado este análisis, estos cuatro tiempos de muestreo se utilizarán en los otros dos estudios de productos restantes, cumpliendo



con los tiempos mínimos exigidos por la normativa internacional (FDA y EMA) que indica al menos 4 tiempos.

- b) Se sugiere utilizar el software establecido por EMA para el cálculo de la depleción, el cual se encuentra disponible en su sitio web.

Respuesta IFOP: Se utilizará el software indicado, será explicitado en los protocolos.

- c) Se recomienda en general usar las Guías para la realización de estudios de depleción de EMA, y disponibles en su sitio web y que son las mismas Guías para la realización estudios de farmacocinética establecidos por VICH y utilizados por las empresas farmacéuticas y considerados por SAG para validar estos estudios.

Respuesta IFOP: Se explicitará en los protocolos las guías utilizadas como referencia.

4. Obtención de las curvas de depleción:

Es necesario que se describan las capacidades del laboratorio, incluyendo equipos y personal, e información respecto al método analítico, incluyendo validaciones y referencias. Límites de detección y cuantificación.

Para calcular los periodos de resguardo se deben considerar los distintos LMR.

Respuesta IFOP: Para realizar el cálculo de los período de resguardo se considerarán como LMR 10 y 100 ppb, lo que se explicitará en los protocolos.



II. Protocolo para la obtenci3n de curvas de depleci3n de OTC administrada v3a intraperitoneal en salm3nidos en condiciones de campo.

C. Protocolo Estudio de Campo:

En general ambos estudios debieran ajustarse para ser realizados bajo las mismas condiciones que es posible definir: especies, f3rmacos a evaluar, n3mero de peces a muestrear, tiempos de muestreo, etc., considerando las observaciones realizadas anteriormente.

Respuesta IFOP: Si bien las condiciones de campo estar3n supeditadas a la disponibilidad y factibilidad de acceder a los muestreos en los centros productivos de las empresas productoras que apoyen el estudio, considerando que en condiciones controladas se evaluar3n las 3 especies, no hay forma que 3stas no coincidan en campo. Respecto de las presentaciones farmac3uticas a evaluar, 3stas se restringir3n en campo, a una de las tres previamente evaluadas en condiciones controladas. Los tiempos de muestreo y n3mero de peces, se mantendr3n inalterables en ambos estudios.

A N E X O 3

Protocolo para la obtención de curvas de depleción de Oxitetraciclina (OTC) administrada vía intraperitoneal en Trucha Arcoíris (*O. mykiss*), Salmón Coho (*O. kisutch*) y Salmón del Atlántico (*S. salar*) en condiciones controladas, versión 2.



PROTOCOLO:

Para la obtenci3n de curvas de depleci3n de Oxitetraciclina (OTC) administrada v3a intraperitoneal en trucha arco3ris (*O. mykiss*), salm3n coho (*O. kisutch*) y salm3n del atl3ntico (*S. salar*) **en condiciones controladas**

(Versi3n 2.0 / Septiembre 2015)

Preparado por el:

**Departamento de
Salud Hidrobiol3gica del
Instituto de Fomento Pesquero**



1. Introducci3n

La acuicultura en Chile es una de las actividades econ3micas de mayor desarrollo en las 3ltimas d3cadas, generando altos ingresos para el pa3s. El aumento productivo de la industria ha tra3do consigo la aparici3n de enfermedades de etiolog3a bacteriana, para lo cual se ha intensificado el uso de agentes antimicrobianos como medida de tratamiento. Su utilizaci3n puede traer consecuencias en la salud veterinaria y humana, como por ejemplo, persistencia de residuos en producto final y el entorno, as3 como la persistencia del fen3meno de resistencia bacteriana.

La forma m3s habitual de administraci3n de antibi3ticos en peces corresponde a su incorporaci3n en el alimento. Cuando los productos farmac3uticos son administrados v3a oral, 3stos entran al medio ambiente como alimento no ingerido, o como eliminaci3n v3a urinaria o fecal (Samuelsen et al., 2015, Dempster et al., 2009). La Oxitetraciclina es absorbida por los peces en un 60-80% cuando el est3mago est3 vac3o, sin embargo por la presencia de cationes divalentes y trivalentes en el agua se disminuye su actividad antimicrobiana (Miller, 2007). La disminuci3n de la actividad no es solucionada del todo con la encapsulaci3n del alimento, ya que para ser absorbida, la OTC debe ser previamente solubilizada en el est3mago del pez, por lo que se mezclar3a con los fluidos de 3ste (Miller, 2007). Como resultado de un proyecto realizado por el IFOP (IFOP, 2014b) se determin3 que el principio activo estar3a biodisponible para el pez entre un 50% a un 70%. Coyne *et al* (2004a, 2004b, 2006) demostraron que en tratamientos metafil3cticos comerciales con alimentos medicados, en los peces moribundos altamente infectados, la concentraci3n s3rica de antibi3tico es despreciable comparado con la subpoblaci3n sana, lo que puede deberse a que los peces enfermos pr3cticamente no se alimentan (Rigos and Smith, 2013).

Por otro lado, estudios han demostrado que antibacterianos como oxitetraciclina, flumequina y 3cido oxol3nico persisten por meses en el sedimento de los sistemas de cultivo despu3s de su administraci3n oral (Jacobsen and Berglind, 1988, Bj3rklund *et al.*, 1990, Hansen *et al.*, 1992, Nygaard *et al.*, 1992, Samuelsen, 1992, Samuelsen *et al.*, 1994, Hektoen *et al.*, 1995, Smith, 1996). De igual modo, algunos investigadores (Jacobsen and Berglind, 1988, Samuelsen, 1989), han



informado una vida media de 10 semanas y 32-64 días, respectivamente, para la oxitetraciclina en sedimentos de centros de cultivo.

Estos antecedentes, y la baja eficacia observada en terreno de los antimicrobianos entregados vía oral frente a brotes declarados en centros de cultivo, han llevado a los productores a buscar alternativas terapéuticas, como el uso extra-etiqueta de antimicrobianos inyectables destinados a otras producciones animales, situación que está contemplada como factible dentro de la normativa.

Un componente esencial en el control de producto final libre o con niveles aceptables de residuos de fármacos es obtener los periodos de resguardo de cada fármaco (Reeves, 2011). El periodo de resguardo es el tiempo de espera necesario desde el término de la medicación para que los tejidos animales disminuyan sus concentraciones a niveles a los cuales puedan ser sacrificados en forma segura para que puedan ser consumidos con seguridad (Reeves, 2011) o para que alcancen niveles bajo el límite legal (Riviere and Mason, 2011).

Para el cálculo de este periodo de resguardo es necesario conocer el decaimiento de los fármacos dentro del animal. Esto se obtiene realizando estudios de depleción donde se medican a los animales de acuerdo a las dosis recomendadas por cada fabricante y se obtiene muestras de matrices biológicas desde la suspensión de la medicación (Riviere and Mason, 2011). Así, las curvas de depleción son estudios de farmacocinética, toda vez que se evidencia el cambio de concentraciones a través del tiempo. La depleción generalmente es de tipo lineal en todos los compartimentos farmacocinéticos y dependiente de procesos de metabolización y excreción renal, fecal, branquial o por mucus de piel (Riviere, 2011).



2. Objetivos

Obtener las curvas de depleción de las presentaciones comerciales de Oxitetraciclina vía intraperitoneal, mayormente utilizadas en la salmonicultura nacional, desde muestras de músculo con piel de trucha arcoíris, salmón coho y salmón del atlántico, bajo condiciones controladas.

3. Diseño del Estudio

3.1.- Animales.

- Por cada especie a estudiar, se distribuirán 3 grupos de peces de 47 ejemplares cada uno, en estanques de 2 m³. Se trabajará con Trucha arcoíris, Salmón Coho y Salmón del Atlántico. Los peces no deben haber sido previamente tratados con OTC.
- Se mantendrá registro diario de la temperatura de los estanques. La temperatura de los estanques corresponde a la usual de cultivo en la zona de Chiloé norte.
- Durante todo el ensayo se mantendrá un fotoperiodo ambiental normal de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.
- Concentración de oxígeno: Se mantendrá un nivel de oxígeno entre 6 y 10 mg/l, siendo el ideal 10 mg/L. Se mantendrá un registro diario de la concentración de oxígeno disuelto en estanques.
- Control del flujo de agua de los estanques: se mantendrá un flujo de agua de aproximadamente 34 lt/min.
- Peso vivo inicial: Se iniciará el estudio con peces de un peso vivo promedio de 1400 gramos +/-300 gramos.
- Estado fisiológico: Se utilizarán peces sanos y libres de enfermedades concomitantes.



- Densidades poblacionales: los peces se mantendr3n a densidades comerciales (25 kilos de peso vivo/m³) a una salinidad de 30 ± 2 ‰.
- Los peces ser3n alimentados con una dieta comercial a saciedad. La alimentaci3n ser3 dos veces por d3a, realizado por un alimentador asignado. La dosis diaria entregada ser3 registrada para cada estanque. La alimentaci3n se suspender3 24 horas antes de la inyecci3n del f3rmaco para ser restituida al d3a siguiente del tratamiento.
- Criterio(s) de inclusi3n/exclusi3n: Se incluir3n aquellos animales sanos y que est3n dentro los pesos vivos establecidos.
- Aclimataci3n de los animales: La aclimataci3n de los peces ser3 de al menos 7 d3as antes del inicio del estudio, sin realizar otros manejos sanitarios y aliment3ndose con una f3rmula comercial no medicada.
- Limpieza de estanques: se realizar3 una limpieza diaria de los estanques bajo las rejillas y d3a por medio en las paredes laterales y de fondo a las 15 hrs.

3.2.- F3rmaco utilizado.

El estudio se realizar3 utilizando los siguientes productos comerciales:

1.- Liquamicina LA 20%. Suspensi3n inyectable.

2.- Magnadur 30%. Soluci3n inyectable.

3.- Terrivet F200. Suspensi3n inyectable.

- Dosis: dosis 3nica equivalente a 30 mg de Oxitetraciclina/Kg de P.V.
- V3a de administraci3n: v3a intraperitoneal.



3.3.- Tratamiento

Los peces serán extraídos desde el estanque original y puestos en un estanque con una solución anestésica. La solución anestésica consistirá en 0,25 g de benzocaína, disuelta primero en alcohol absoluto y luego adicionada a 10 l de agua. Una vez que los peces hayan alcanzado el plano anestésico III (Ross *et al.*, 2008), se tomarán individualmente y se sostendrán con la cara ventral hacia arriba y con la cabeza lejos del cuerpo del operador. El tamaño de la aguja deberá ser la apropiada para el tamaño de los peces. La aguja se insertará lentamente en un ángulo de aproximadamente 90° en la línea media ventral entre las aletas pectorales y las pélvicas. Se inyectará intraperitonealmente la dosis mencionada anteriormente. Luego los peces serán transferidos al estanque original.

3.4.- Metodología de Muestreo.

En cada uno de los estanques, se realizará 1 muestreo de 3 peces antes de realizar el tratamiento como tiempo 0. Posteriormente se realizarán 8 muestreos programados, de 5 peces por tiempo de muestreo, a los 14, 21, 35, 42, 49, 56, 63 y 98 días desde el tratamiento (para realizar la curva de depleción).

Los 8 tiempos de muestreo propuestos se aplicarán en el primer estudio a realizar. Una vez obtenidos los resultados de éste, se seleccionarán los 4 tiempos de muestreo que entreguen resultados cuantificables con una menor concentración, y con los que se pueda realizar una curva de depleción válida. Los 4 tiempos de muestreo seleccionados, se utilizarán para realizar todos los estudios restantes, tanto en condiciones controladas, como de campo.

Los 8 tiempos de muestreo fueron propuestos basados en los resultados de un proyecto recientemente realizado por el IFOP (2014a), tomando como antecedente que en este caso, por la forma de administración, teóricamente la concentración alcanzada en el pez debería ser mayor, lo que implicaría que el tiempo de depleción sea mayor.

Los peces serán sacrificados por golpe mortal en la cabeza. El tipo de muestra obtenido se hará de acuerdo a la Norma Técnica del Sernapesca LAB/NT1(2015):



- Antes de trozar el pescado, este deber3 ser eviscerado completamente.
- Se har3 un corte transversal al eje al pescado, por detr3s de la aleta dorsal y delante de la aleta anal.
- Se obtendr3 los filetes sin tejido cartilaginoso y 3seo, siendo un lado la muestra y el otro la contramuestra.

Adicionalmente se tomar3 una segunda muestra que incluya el sitio de inyecci3n:

- El trozo incluye desde el corte transversal realizado detr3s de la aleta dorsal hasta un corte transversal detr3s de la aleta pectoral, siendo un lado la muestra y el otro la contramuestra.

La muestra y contramuestra obtenidas se introducir3n en bolsas pl3sticas, se sellar3n, identificar3n y se mantendr3n congelados a -20°C en freezer hasta el env3o al laboratorio de IFOP-Puerto Montt. Todo el procedimiento se realizar3 a mano descubierta, sin guantes. De acuerdo a lo consensuado en la reuni3n de inicio del proyecto, se considera el env3o de parte de las contramuestras, para todos los tiempos que sean solicitados por Sernapesca, al Laboratorio de referencia FAVET.

Pese a que la Norma T3cnica del Sernapesca LAB/NT1 (2015) se3ala que la muestra debe ser de al menos 400 gramos, en este caso se privilegia el sector de la muestra, por sobre su tama3o, con fines comparativos.

3.5.- Retiro de individuos del estudio.

Aquellos individuos que presenten evidencias de trastornos cl3nico-patol3gicos ser3n retirados del estudio y sacrificados.



4. Programación.

- Día -14 a 0 : Aclimatación de peces
- Día 0 : muestreo 3 peces por jaula (antes de inyectar).
- Día 0 : Inyección de OTC
- Día 14 postratamiento : muestreo 5 peces
- Día 21 postratamiento : muestreo 5 peces
- Día 35 postratamiento : muestreo 5 peces
- Día 42 postratamiento : muestreo 5 peces
- Día 49 postratamiento : muestreo 5 peces
- Día 56 postratamiento : muestreo 5 peces
- Día 63 postratamiento : muestreo 5 peces
- Día 98 postratamiento : muestreo 5 peces

5. Mediciones, observaciones, resultados y registros.

Se mantendrá una Bitácora de Estudio donde se registrarán diariamente observaciones como apetito, letargia, entre otros. Adicionalmente, se monitoreará diariamente a todo el grupo experimental por sintomatología clínica anormal.

Se registrará diariamente la temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto de los estanques y se mantendrán en fichas de cada estanque de experimentación por todo el estudio.

6. Obtención de las curvas de depleción.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analizará la concentración de Oxitetraciclina (OTC) de las muestras obtenidas. Posteriormente se obtendrán las curvas de depleción graficando el logaritmo natural (Ln) de concentración de OTC versus el tiempo en días, y se obtendrá la ecuación de la recta. Para que la experiencia sea válida se deben cuantificar al menos 3 puntos de la recta. Es necesario que la regresión lineal, cumpla con los siguientes requisitos: homogeneidad de las varianzas del Ln de concentración de OTC obtenido en cada



día de muestreo, linealidad de Ln de concentración de OTC obtenido versus tiempo (se puede ver visualmente en el gráfico), distribución normal de errores (se puede ver con un gráfico de residuales). Con las curvas de depleción se calculara el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de OTC en piel y músculo de los diferentes salmónidos.

Para el cálculo del período de resguardo, se utilizará el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” establecido por EMA para este efecto, el cual se encuentra disponible en su página web. Para el cálculo del periodo de resguardo se considerarán como LMR de OTC 10 y 100 ppb.

Se compararán las curvas de depleción de los dos tipos de muestras, la obtenida a partir del corte tradicional de los ensayos de pre-cosecha (Sernapesca, 2015) y la obtenida que incluye el punto de inyección.

La realización de este estudio se basa en una guía de EMA (1997), que entrega los estadísticos más apropiados para el cálculo del tiempo de resguardo (Rigos and Smith, 2013).

7. Informe.

Finalizado el estudio, se confeccionará un informe de estudio que resumirá los resultados obtenidos.

8. Manejo de la información generada.

Durante el desarrollo del estudio, la Bitácora de Estudio y todo registro bruto se mantendrá dentro del Módulo Experimental de Especies Hidrobiológicas, IFOP Hueihue y con acceso restringido.

Finalizado el estudio, todo registro será mantenido y archivado en dependencias de IFOP, Puerto Montt.



9. Eventos inesperados.

Cualquier evento inesperado del desarrollo del estudio será documentado en la Bitácora de Estudio y se informará inmediatamente al Director del Estudio.

10. Personal participante.

- Director del Estudio: Sergio Contreras L.
- Investigador Principal del Estudio: Luis Norambuena S.
- Investigadores a cargo del Módulo Experimental de Especies Hidrobiológicas: Mylena Menanteau y Loreto Ovalle.
- Personal Técnico en Modulo Experimental de Especies Hidrobiológicas: Dany Álvarez y Cristian Oyarzo



11. Bibliografía

- BJÖRKLUND, H., BONDESTAM, J. & BYLUND, G. 1990. Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*, 86, 359-367.
- COYNE, R., SAMUELSEN, O., BERGH, Ø., ANDERSEN, K., PURSELL, L., DALSGAARD, I. & SMITH, P. 2004a. On the validity of setting breakpoint minimum inhibition concentrations at one quarter of the plasma concentration achieved following oral administration of oxytetracycline. *Aquaculture*, 239, 23-35.
- COYNE, R., SAMUELSEN, O., KONGSHAUG, H., ANDERSEN, K., DALSGAARD, I., SMITH, P. & BERGH, Ø. 2004b. A comparison of oxolinic acid concentrations in farmed and laboratory held rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following oral therapy. *Aquaculture*, 239, 1-13.
- COYNE, R., SMITH, P., DALSGAARD, I., NILSEN, H., KONGSHAUG, H., BERGH, Ø. & SAMUELSEN, O. 2006. Winter ulcer disease of post-smolt Atlantic salmon: An unsuitable case for treatment? *Aquaculture*, 253, 171-178.
- DEMPSTER, T., UGLEM, I., SANCHEZ-JEREZ, P., FERNANDEZ-JOVER, D., BAYLE-SEMPERE, J., NILSEN, R. & BJØRN, P. A. 2009. Coastal salmon farms attract large and persistent aggregations of wild fish: an ecosystem effect.
- EMEA 1997. Committee for veterinary medicinal products. Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods. EMEA/CVMP/036/95–Final.
- HANSEN, P. K., LUNESTAD, B. T. & O.B., S. 1992. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming. Pages 174-178. In: C. Michel and D. Alderman (Editors). *Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality*. Office International des Epizootics, Paris.



HEKTOEN, H., BERGE, J. A., HORMAZABAL, V. & YNDESTAD, M. 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture*, 133, 175-184.

IFOP 2014a. INFORME FINAL: Monitoreo de la eficacia y seguridad de productos biológicos y determinación de las curvas de depleción de productos farmacológicos utilizados en la salmonicultura 2013. *Subsecretaría de Economía- Convenio I: Asesoría Integral Para la Pesca y Acuicultura, 2013.*

IFOP 2014b. INFORME TÉCNICO FINAL: Establecimiento y armonización de protocolos para la elaboración, entrega y evaluación de alimentos medicados para la industria del salmón *INNOVACHILE 09MCSS-6706 /Enero 2014.*

JACOBSEN, P. & BERGLIND, L. 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture*, 70, 365-370.

MILLER, R. A. 2007. *Development of Standardized Antimicrobial Susceptibility Testing Methods and Aeromonas Salmonicida Epidemiologic Cutoff Values for Antimicrobial Agents Used in Aquaculture*, ProQuest.

NYGAARD, K., LUNESTAD, B. T., HEKTOEN, H., BERGE, J. A. & HORMAZABAL, V. 1992. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture*, 104, 31-36.

REEVES, P. T. 2011. *Drug residues. In: Comparative and Veterinary Pharmacology, F. Cunningham Ed., 265-290.*

RIGOS, G. & SMITH, P. 2013. A critical approach on pharmacokinetics, pharmacodynamics, dose optimisation and withdrawal times of oxytetracycline in aquaculture. *Reviews in Aquaculture.*

RIVIERE, J. & MASON, S. 2011. Tissue residues and withdrawal times. In: *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications, Second Edition, Edited by Jim E. Riviere, 413-424.*

RIVIERE, J. E. 2011. *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.*



- ROSS, L. G., ROSS, B. & ROSS, B. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals.
- SAMUELSEN, O. B. 1989. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture*, 83, 7-16.
- SAMUELSEN, O. B. 1992. The fate of antibiotics/chemotherapeutics in marine aquaculture sediments. Pages 162-173. In: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.
- SAMUELSEN, O. B., LUNESTAD, B. T., ERVIK, A. & FJELDE, S. 1994. Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture*, 126, 283-290.
- SAMUELSEN, O. B., LUNESTAD, B. T., HANNISDAL, R., BANNISTER, R., OLSEN, S., TJENSVOLL, T., FARESTVEIT, E. & ERVIK, A. 2015. Distribution and persistence of the anti sea-lice drug teflubenzuron in wild fauna and sediments around a salmon farm, following a standard treatment. *Science of the Total Environment*, 508, 115-121.
- SERNAPESCA 2015. LAB/NT1/Enero 2015. Programa de Laboratorios. Norma Técnica. Métodos de Muestreo de Productos Pesqueros de Exportación.
- SMITH, P. 1996. Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence. *Aquaculture*, 146, 157-169.

A N E X O 4

Protocolo para la obtención de curvas de depleción de Oxitetraciclina (OTC) administrada vía intraperitoneal en Trucha Arcoíris (*O. mykiss*), Salmón Coho (*O. kisutch*) y Salmón del Atlántico (*S. salar*) en condiciones de campo, versión 2.



PROTOCOLO:

Para la obtención de curvas de depleción de Oxitetraciclina (OTC) administrada vía intraperitoneal en salmónidos *en condiciones de campo*

(Versión 2.0/Septiembre 2015)

Preparado por el:

**Departamento de
Salud Hidrobiológica del
Instituto de Fomento Pesquero**



1. Introducci3n

La acuicultura en Chile es una de las actividades econ3micas de mayor desarrollo en las 3ltimas d3cadas, generando altos ingresos para el pa3s. El aumento productivo de la industria ha tra3do consigo la aparici3n de enfermedades de etiolog3a bacteriana, para lo cual se ha intensificado el uso de agentes antimicrobianos como medida de tratamiento. Su utilizaci3n puede traer consecuencias en la salud veterinaria y humana, como por ejemplo, persistencia de residuos en producto final y el entorno, as3 como la persistencia del fen3meno de resistencia bacteriana.

La forma m3s habitual de administraci3n de antibi3ticos en peces corresponde a su incorporaci3n en el alimento. Cuando los productos farmac3uticos son administrados v3a oral, 3stos entran al medio ambiente como alimento no ingerido, o como eliminaci3n v3a urinaria o fecal (Samuelsen *et al.*, 2015, Dempster *et al.*, 2009). La Oxitetraciclina es absorbida por los peces en un 60-80% cuando el est3mago est3 vac3o, sin embargo por la presencia de cationes divalentes y trivalentes en el agua se disminuye su actividad antimicrobiana (Miller, 2007). La disminuci3n de la actividad no es solucionada del todo con la encapsulaci3n del alimento, ya que para ser absorbida, la OTC debe ser previamente solubilizada en el est3mago del pez, por lo que se mezclar3a con los fluidos de 3ste (Miller, 2007). Como resultado de un proyecto realizado por el IFOP (IFOP, 2014) se determin3 que el principio activo estar3a biodisponible para el pez entre un 50% a un 70%. Coyne *et al.* (2004a, 2004b, 2006) demostraron que en tratamientos metafil3cticos comerciales con alimentos medicados, en los peces moribundos altamente infectados, la concentraci3n s3rica de antibi3tico es despreciable comparado con la subpoblaci3n sana, lo que puede deberse a que los peces enfermos pr3cticamente no se alimentan (Rigos and Smith, 2013).

Por otro lado, estudios han demostrado que antibacterianos como oxitetraciclina, flumequina y 3cido oxol3nico persisten por meses en el sedimento de los sistemas de cultivo despu3s de su administraci3n oral (Jacobsen and Berglind, 1988, Bj3rklund *et al.*, 1990, Hansen *et al.*, 1992, Nygaard *et al.*, 1992, Samuelsen, 1992, Samuelsen *et al.*, 1994, Hektoen *et al.*, 1995, Smith, 1996). De igual modo, algunos investigadores (Jacobsen and Berglind, 1988, Samuelsen, 1989), han



informado una vida media de 10 semanas y 32-64 días, respectivamente, para la oxitetraciclina en sedimentos de centros de cultivo.

Estos antecedentes, y la baja eficacia observada en terreno de los antimicrobianos entregados vía oral frente a brotes declarados en centros de cultivo, han llevado a los productores a buscar alternativas terapéuticas, como el uso extra-etiqueta de antimicrobianos inyectables destinados a otras producciones animales, situación que está contemplada como factible dentro de la normativa.

Un componente esencial en el control de producto final libre o con niveles aceptables de residuos de fármacos es obtener los periodos de resguardo de cada fármaco (Reeves, 2011). El periodo de resguardo es el tiempo de espera necesario desde el término de la medicación para que los tejidos animales disminuyan sus concentraciones a niveles a los cuales puedan ser sacrificados en forma segura para que puedan ser consumidos con seguridad (Reeves, 2011) o para que alcancen niveles bajo el límite legal (Riviere and Mason, 2011).

Para el cálculo de este periodo de resguardo es necesario conocer el decaimiento de los fármacos dentro del animal. Esto se obtiene realizando estudios de depleción donde se medican a los animales de acuerdo a las dosis recomendadas por cada fabricante y se obtiene muestras de matrices biológicas desde la suspensión de la medicación (Riviere and Mason, 2011). Así, las curvas de depleción son estudios de farmacocinética, toda vez que se evidencia el cambio de concentraciones a través del tiempo. La depleción generalmente es de tipo lineal en todos los compartimentos farmacocinéticas y dependiente de procesos de metabolización y excreción renal, fecal, branquial o por mucus de piel (Riviere, 2011).

2. Objetivos.

Obtener las curvas de depleción de las presentaciones comerciales de Oxitetraciclina vía intraperitoneal mayormente utilizadas en la salmonicultura nacional, desde muestras de músculo con piel de salmónidos, bajo condiciones de campo.



3. Dise1o del Estudio.

3.1.- Animales.

- Se trabajar1 con salm3nidos de producci3n del centro y empresa a determinar, que se encuentren pr3ximos a realizar un tratamiento con oxitetraciclina intraperitoneal.
- N1mero de animales a utilizar: El n1mero de peces total depender1 de los que posea la jaula y centro elegido. Independiente de la cantidad de peces a tratar, se retirarn 3 peces en el tiempo cero (Control Negativo, antes de comenzar a medicar) y 40 peces para la confecci3n de la curva de depleci3n, realizados en 4 tiempos de muestreo (10 peces cada uno).
- Densidades poblacionales: Los peces se mantendr1n a las densidades que utilice la empresa en forma normal.

3.2.- F1rmaco utilizado.

En lo posible el estudio se realizar1 en centros que utilicen los dos productos m1s utilizados desde el 2013 a Junio del 2015; Liquamicina LA 20% y Terrivet LA 20%. Como una tercera alternativa se utilizar1 centros que utilicen el producto Terrivet F200 (para salm3nidos) o Magnadur 30.

Esta actividad est1 supeditada a las facilidades que entreguen las empresas productoras, y a la aparici3n de un brote que haga necesaria la medicaci3n de los peces con oxitetraciclina inyectable.

3.3.- Metodolog1a de Muestreo.

Se realizar1 1 muestreo de tres peces antes de realizar el tratamiento. Posteriormente se realizar1n 4 muestreos programados, de 10 peces por tiempo de muestreo. Los tiempos de muestreo ser1n los mismos seleccionados para los estudios en condiciones controladas

Los peces ser1n sacrificados por golpe mortal en la cabeza. El tipo de muestra obtenido se har1 de acuerdo a la Norma T1cnica del Sernapesca LAB/NT1(2015):



- Antes de trozar el pescado, este deberá ser eviscerado completamente.
- Se hará un corte transversal al eje al pescado, por detrás de la aleta dorsal y delante de la aleta anal.
- Se obtendrá los filetes sin tejido cartilaginoso y óseo, siendo un lado la muestra y el otro la contramuestra.

Adicionalmente se tomará una segunda muestra que incluya el sitio de inyección:

- El trozo incluye desde el corte transversal realizado detrás de la aleta dorsal hasta un corte transversal detrás de la aleta pectoral, siendo un lado la muestra y el otro la contramuestra.

La muestra y contramuestra obtenidas se introducirán en bolsas plásticas, se sellarán, identificarán y se mantendrán congelados a -20°C en freezer hasta el envío al laboratorio de IFOP-Puerto Montt. Todo el procedimiento se realizará a mano descubierta, sin guantes. De acuerdo a lo consensuado en la reunión de inicio del proyecto, se considera el envío de parte de las contramuestras, para todos los tiempos que sean solicitados por Sernapesca, al Laboratorio de referencia FAVET.

Pese a que la Norma Técnica del Sernapesca LAB/NT1 (2015) señala que la muestra debe ser de al menos 400 gramos, en este caso se priorizó el sector de la muestra, por sobre el tamaño, con fines comparativos.

4. Programación

- Día 0 : muestreo 3 peces por jaula (antes de inyectar).
- Día 0 : Inyección de OTC
- Día x postratamiento : muestreo 10 peces
- Día xx postratamiento : muestreo 10 peces
- Día xxx postratamiento : muestreo 10 peces
- Día xxxx postratamiento : muestreo 10 peces



5. Mediciones, observaciones, resultados y registros

Se solicitará a las empresas la información productiva de los tratamientos (principio activo utilizado, dosis, T° agua, tamaño de peces, etc).

6. Obtención de las curvas de depleción.

En el Laboratorio de IFOP-Puerto Montt, se analizará la concentración de Oxitetraciclina (OTC) de las muestras obtenidas. Posteriormente se obtendrán las curvas de depleción graficando el logaritmo natural (Ln) de concentración de OTC versus el tiempo en días, y se obtendrá la ecuación de la recta. Para que la experiencia sea válida se deben cuantificar al menos 3 puntos de la recta. Es necesario que la regresión lineal, cumpla con los siguientes requisitos: homogeneidad de las varianzas del Ln de concentración de OTC obtenido en cada día de muestreo, linealidad de Ln de concentración de OTC obtenido versus tiempo (se puede ver visualmente en el gráfico), distribución normal de errores (se puede ver con un gráfico de residuales). Con las curvas de depleción se calculará el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de OTC en piel y músculo de los diferentes salmónidos.

Para el cálculo del período de resguardo, se utilizará el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4” establecido por EMA para este efecto, el cual se encuentra disponible en su página web. Para el cálculo del periodo de resguardo se considerarán como LMR de OTC 10 y 100 ppb.

Se compararán las curvas de depleción de los dos tipos de muestras, la obtenida a partir del corte tradicional de los ensayos de pre-cosecha (Sernapesca, 2015) y la obtenida que incluye el punto de inyección.

La realización de este estudio se basa en una guía de EMA (1997), que entrega los estadísticos más apropiados para el cálculo del tiempo de resguardo (Rigos and Smith, 2013).



7. Informe

Finalizado el estudio, se confeccionará un informe de estudio que resumirá los resultados obtenidos.

8. Manejo de la información generada

Durante el desarrollo del estudio, la Bitácora de Estudio y todo registro bruto se mantendrá en el Departamento de Salud Hidrobiológica del IFOP en Puerto Montt, con acceso restringido.

Finalizado el estudio, todo registro será mantenido y archivado en dependencias de IFOP, Puerto Montt.

9. Eventos inesperados

Cualquier evento inesperado del desarrollo del estudio será documentado en la Bitácora de Estudio y se informará inmediatamente al Director del Estudio.

10. Personal participante

- Director del Estudio: Sergio Contreras Lynch
- Investigador Principal del Estudio: Luis Norambuena S.
- Personal de la empresa y centro seleccionado.



11. Bibliografía

- BJÖRKLUND, H., BONDESTAM, J. & BYLUND, G. 1990. Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*, 86, 359-367.
- COYNE, R., SAMUELSEN, O., BERGH, Ø., ANDERSEN, K., PURSELL, L., DALSGAARD, I. & SMITH, P. 2004a. On the validity of setting breakpoint minimum inhibition concentrations at one quarter of the plasma concentration achieved following oral administration of oxytetracycline. *Aquaculture*, 239, 23-35.
- COYNE, R., SAMUELSEN, O., KONGSHAUG, H., ANDERSEN, K., DALSGAARD, I., SMITH, P. & BERGH, Ø. 2004b. A comparison of oxolinic acid concentrations in farmed and laboratory held rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following oral therapy. *Aquaculture*, 239, 1-13.
- COYNE, R., SMITH, P., DALSGAARD, I., NILSEN, H., KONGSHAUG, H., BERGH, Ø. & SAMUELSEN, O. 2006. Winter ulcer disease of post-smolt Atlantic salmon: An unsuitable case for treatment? *Aquaculture*, 253, 171-178.
- DEMPSTER, T., UGLEM, I., SANCHEZ-JEREZ, P., FERNANDEZ-JOVER, D., BAYLE-SEMPERE, J., NILSEN, R. & BJØRN, P. A. 2009. Coastal salmon farms attract large and persistent aggregations of wild fish: an ecosystem effect.
- EMEA 1997. Committee for veterinary medicinal products. Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods. EMEA/CVMP/036/95–Final.
- HANSEN, P. K., LUNESTAD, B. T. & O.B., S. 1992. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming. Pages 174-178. In: C. Michel and D. Alderman (Editors). *Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality*. Office International des Epizootics, Paris.



- HEKTOEN, H., BERGE, J. A., HORMAZABAL, V. & YNDESTAD, M. 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture*, 133, 175-184.
- IFOP 2014. INFORME TÉCNICO FINAL: Establecimiento y armonización de protocolos para la elaboración, entrega y evaluación de alimentos medicados para la industria del salmón *INNOVACHILE 09MCSS-6706 /Enero 2014*.
- JACOBSEN, P. & BERGLIND, L. 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture*, 70, 365-370.
- MILLER, R. A. 2007. *Development of Standardized Antimicrobial Susceptibility Testing Methods and Aeromonas Salmonicida Epidemiologic Cutoff Values for Antimicrobial Agents Used in Aquaculture*, ProQuest.
- NYGAARD, K., LUNESTAD, B. T., HEKTOEN, H., BERGE, J. A. & HORMAZABAL, V. 1992. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture*, 104, 31-36.
- REEVES, P. T. 2011. *Drug residues. In: Comparative and Veterinary Pharmacology, F. Cunningham Ed., 265-290*.
- RIGOS, G. & SMITH, P. 2013. A critical approach on pharmacokinetics, pharmacodynamics, dose optimisation and withdrawal times of oxytetracycline in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*.
- RIVIERE, J. & MASON, S. 2011. Tissue residues and withdrawal times. In: *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications*, Second Edition, Edited by Jim E. Riviere, 413-424.
- RIVIERE, J. E. 2011. *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications, Second Edition*, John Wiley & Sons, Inc.
- SAMUELSEN, O. B. 1989. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture*, 83, 7-16.



- SAMUELSEN, O. B. 1992. The fate of antibiotics/chemotherapeutics in marine aquaculture sediments. Pages 162-173. In: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.
- SAMUELSEN, O. B., LUNESTAD, B. T., ERVIK, A. & FJELDE, S. 1994. Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture*, 126, 283-290.
- SAMUELSEN, O. B., LUNESTAD, B. T., HANNISDAL, R., BANNISTER, R., OLSEN, S., TJENSVOLL, T., FARESTVEIT, E. & ERVIK, A. 2015. Distribution and persistence of the anti sea-lice drug teflubenzuron in wild fauna and sediments around a salmon farm, following a standard treatment. *Science of the Total Environment*, 508, 115-121.
- SERNAPESCA 2015. LAB/NT1/Enero 2015. Programa de Laboratorios. Norma Técnica. Métodos de Muestreo de Productos Pesqueros de Exportación.
- SMITH, P. 1996. Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence. *Aquaculture*, 146, 157-169.

A N E X O 5

Citas de revisión bibliográfica asociada a curvas
de depleción de fármacos de peces



Citas de trabajos revisados asociados a curvas de depleción de fármacos en Peces.

- ABEDINI, S., NAMDARI, R. & LAW, F. C. P. 1998. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in rainbow trout and chinook salmon. *Aquaculture*, 162, 23-32.
- AOYAMA, R. G., MCERLANE, K. M., ERBER, H., KITTS, D. D. & BURT, H. M. 1991. High-performance liquid chromatographic analysis of oxytetracycline in chinook salmon following administration of medicated feed. *Journal of Chromatography A*, 588, 181-186.
- BEBAK-WILLIAMS, J., BULLOCK, G. & CARSON, M. C. 2002. Oxytetracycline residues in a freshwater recirculating system. *Aquaculture*, 205, 221-230.
- BJÖRKLUND, H. & BYLUND, G. 1990. Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*, 84, 363-372.
- BJÖRKLUND, H. V., RÅBERGH, C. M. I. & BYLUND, G. 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*, 97, 85-96.
- BLACK, W., FERGUSON, H., BYRNE, P. & CLAXTON, M. 1991. Pharmacokinetic and tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout following bolus intravenous administration. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 14, 351-358.
- BRUNO, D. 1989. An investigation into oxytetracycline residues in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 12, 77-86.
- COYNE, R., SAMUELSEN, O., BERGH, Ø., ANDERSEN, K., PURSELL, L., DALSGAARD, I. & SMITH, P. 2004. On the validity of setting breakpoint minimum inhibition concentrations at one quarter of the plasma



- concentration achieved following oral administration of oxytetracycline. *Aquaculture*, 239, 23-35.
- ELEMA, M. O., HOFF, K. A. & KRISTENSEN, H. G. 1996. Bioavailability of oxytetracycline from medicated feed administered to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater. *Aquaculture*, 143, 7-14.
- GRONDEL, J., NOUWS, J., SCHUTTE, A. & DRIESSENS, F. 1989. Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 12, 157-162.
- IFOP 2014. INFORME FINAL: Monitoreo de la eficacia y seguridad de productos biol3gicos y determinaci3n de las curvas de depleci3n de productos farmacol3gicos utilizados en la salmonicultura 2013. *Subsecretar3a de Econom3a- Convenio I: Asesor3a Integral Para la Pesca y Acuicultura*, 2013.
- JACOBSEN, M. 1989. Withdrawal times of freshwater rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimetoprim. *Journal of Fish Diseases*, 12, 29-36.
- KUSSER W. & NEWMAN, S. 1990. Detection of oxytetracycline residues in fish tissues using a sensitive bioassay. *Journal of Fish Diseases*, 13, 545-548.
- MEINERTZ, J. R., GAIKOWSKI, M. P., STEHLY, G. R., GINGERICH, W. H. & EVERED, J. A. 2001. Oxytetracycline depletion from skin-on fillet tissue of coho salmon fed oxytetracycline medicated feed in freshwater at temperatures less than 9°C. *Aquaculture*, 198, 29-39.
- MILLER, R. A., PELSOR, F. R., KANE, A. S. & REIMSCHUESSEL, R. 2012. Oxytetracycline pharmacokinetics in rainbow trout during and after an orally administered medicated feed regimen. *Journal of aquatic animal health*, 24, 121-128.
- NAMDARI, R., ABEDINI, S. & LAW, F. 1999. A comparative tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture research*, 30, 279-286.



- NAMDARI, R., ABEDINI, S. & LAW, F. C. P. 1996. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in seawater chinook and coho salmon following medicated-feed treatment. *Aquaculture*, 144, 27-38.
- REIMSCHUESSEL, R., STEWART, L., SQUIBB, E., HIROKAWA, K., BRADY, T., BROOKS, D., SHAIKH, B. & HODSDON, C. 2005. Fish drug analysis—Phish-pharm: A searchable database of pharmacokinetics data in fish. *The AAPS Journal*, 7, E288-E327.
- RIGOS, G. & SMITH, P. 2013. A critical approach on pharmacokinetics, pharmacodynamics, dose optimisation and withdrawal times of oxytetracycline in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*.
- ROGSTAD, A., HORMAZABAL, V., ELLINGSEN, O. F. & RASMUSSEN, K. E. 1991. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish. I. Absorption, distribution and accumulation in rainbow trout in freshwater. *Aquaculture*, 96, 219-226.
- UNO, K., AOKI, T., UENO, R. & MAEDA, I. 1997. Pharmacokinetics of Oxytetracycline in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Following Bolus Intravenous Administration. *Fisheries science*, 63, 90-93.

A N E X O 6

Productos comerciales de OTC inyectable
más utilizados por la industria salmonicultora.



ANEXO 6: Productos OTC más utilizados

- Productos comerciales de OTC inyectable extra etiqueta más utilizados por la industria salmonicultora.

Producto Farmacéutico	2013		2014		2015		TOTAL	
	Principio Activo (kg)	%						
OXITETRACICLINA 10%	137,6	19,5	341,2	15,7	169,3	18,4	648,2	17,0
LIQUAMICINA LA 20%	299,0	42,3	694,3	31,9	291,9	31,6	1285,2	33,8
TERRIVET L.A 20%	143,4	20,3	909,7	41,8	119,4	12,9	1172,5	30,8
CYAMICINA LA 20%	86,6	12,3	202,0	9,3	317,9	34,5	606,5	15,9
MAGNADUR LA 300 30%	0,0		22,5	1,0	23,8	2,6	46,4	1,2
Otros	39,6	5,6	7,5	0,4	0	0,0	47,1	1,3
Total	706,2	100,0	2177,3	100,0	922,4	100,0	3805,9	100,0

- Utilización de OTC inyectable 2015.

Producto Farmacéutico	Principio Activo (kg)	%
Extraetiqueta	922,4	78,0
Terrivet F200	260,7	22,0
Total	1183,1	100,0

- Nota:** - Los valores extra etiqueta son de enero a junio 2015.
- Los valores de Terrivet F200 comprenden desde diciembre 2014 a junio 2015.

A N E X O 7

Resultados y Cromatogramas de OTC en piel-músculo en muestras normal y que incluye el punto de inyección en los 4 primeros tiempos de muestreo en salmón Coho.



Anexo 7.1: Resultados de OTC en muestras corte normal y corte que incluye el punto de inyecci3n.

Fecha análisis	Mº mx	Días post- inyecci3n	área	Conc obtenida ng/g
02/11/2015	NA 4	12	183.843	1381,7
02/11/2015	NA 5	12	789.409	5749,4
02/11/2015	NA 7	12	191.946	1442,1
02/11/2015	NA 8	12	98.792	732,9
02/11/2015	PA 4	12	193.468	1442,0
02/11/2015	PA 5	12	787.439	5615,6
02/11/2015	PA 7	12	174.685	1280,4
02/11/2015	PA 8	12	93.897	709,5
03/11/2015	NB 4	12	234.940	1705,2
03/11/2015	NB 5	12	293.927	2126,7
03/11/2015	NB 6	12	787.918	5898,2
03/11/2015	NB 7	12	536.681	4037,0
03/11/2015	NB 8	12	284.631	2124,9
03/11/2015	PB 4	12	238.104	1761,9
03/11/2015	PB 5	12	303.786	2185,1
03/11/2015	PB 6	12	785.399	5720,2
03/11/2015	PB 7	12	508.925	3753,8
03/11/2015	PB 8	12	273.990	1968,0
03/11/2015	NC 5	12	692.142	4965,4
03/11/2015	NC 7	12	902.578	6471,9
03/11/2015	NC 8	12	981.696	7038,4
03/11/2015	PC 5	12	670.537	4801,6
03/11/2015	PC 7	12	898.074	6476,7
03/11/2015	PC 8	12	962.133	6991,5
10/11/2015	NA 9	20	142.611	1080,6
10/11/2015	NA 10	20	307.383	2303,0
10/11/2015	NA 11	20	152.131	1097,3
10/11/2015	NA 12	20	180.706	1355,6



10/11/2015	PA 9	20	123.639	898,7
10/11/2015	PA 10	20	292.315	2111,0
10/11/2015	PA 11	20	121.751	892,1
10/11/2015	PA 12	20	178.331	1340,6
18/11/2015	NB 9	20	209.167	1507,7
18/11/2015	NB 10	20	47.101	362,7
18/11/2015	NB 11	20	151.751	1146,9
18/11/2015	NB 12	20	94.586	709,0
18/11/2015	NB 13	20	220.804	1573,0
18/11/2015	PB 9	20	199.040	1495,0
18/11/2015	PB 10	20	49.940	371,3
18/11/2015	PB 11	20	150.023	1131,7
18/11/2015	PB 12	20	95.650	714,1
18/11/2015	PB 13	20	219.800	1640,1
18/11/2015	NC 9	20	141.839	1016,0
18/11/2015	NC 10	20	172.781	1283,9
18/11/2015	NC 11	20	101.588	740,4
18/11/2015	NC 12	20	132.501	1004,8
18/11/2015	NC 13	20	287.660	2134,7
18/11/2015	PC 9	20	142.931	1055,6
18/11/2015	PC 10	20	187.256	1412,7
18/11/2015	PC 11	20	102.445	780,9
18/11/2015	PC 12	20	123.444	927,6
18/11/2015	PC 13	20	263.155	1953,8
30/11/2015	NA-14	33	221.007	1689,9
30/11/2015	NA-15	33	34.998	280,5
30/11/2015	NA-16	33	27.770	213,9
30/11/2015	NA-17	33	26.908	208,8
30/11/2015	NA-18	33	23.618	180,5
30/11/2015	PA-14	33	226.279	1746,9
30/11/2015	PA-15	33	28.125	219,2
30/11/2015	PA-16	33	35.507	267,4
30/11/2015	PA-17	33	27.155	211,1
30/11/2015	PA-18	33	23.288	185,0



30/11/2015	NB-14	33	40.164	315,3
20/01/2016	NB15	33	136.792	1071,5
30/11/2015	NB-16	33	69.247	524,9
30/11/2015	NB-17	33	64.929	497,6
30/11/2015	NB-18	33	56.515	450,9
30/11/2015	PB-14	33	56.599	430,2
20/01/2016	PB15	33	131.484	1021,9
30/11/2015	PB-16	33	88.682	692,4
30/11/2015	PB-17	33	58.937	452,3
30/11/2015	PB-18	33	51.031	409,3
10/12/2015	NC-14	33	29.813	238,1
10/12/2015	NC-15	33	53.109	410,5
10/12/2015	NC-16	33	15.690	123,1
20/01/2016	NC17	33	83.367	657,2
10/12/2015	NC-18	33	40.726	321,6
10/12/2015	PC-14	33	22.163	170,9
10/12/2015	PC-15	33	48.984	382,1
10/12/2015	PC-16	33	14.800	113,1
20/01/2016	PC19	33	73.468	588,1
10/12/2015	PC-18	33	39.075	308,5
20/01/2016	NA19	40	64.294	513,3
20/01/2016	NA20	40	71.677	547,5
20/01/2016	NA21	40	45.564	365,2
20/01/2016	NA22	40	85.373	673,0
20/01/2016	NA23	40	83.447	661,7
20/01/2016	PA19	40	57.642	431,6
20/01/2016	PA20	40	70.980	561,3
20/01/2016	PA21	40	52.393	390,6
20/01/2016	PA22	40	95.404	745,1
20/01/2016	PA23	40	113.991	896,0
16/12/2015	NB-19	40	17.055	134,3
16/12/2015	NB-20	40	19.259	149,9
16/12/2015	NB-21	40	34.307	262,8
16/12/2015	NB-22	40	39.587	312,6

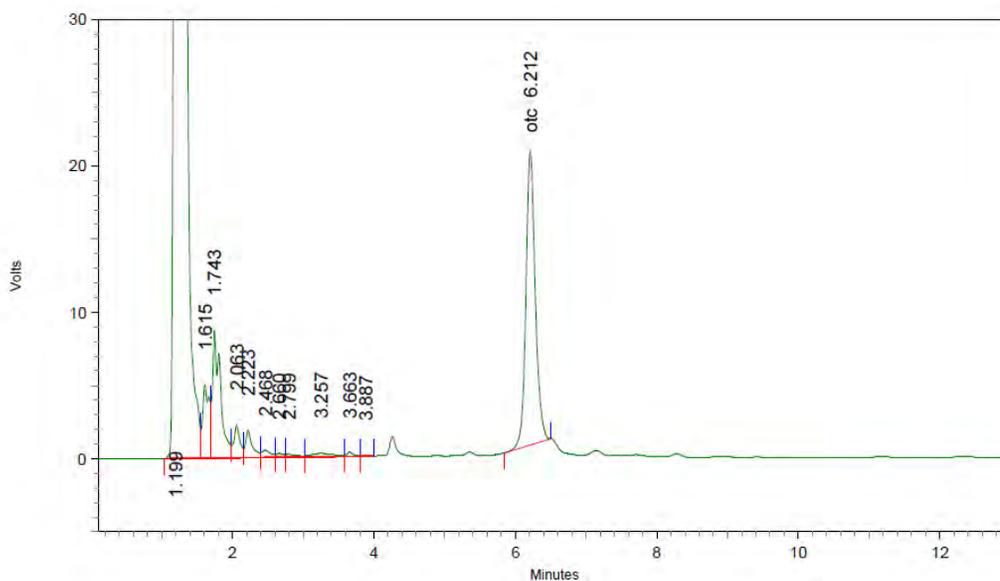


16/12/2015	NB-23	40	23.193	183,5
16/12/2015	PB-19	40	22.153	174,2
16/12/2015	PB-20	40	23.921	185,7
16/12/2015	PB-21	40	36.817	281,1
16/12/2015	PB-22	40	43.031	322,8
16/12/2015	PB-23	40	25.102	199,6
20/01/2016	NC19	40	58.891	441,0
16/12/2015	NC-20	40	48.764	382,6
16/12/2015	NC-21	40	34.956	273,0
16/12/2015	NC-22	40	20.058	158,7
16/12/2015	NC-23	40	33.166	248,7
20/01/2016	PC17	40	50.115	389,5
16/12/2015	PC-20	40	42.223	334,2
16/12/2015	PC-21	40	43.480	336,9
16/12/2015	PC-22	40	30.262	227,6
16/12/2015	PC-23	40	34.970	276,9



Anexo 7.2: Cromatogramas de comparaci3n de muestra normal v/s punto de inyecci3n

NA-4 OTC 2-Noviembre-2015

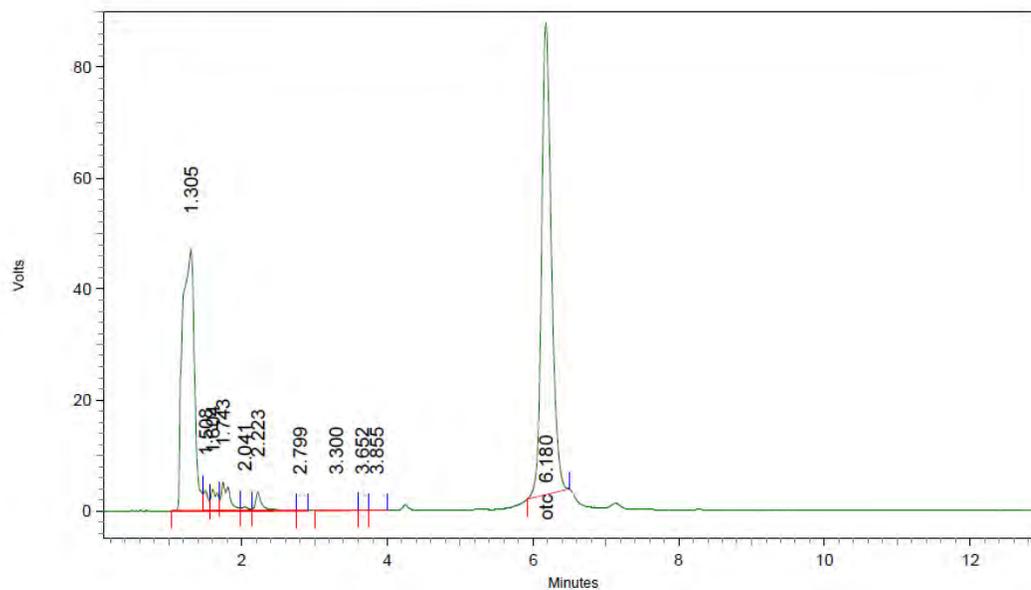


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.212	183843	10477.88



NA-5 OTC 2-Noviembre-2015

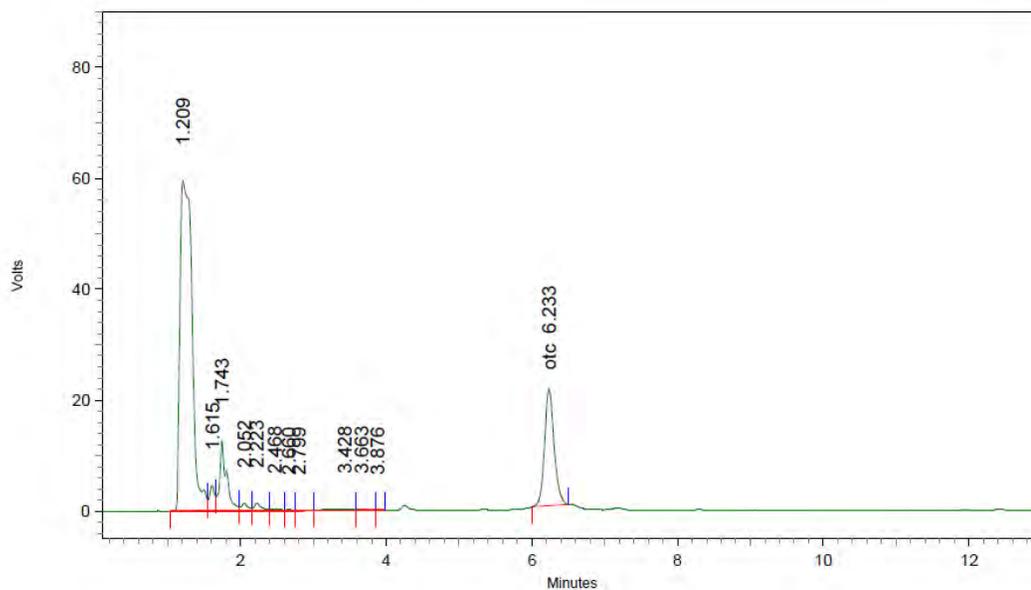


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.180	789409	10148.12



NA-7 OTC 2-Noviembre-2015

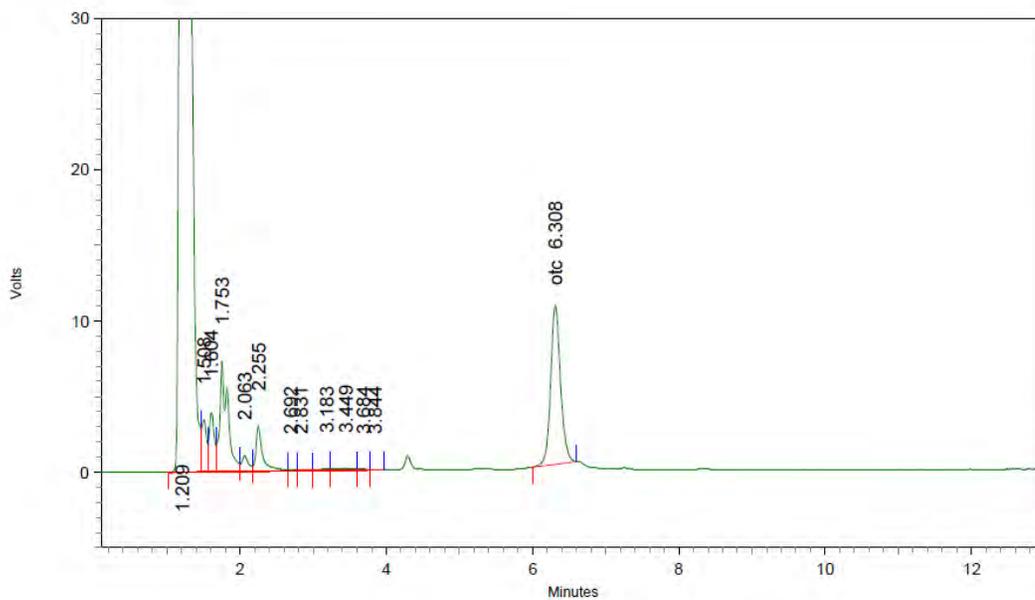


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.233	191946	10710.54



NA-8 OTC 2-NOVIEMBRE-2015

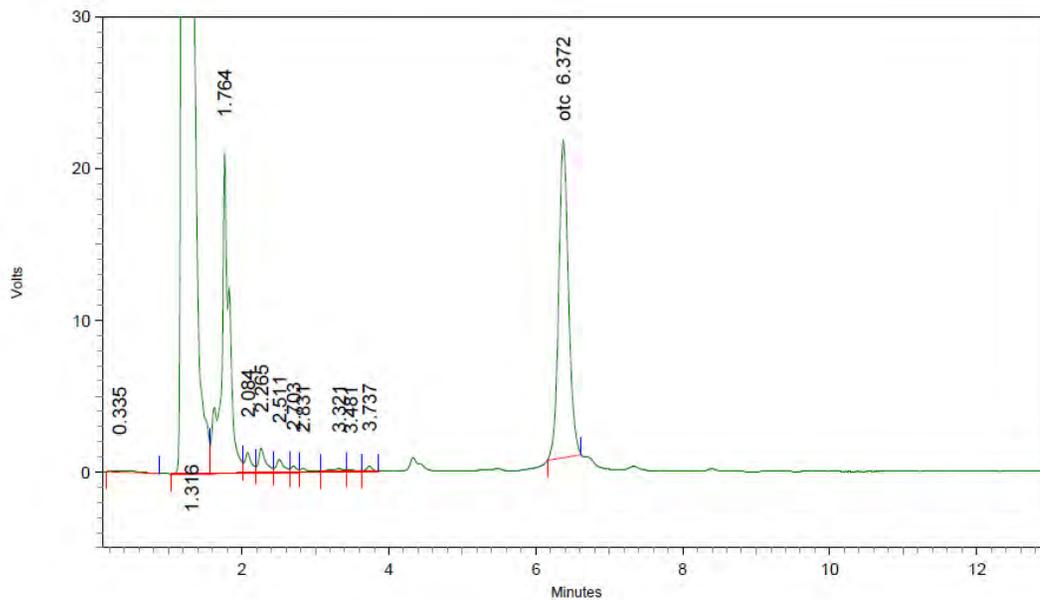


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.308	98792	10554.55



PA-4 OTC 2-Noviembre-2015

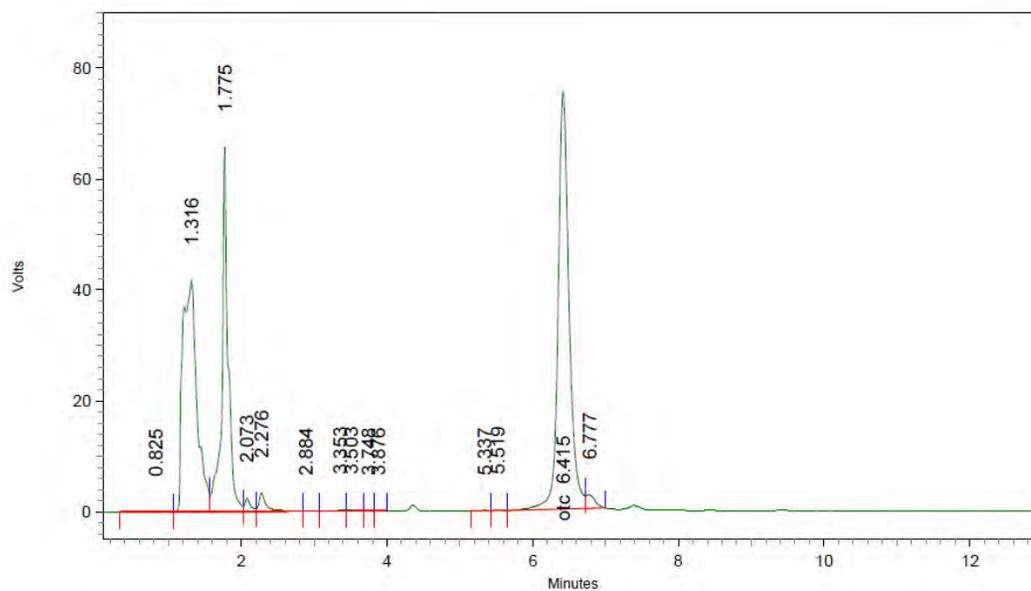


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.372	193468	10874.41



PA-5 OTC 2-Noviembre-2015

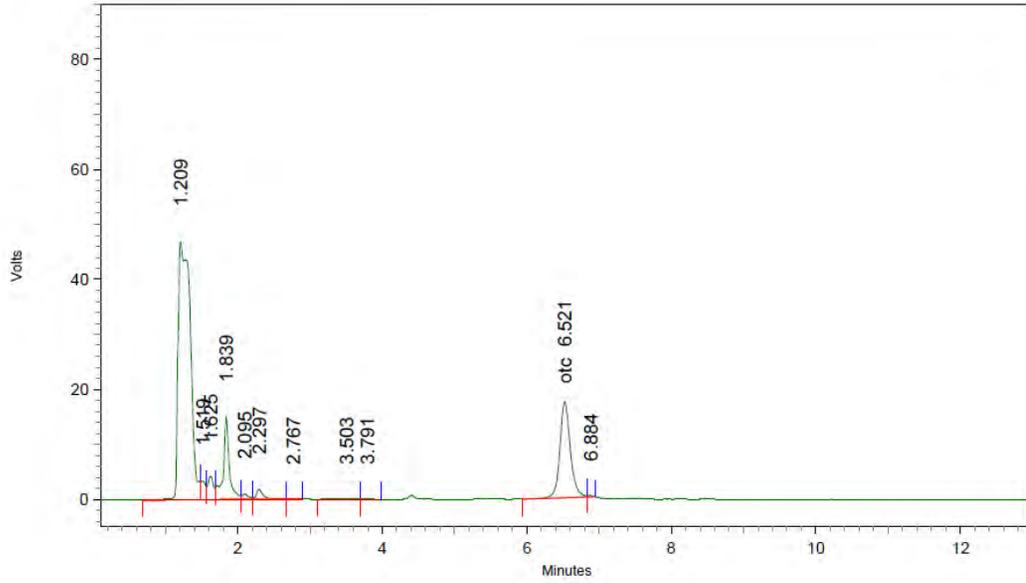


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.415	787439	9351.91



PA-7 OTC 2-NOVIEMBRE-2015

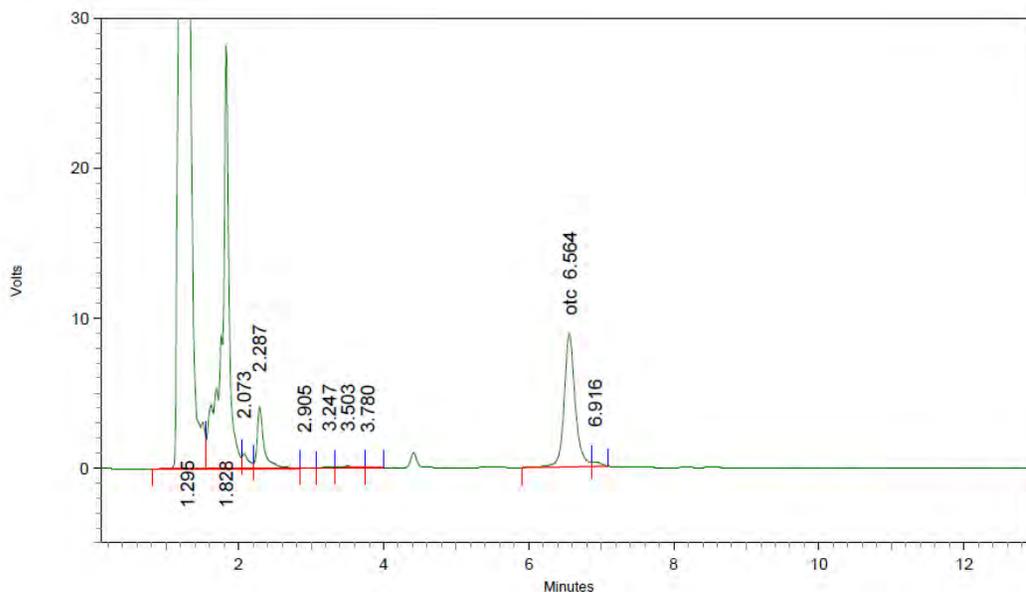


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.521	174685	9908.81



PA-8 OTC 2-Noviembre-2015

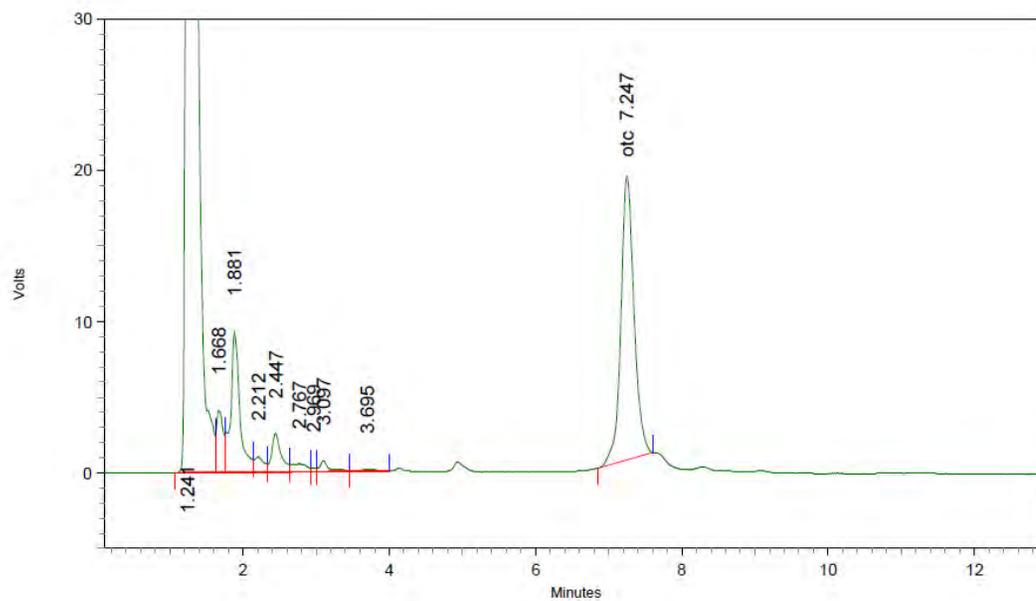


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.564	93897	9686.46



NB-4 OTC 3-Noviembre-2015

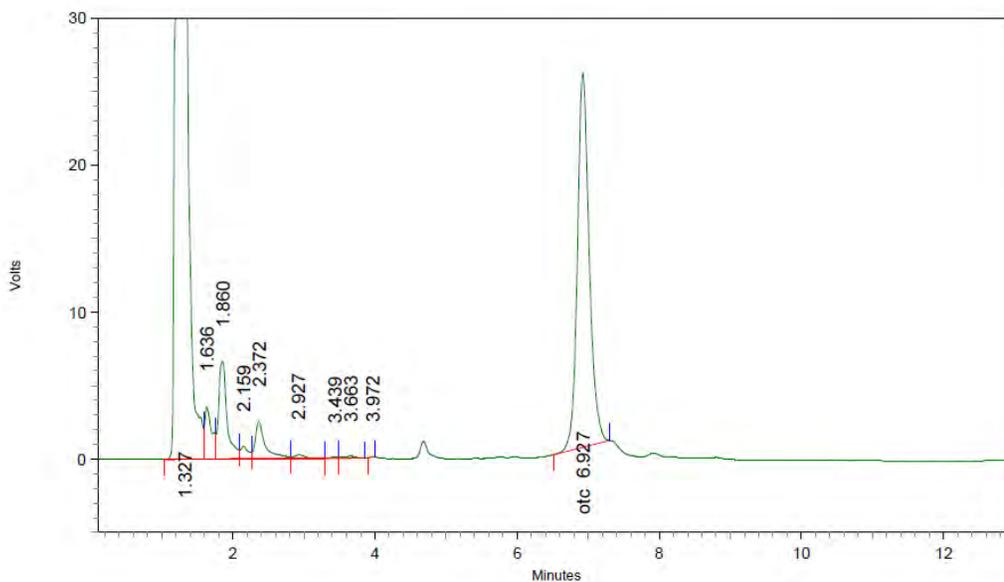


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.247	234940	8078.59



NB-5 OTC 3-Noviembre-2015

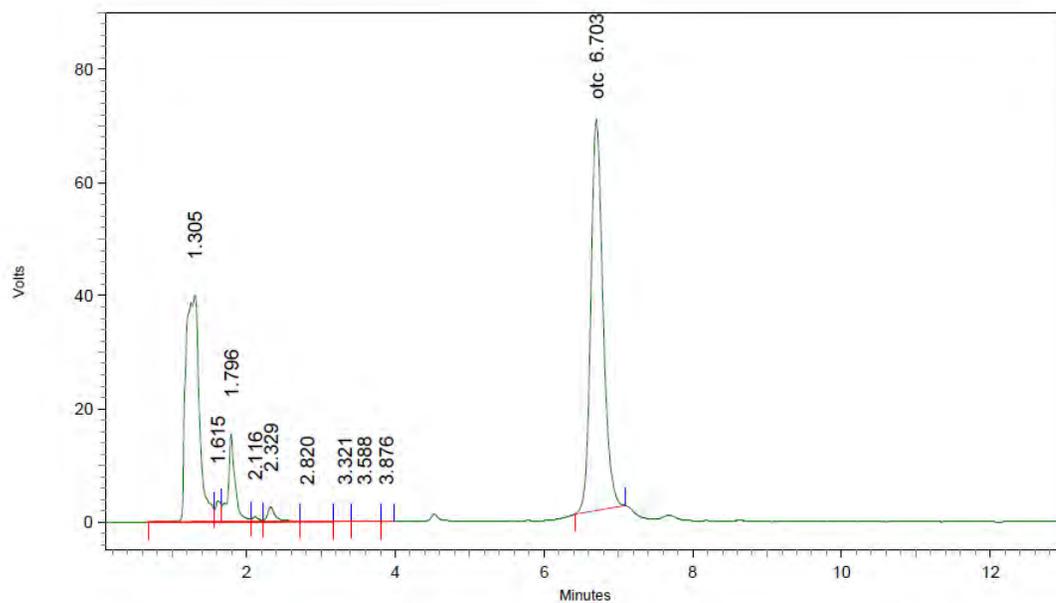


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.927	293927	8458.56



NB-6 OTC 3-Noviembre-2015

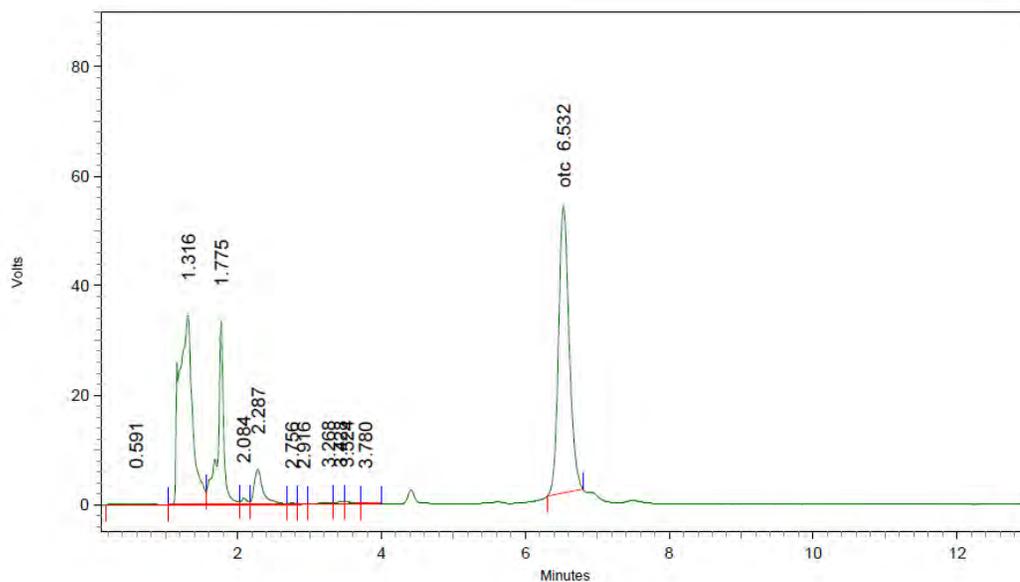


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.703	787918	8101.88



NB-7 OTC 3-Noviembre-2015

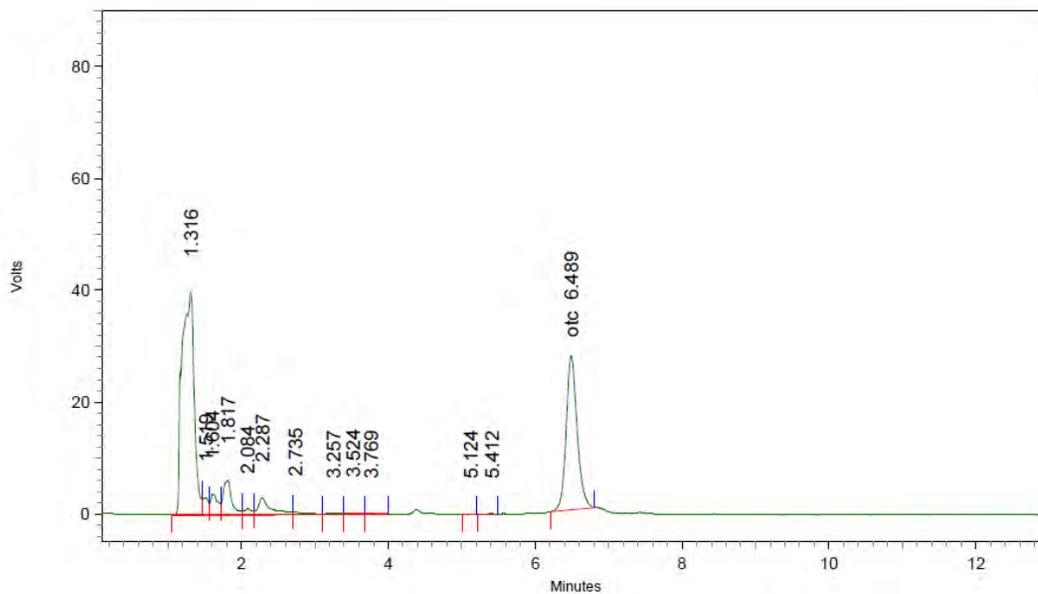


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.532	536681	9318.62



NB-8 OTC 3-Noviembre-2015

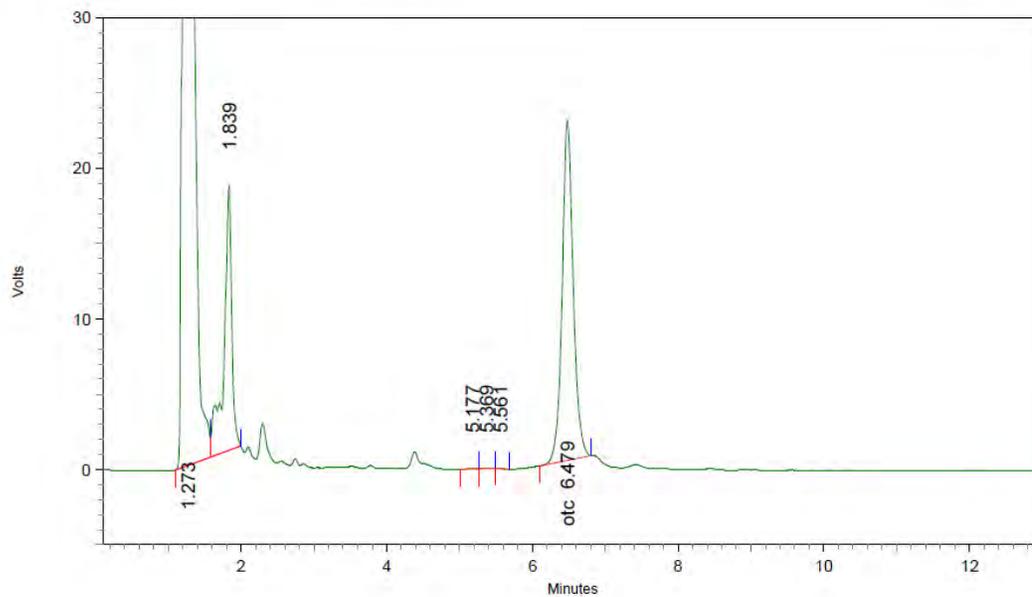


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.489	284631	8915.66



PB-4 OTC 3-Noviembre-2015

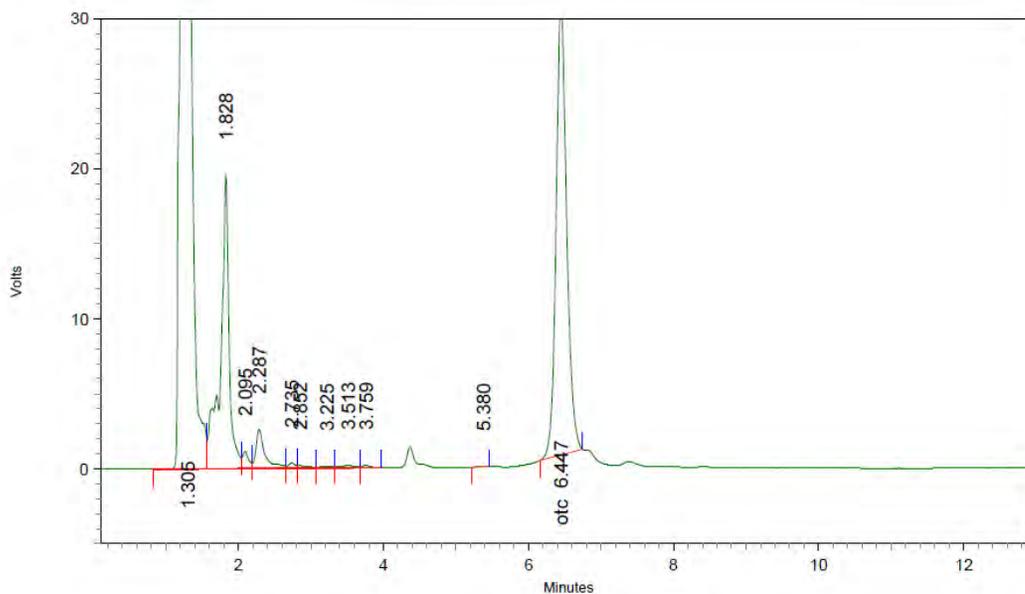


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.479	238104	9231.77



PB-5 OTC 3-Noviembre-2015

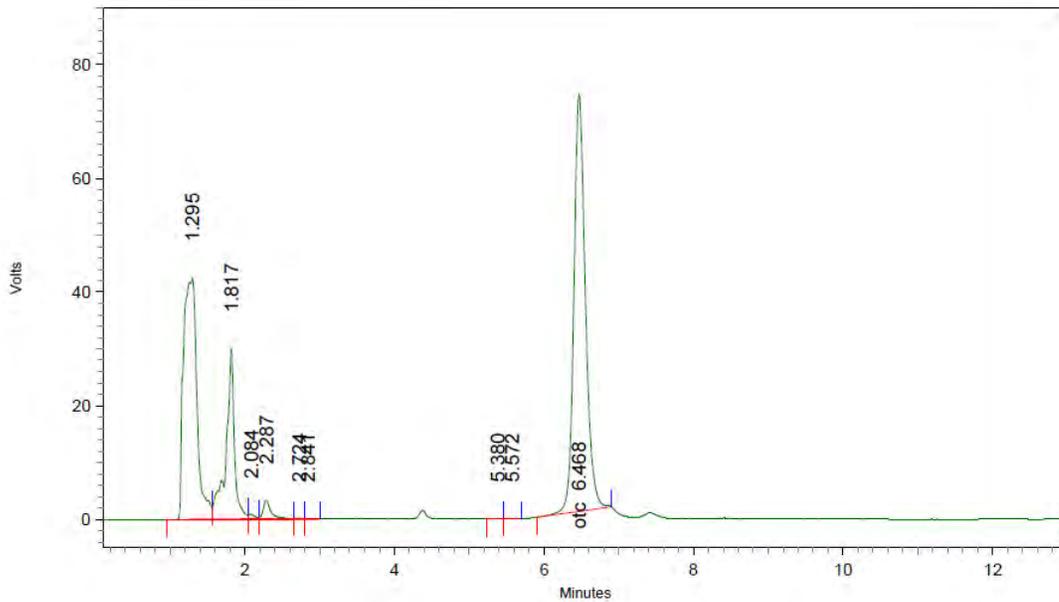


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.447	303786	9721.66



PB-6 OTC 3-Noviembre-2015

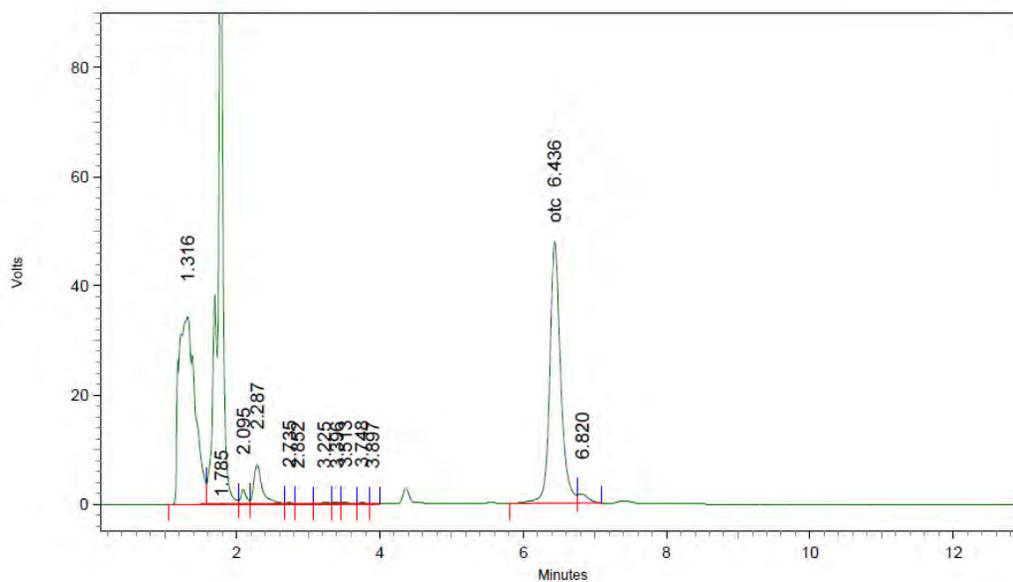


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.468	785399	8550.91



PB-7 OTC 3-Noviembre-2015

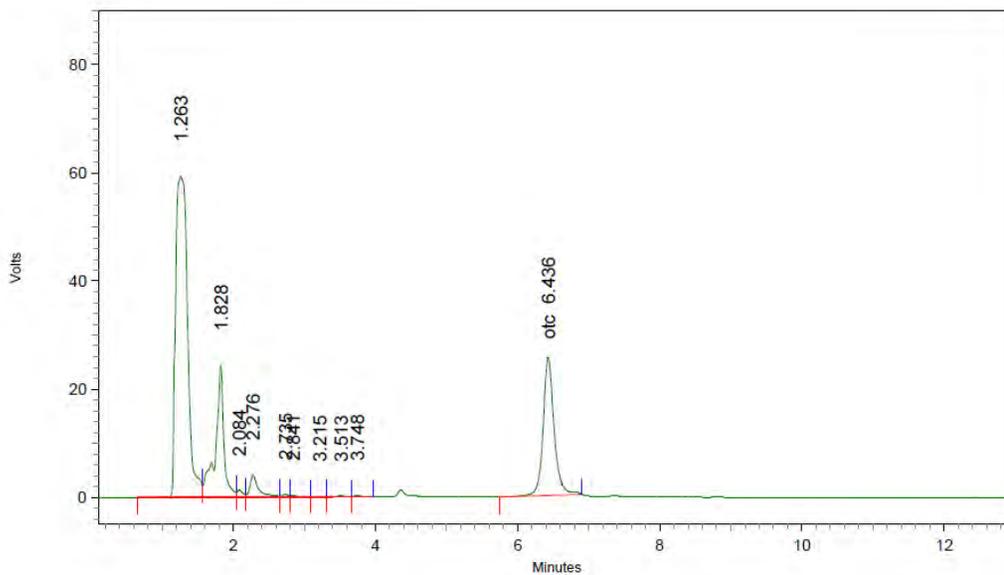


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.436	508925	9085.57



PB-8 OTC 3-Noviembre-2015

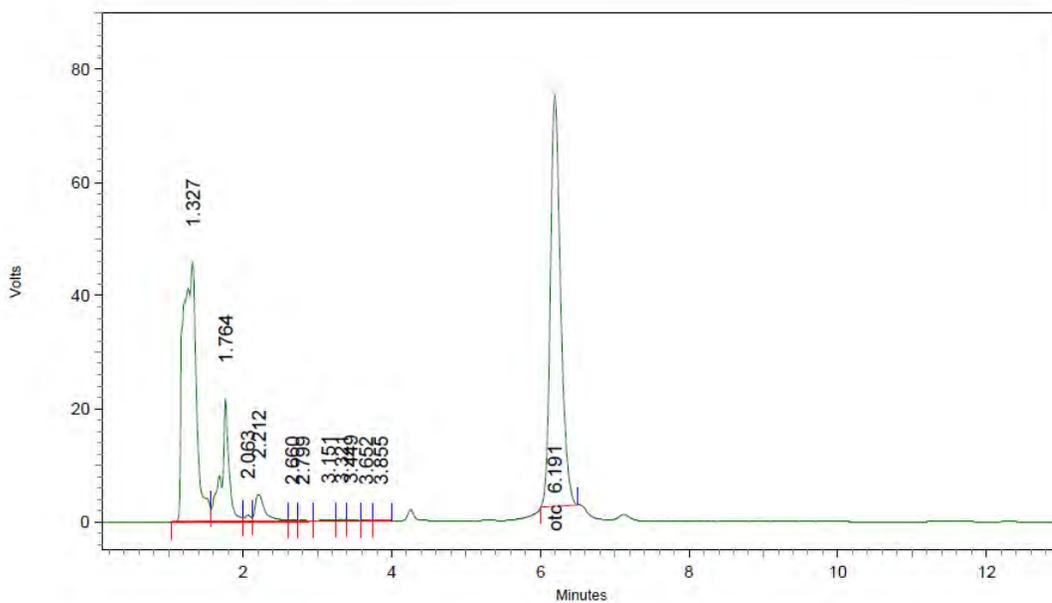


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.436	273990	9107.58



NC-5 OTC 3-Noviembre-2015

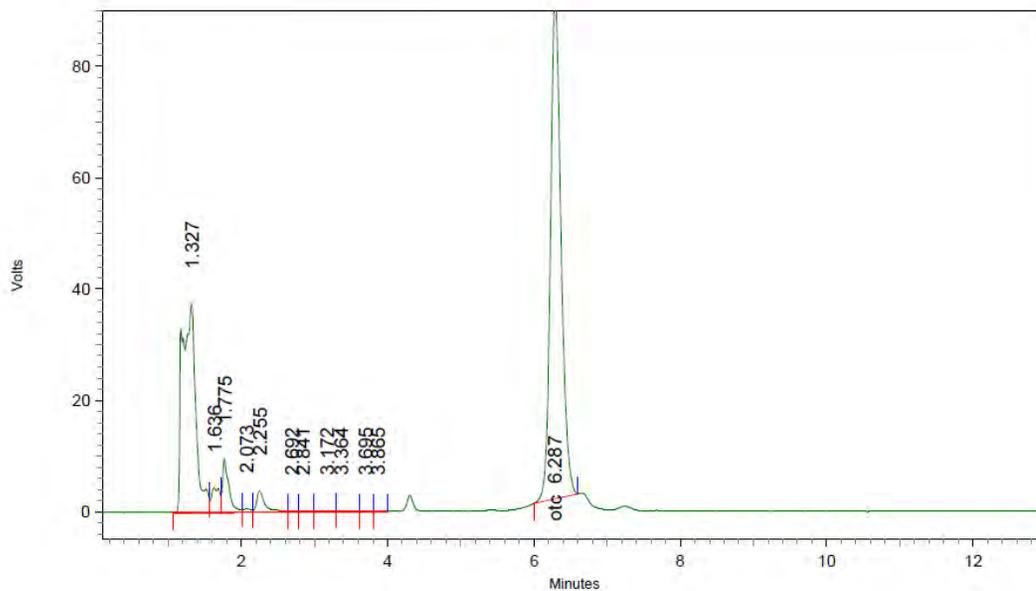


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.191	692142	9674.24



NC-7 OTC 3-Noviembre-2015

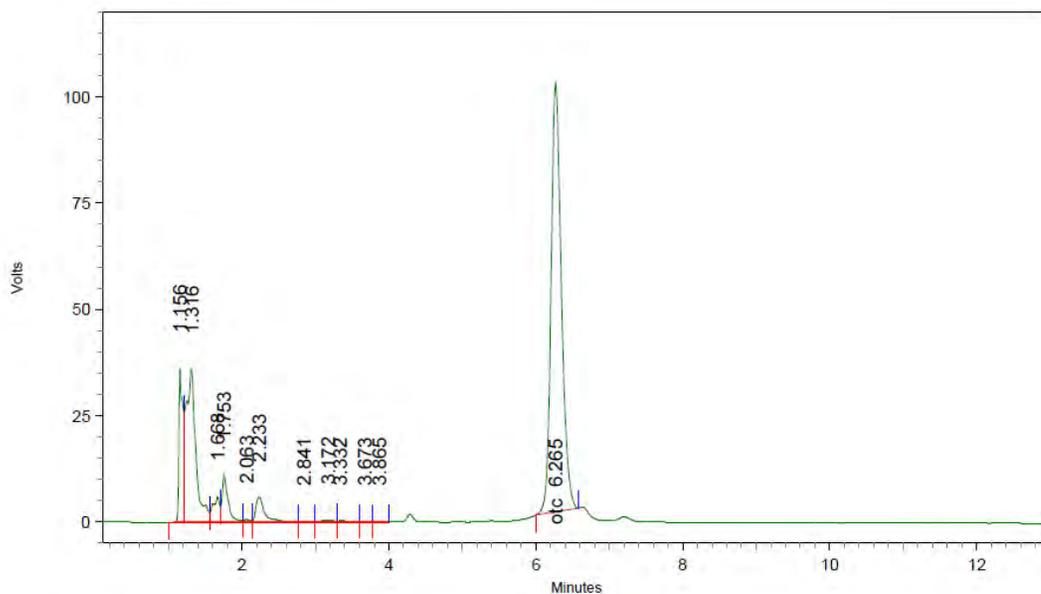


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.287	902578	9008.85



NC-8 OTC 3-Noviembre-2015

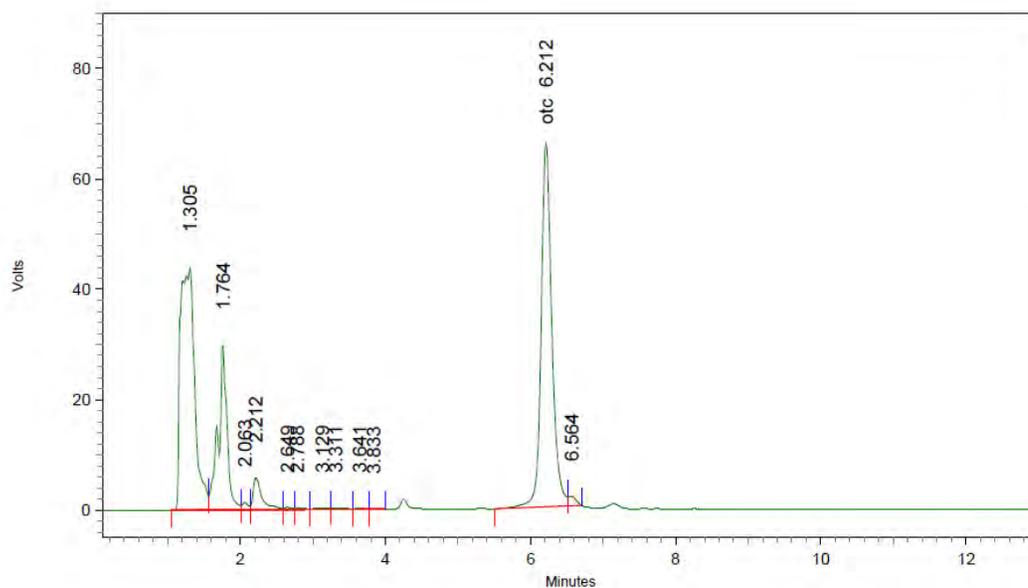


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.265	981696	9347.58



PC-5 OTC 3-Noviembre-2015

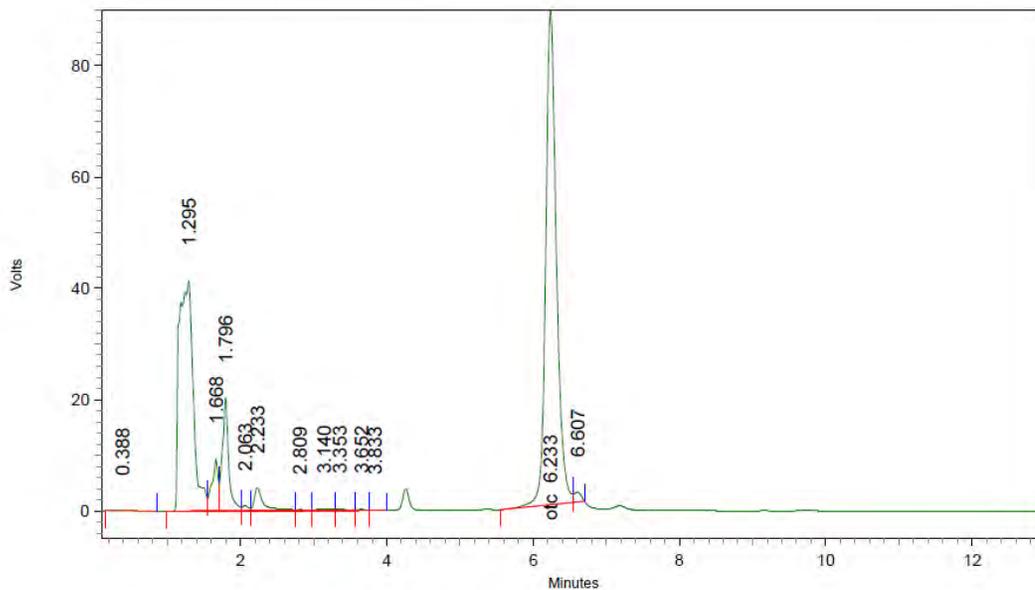


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.212	670537	9407.65



PC-7 OTC 3-Noviembre-2015

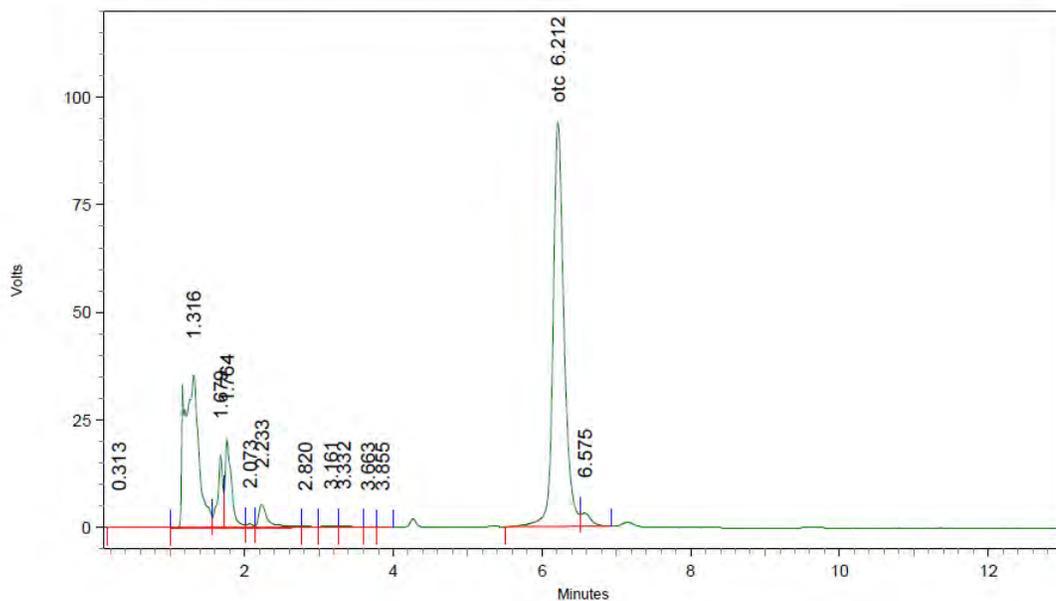


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.233	898074	9037.46



PC-8 OTC 3-Noviembre-2015

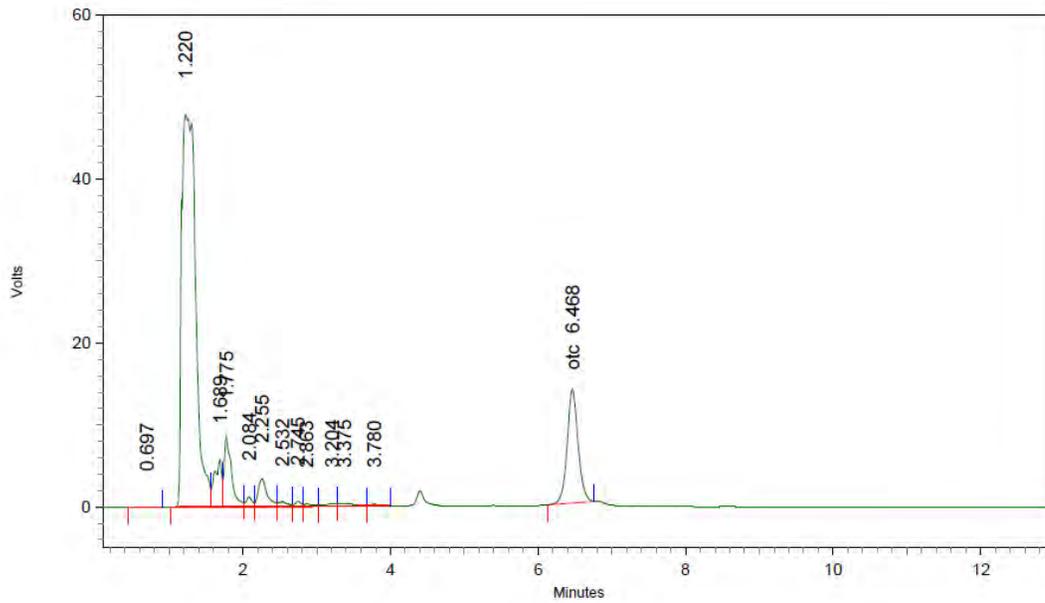


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.212	962133	9462.39



NA-9 OTC 10-noviembre-2015

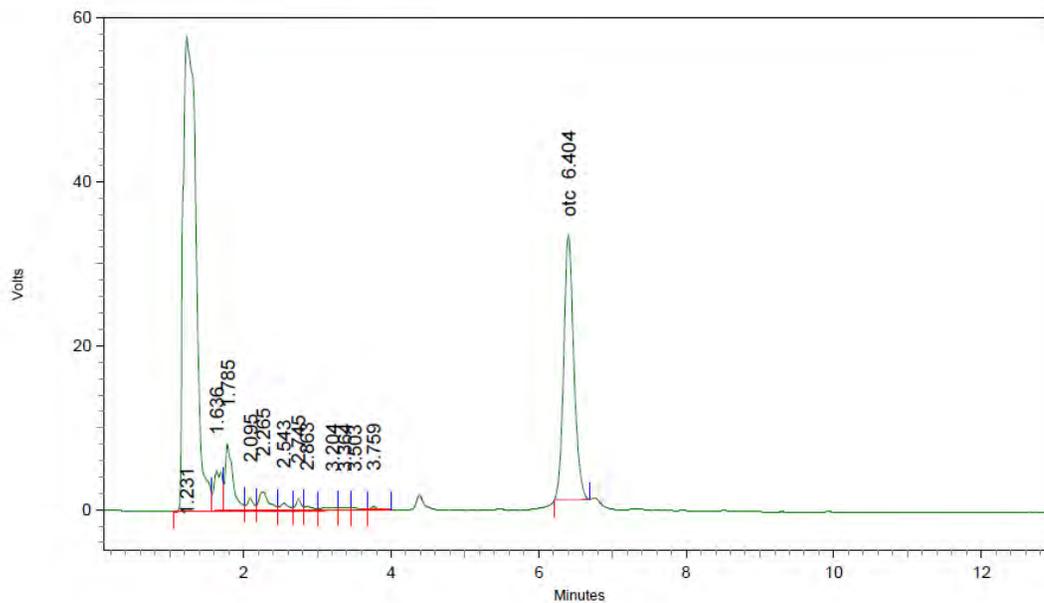


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.468	142611	9237.87



NA-10 OTC 10-noviembre-2015

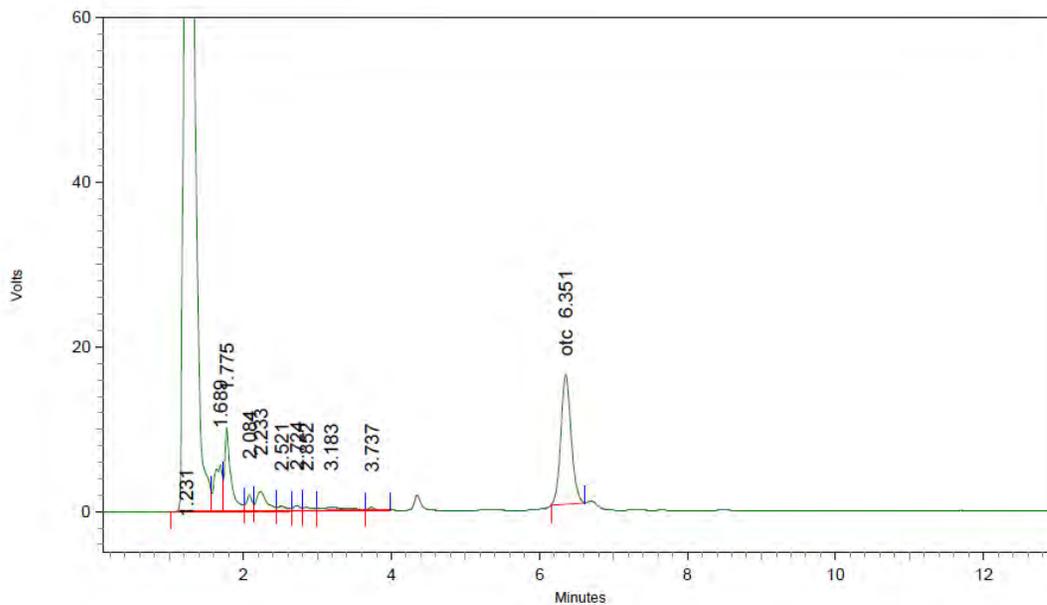


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.404	307383	10175.17



NA-11 OTC 10-noviembre-2015

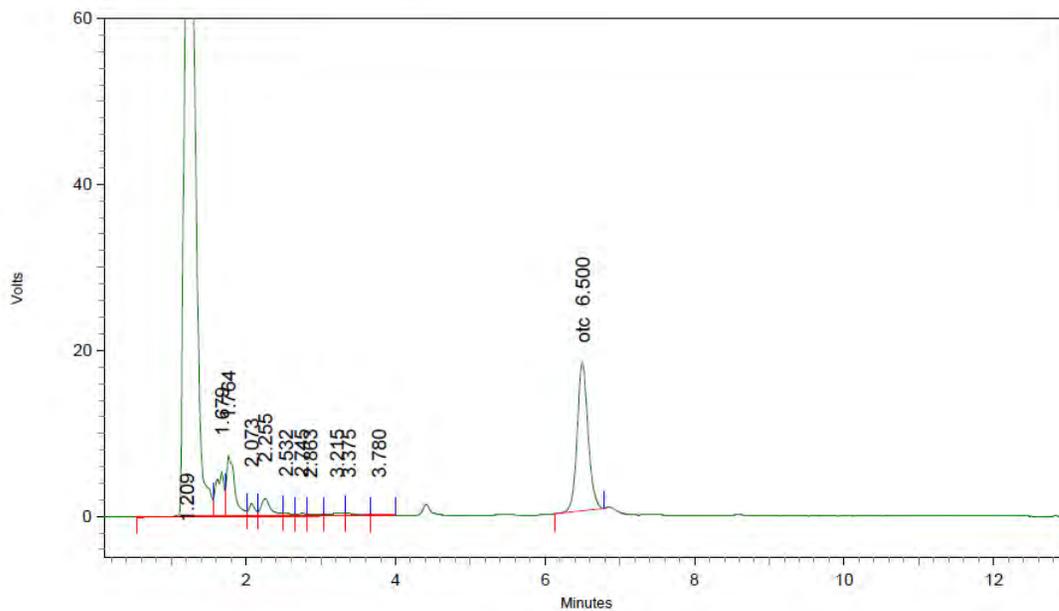


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.351	152131	9436.96



NA-12 OTC 10-noviembre-2015

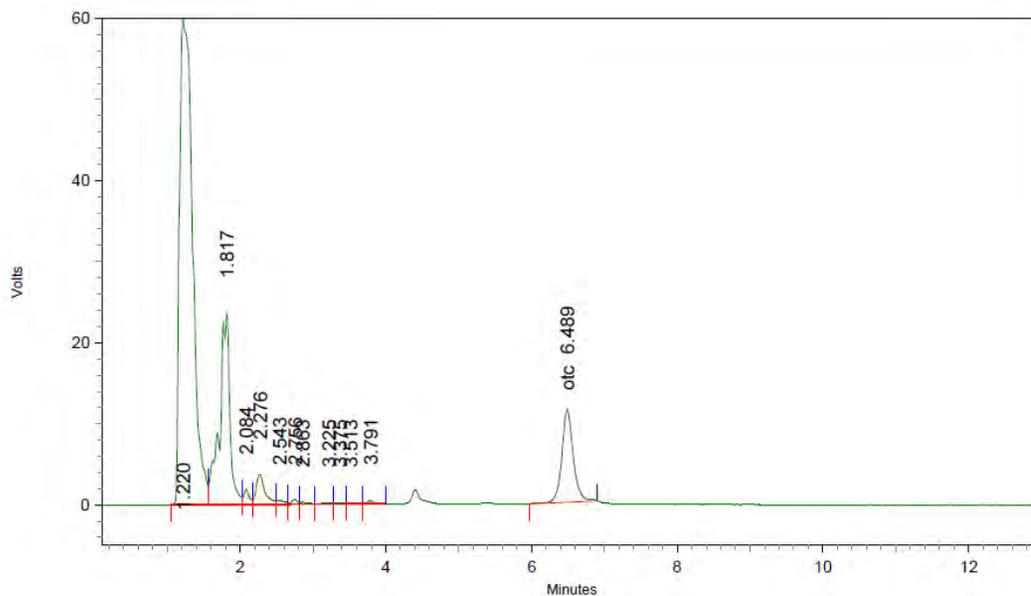


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.500	180706	9473.48



PA-9 OTC 10-noviembre-2015

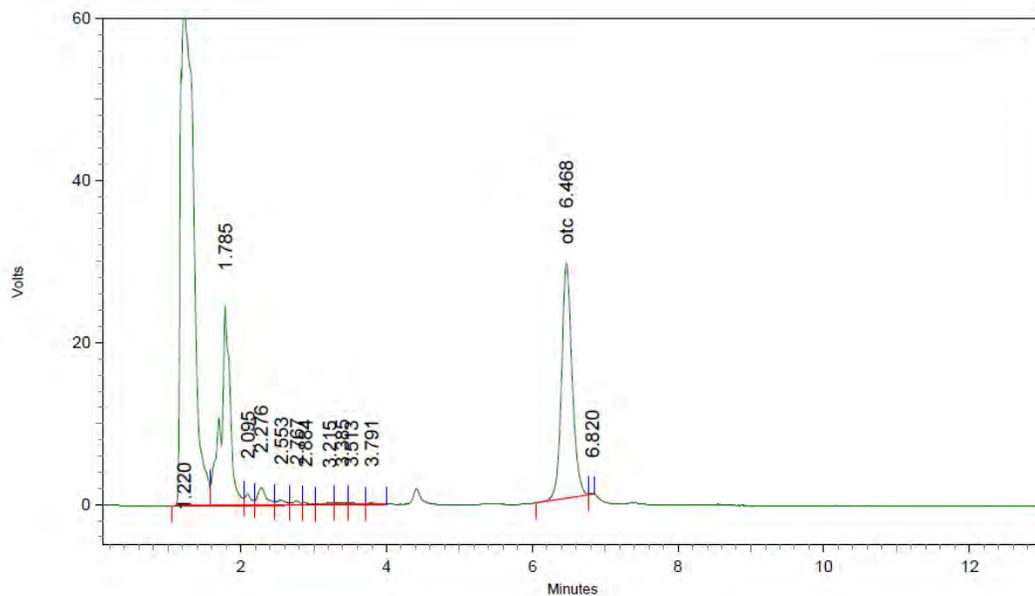


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.489	123639	8981.85



PA-10 OTC 10-noviembre-2015

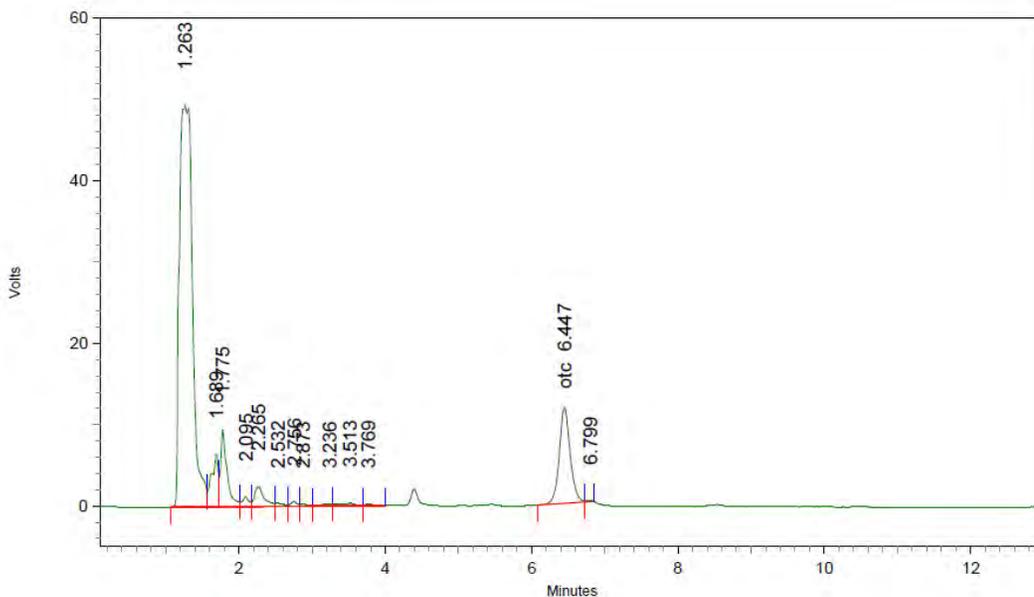


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.468	292315	9798.41



PA-11 OTC 10-noviembre-2015

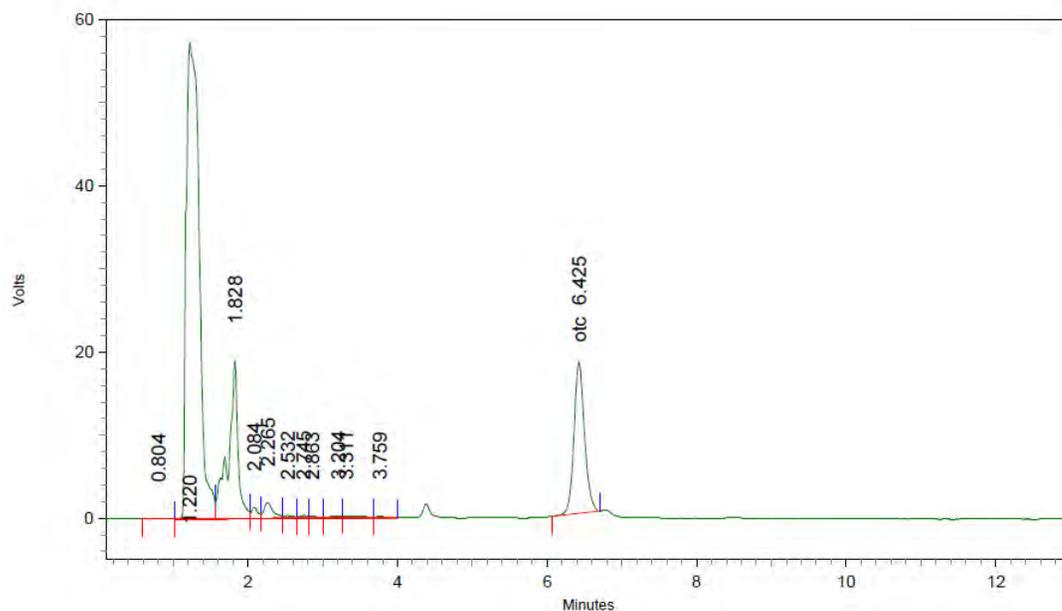


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.447	121751	8929.74



PA-12 OTC 10-noviembre-2015

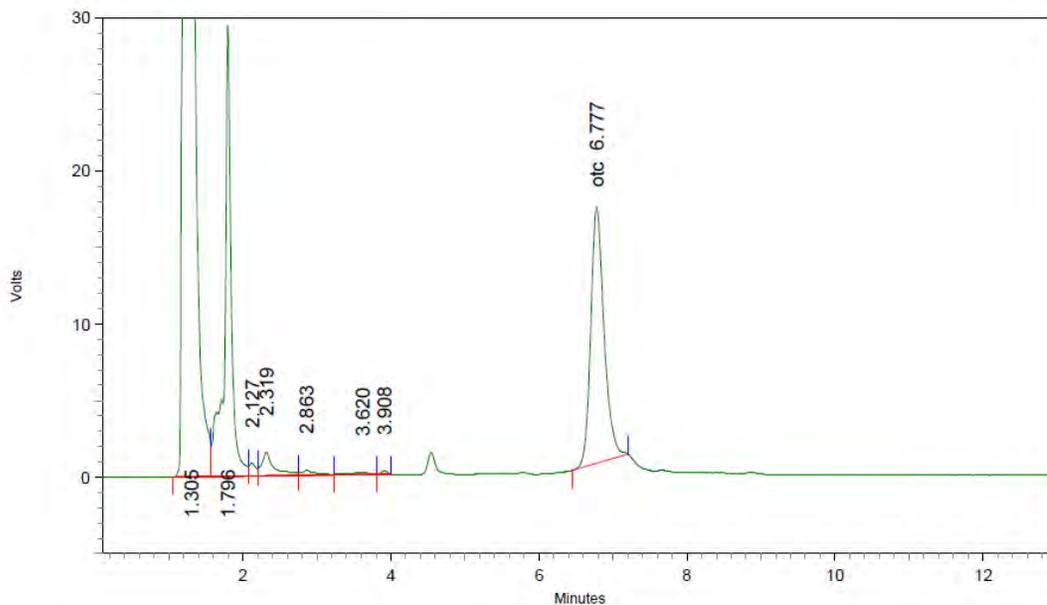


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.425	178331	9994.41



NB-9 OTC 19-Noviembre-2015

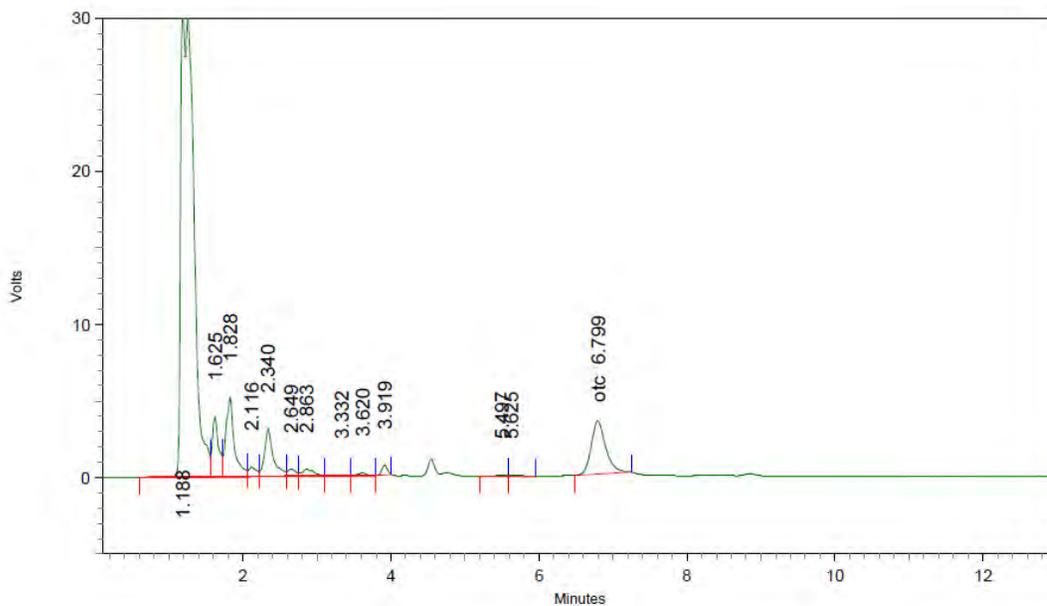


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.777	209167	7052.36



NB-10 OTC 19-Noviembre-2015

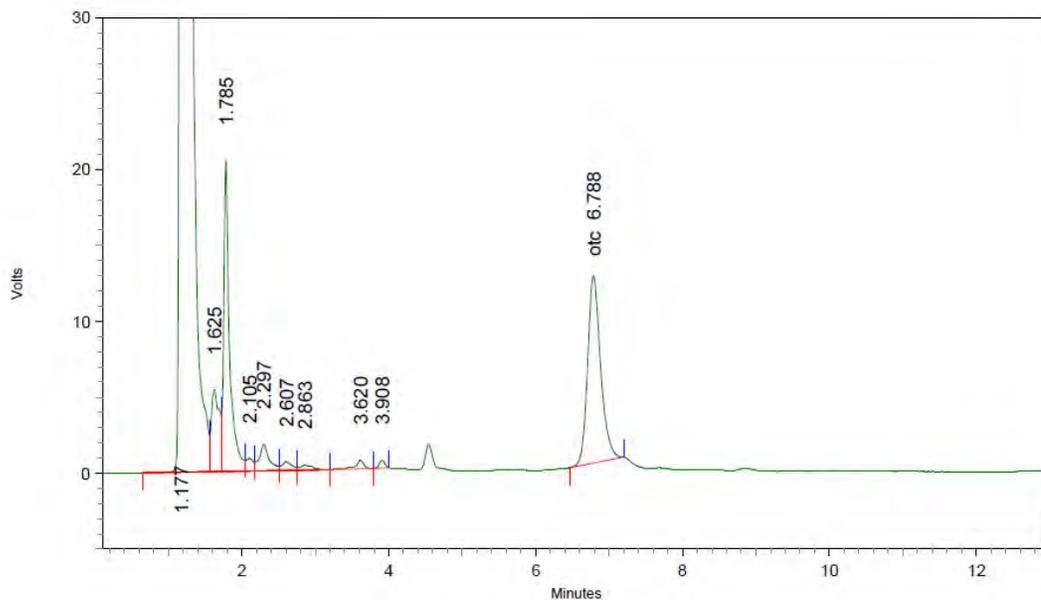


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.799	47101	6010.73



NB-11 OTC 19-Noviembre-2015

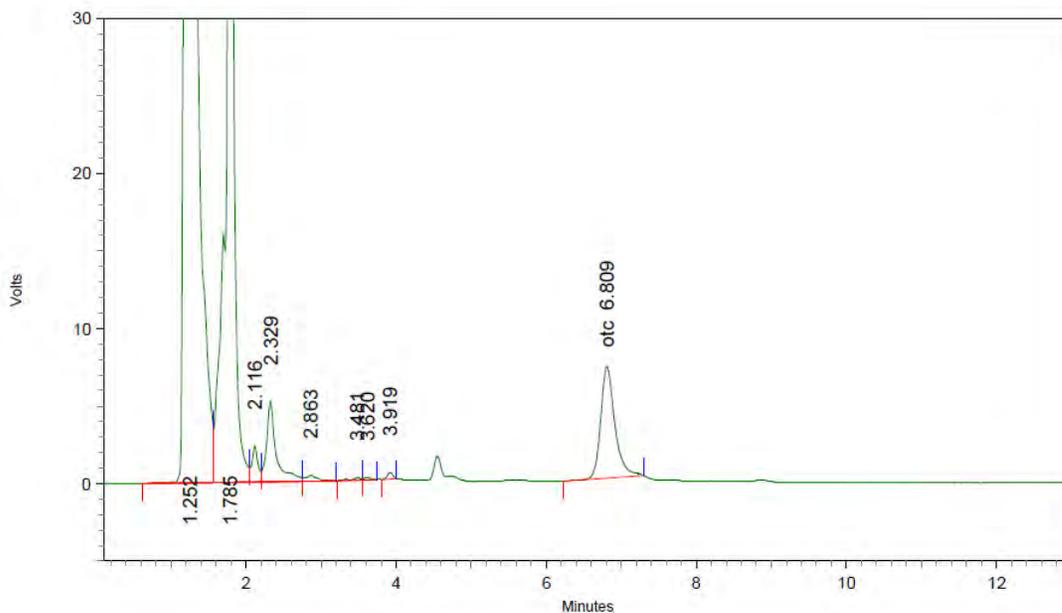


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.788	151751	7151.46



NB-12 OTC 19-Noviembre-2015

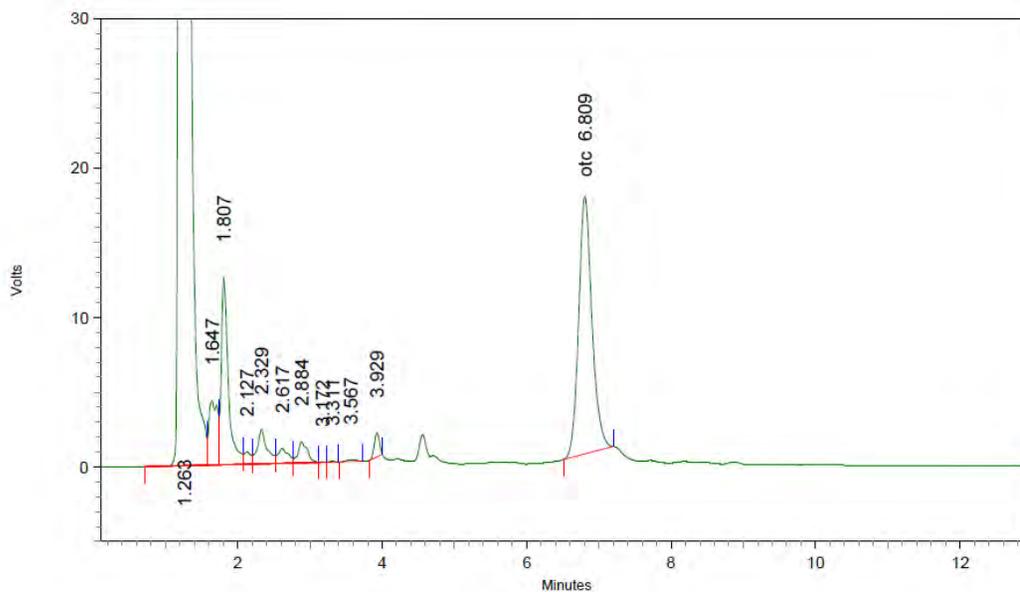


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.809	94586	6816.80



NB-13 OTC 19-Noviembre-2015

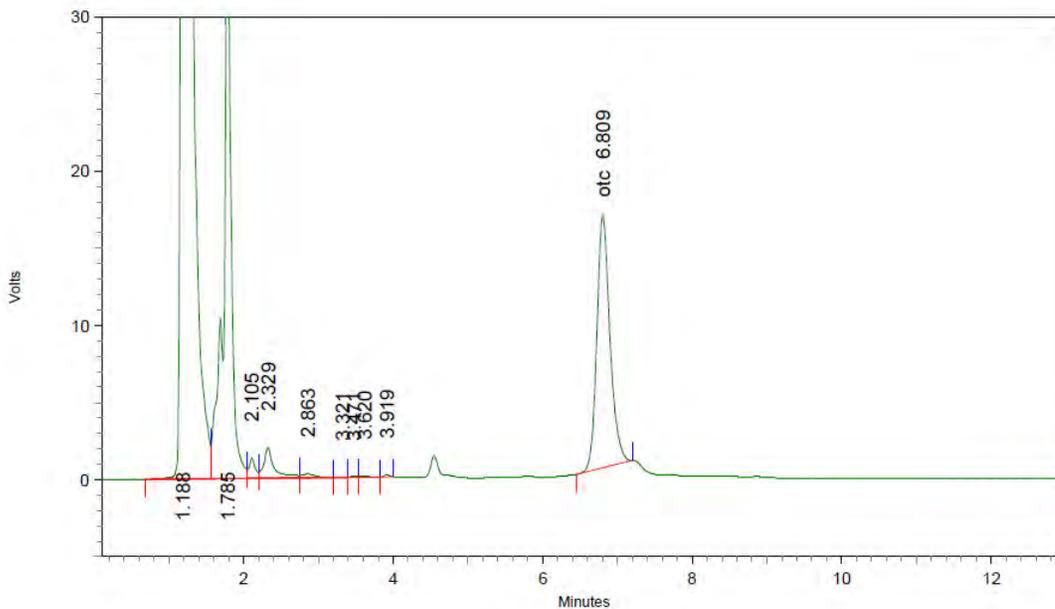


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.809	220804	6668.18



PB-9 OTC 19-Noviembre-2015

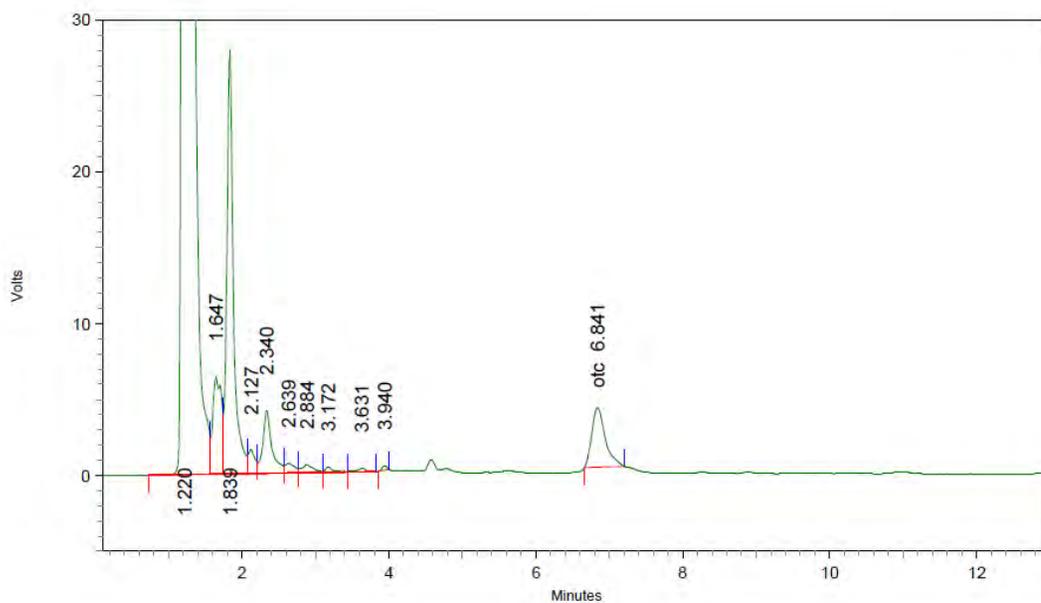


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.809	199040	7255.70



PB-10 OTC 19-Noviembre-2015

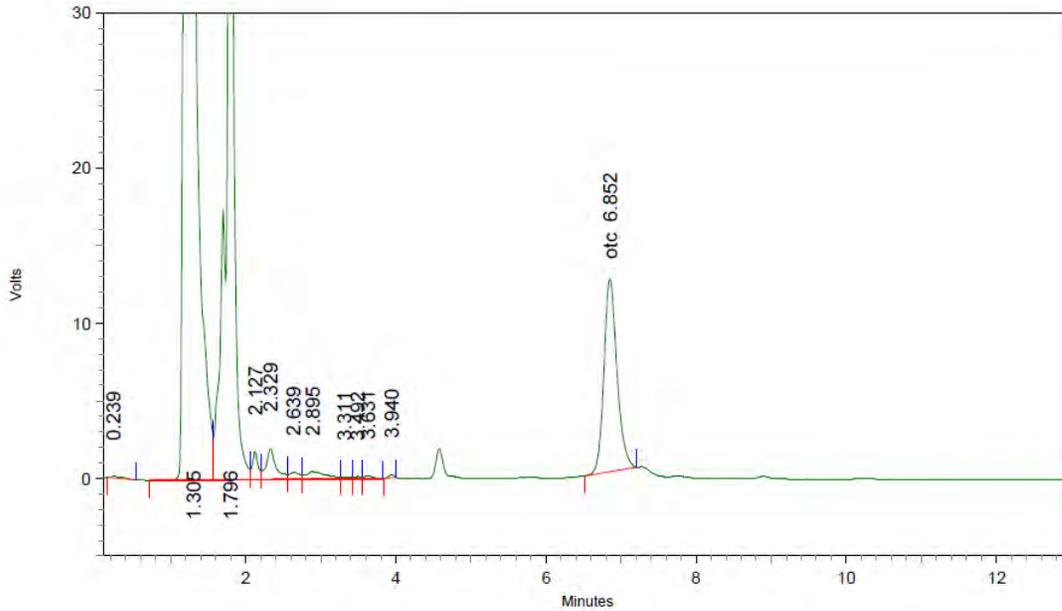


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.841	49940	7087.31



PB-11 OTC 19-Noviembre-2015

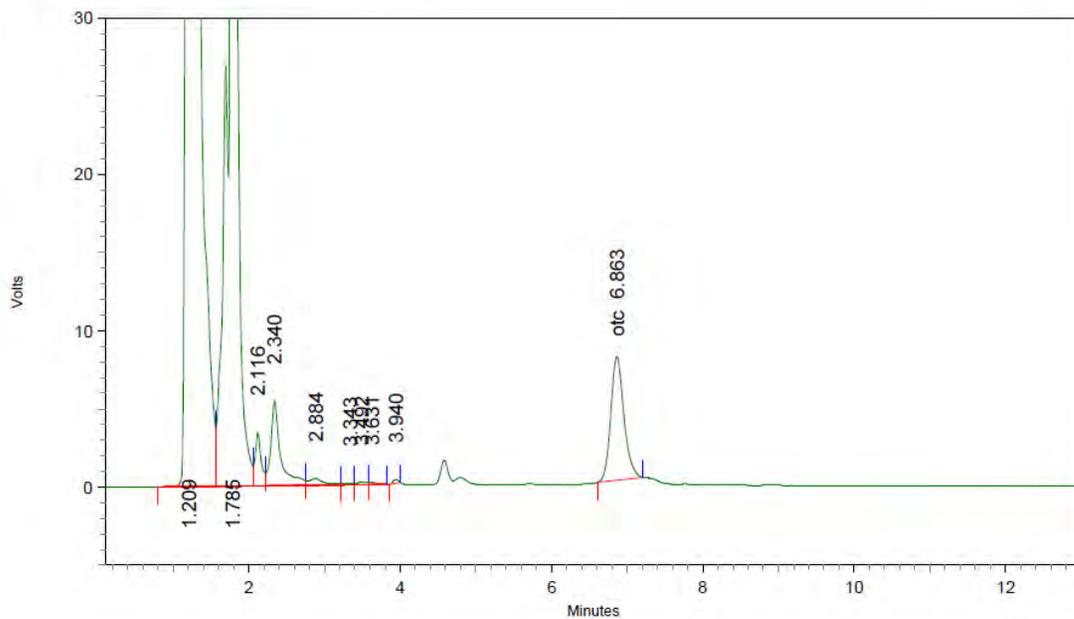


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.852	150023	7484.01



PB-12 OTC 19-Noviembre-2015

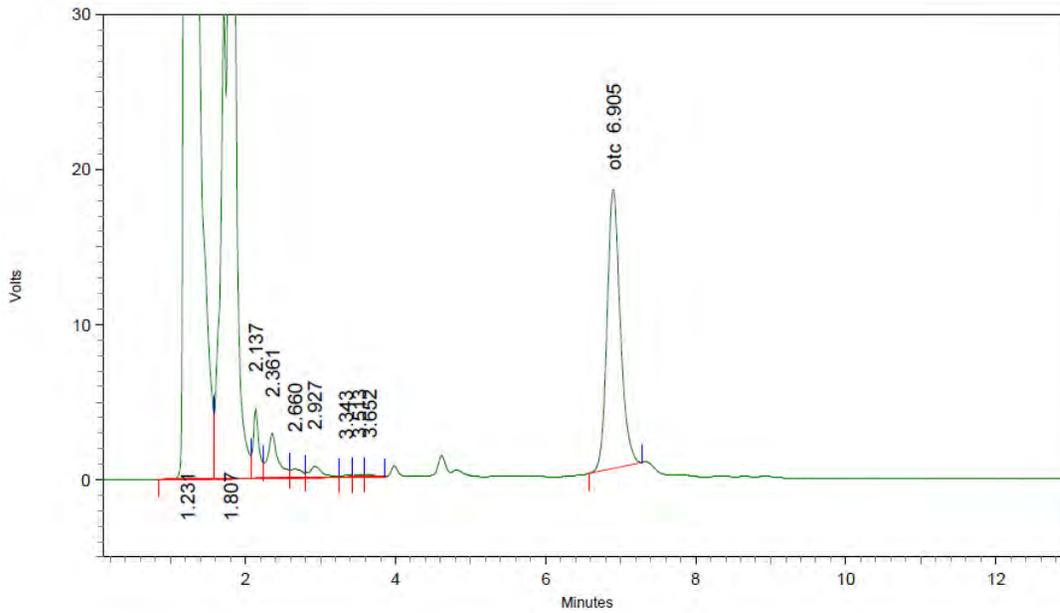


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.863	95650	7521.33



PB-13 OTC 19-Noviembre-2015

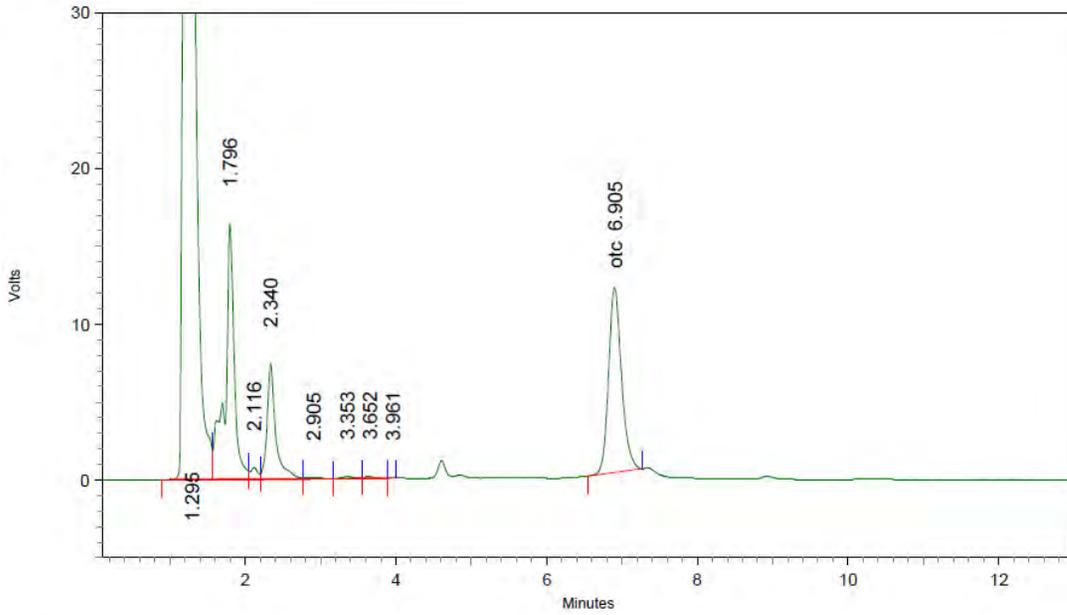


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.905	219800	7457.79



NC-9 OTC 19-Noviembre-2015

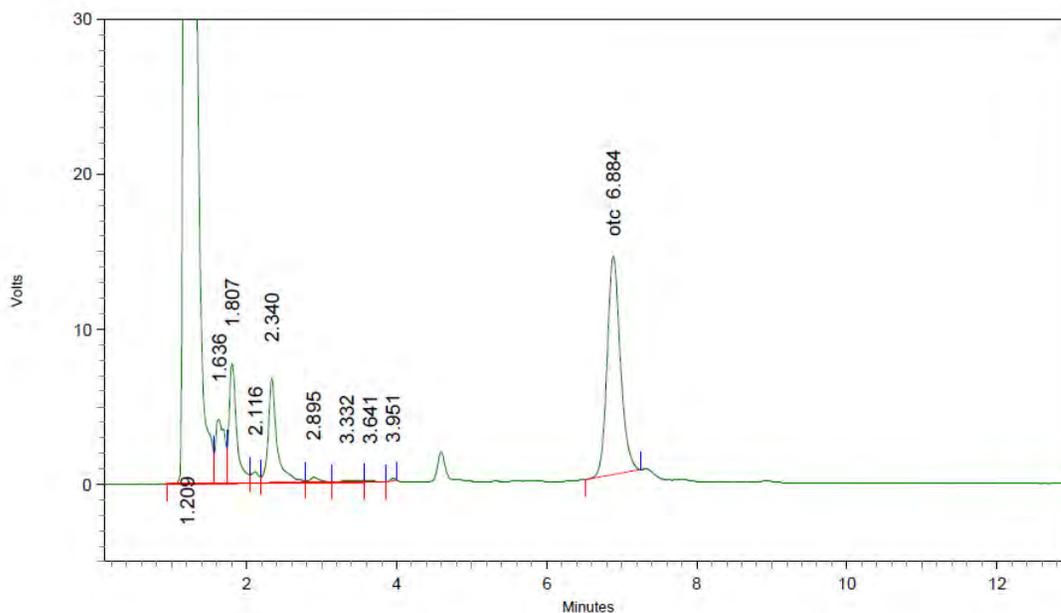


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.905	141839	7757.99



NC-10 OTC 19-Noviembre-2015

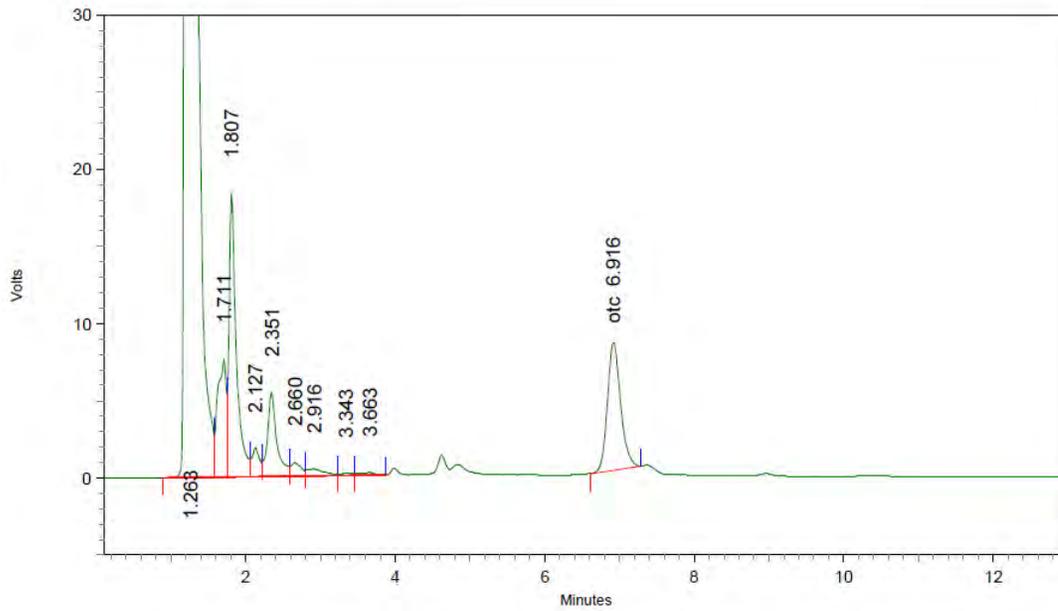


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.884	172781	7266.93



NC-11 OTC 19-Noviembre-2015

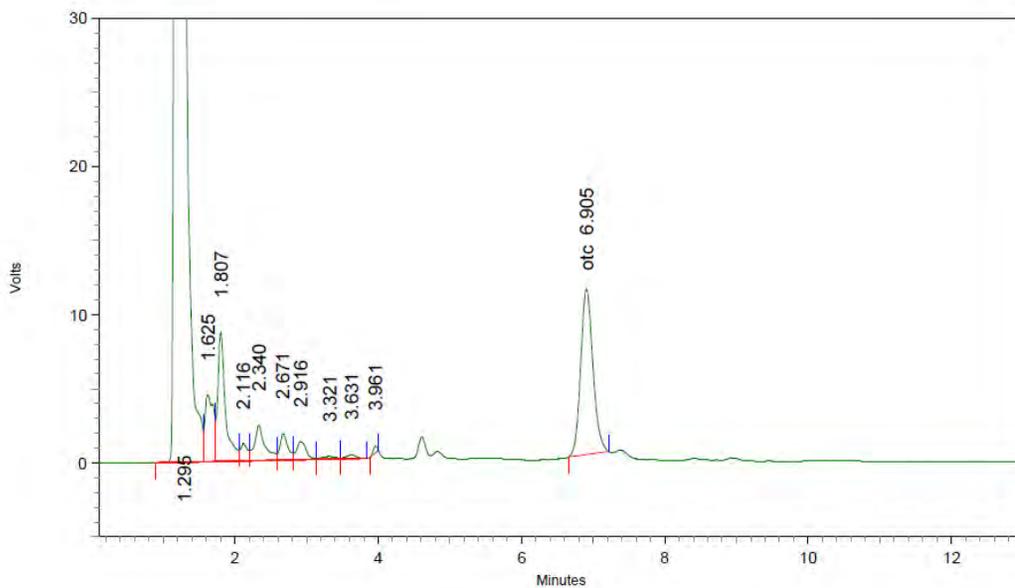


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.916	101588	7340.08



NC-12 OTC 19-Noviembre-2015

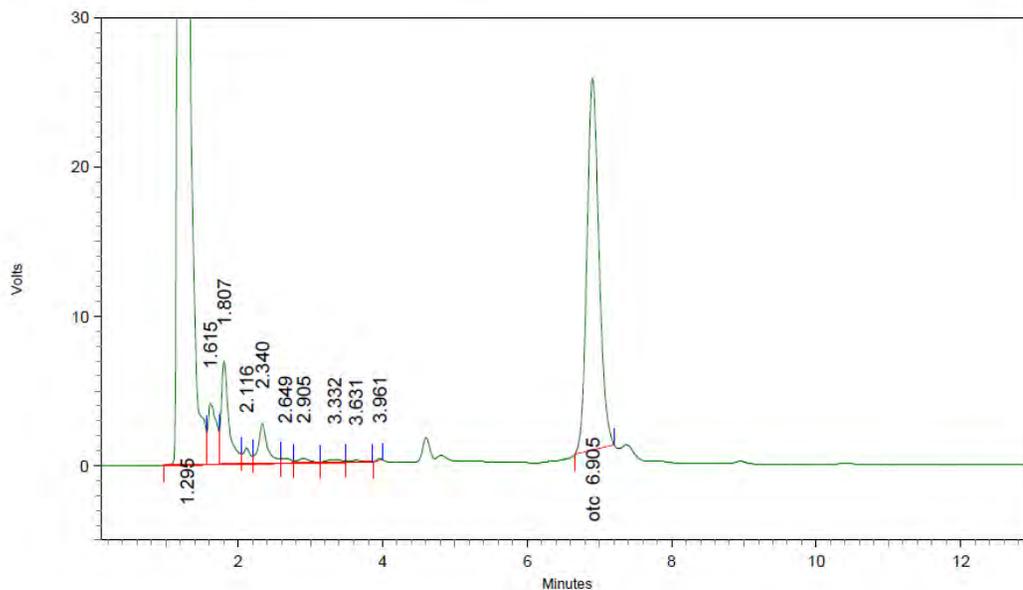


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.905	132501	7546.45



NC-13 OTC 19-Noviembre-2015

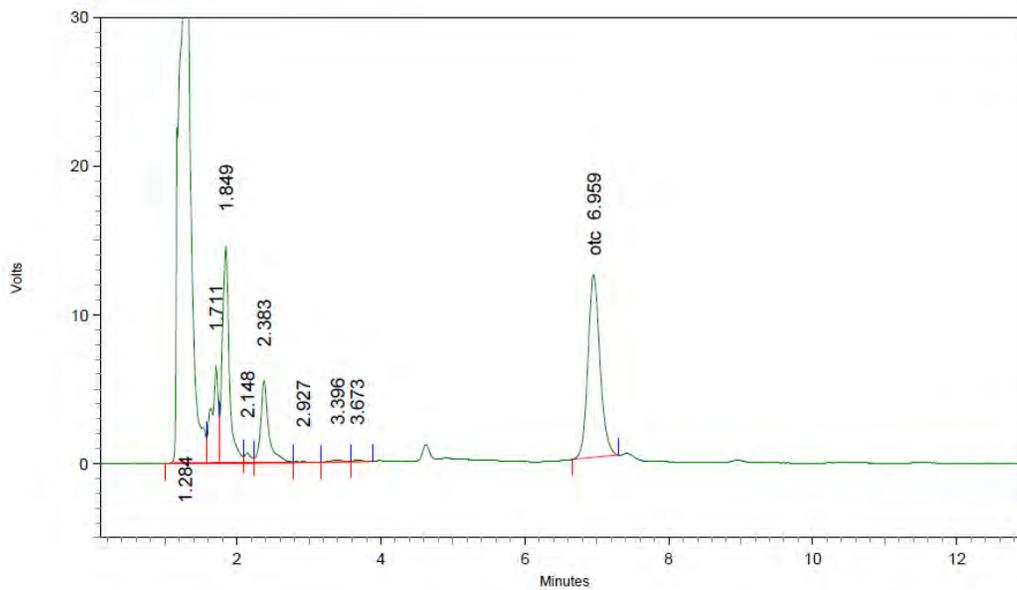


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.905	287660	8111.86



PC-9 OTC 19-Noviembre-2015

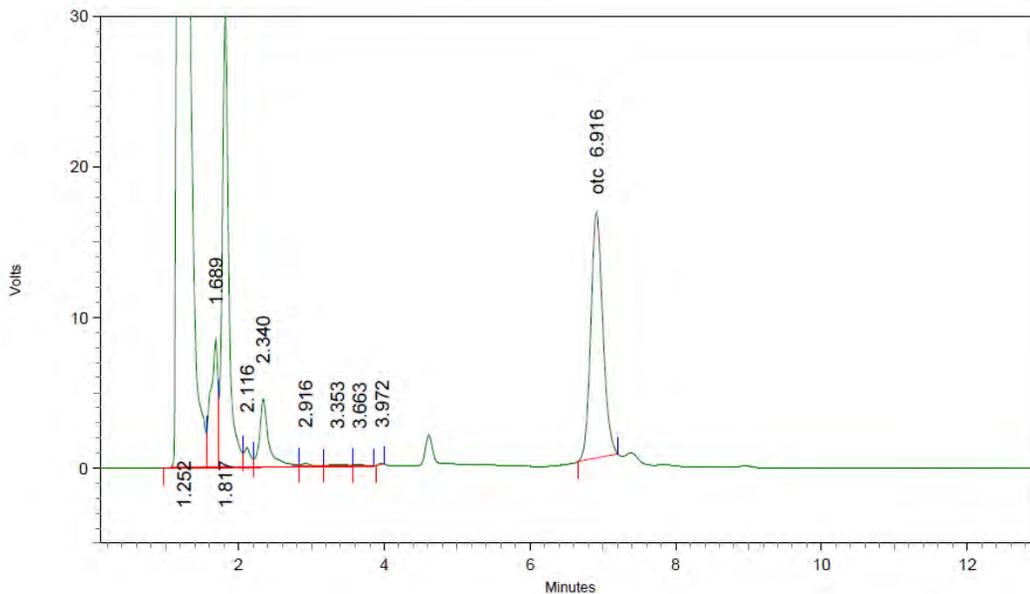


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.959	142931	8247.27



PC-10 OTC 19-Noviembre-2015

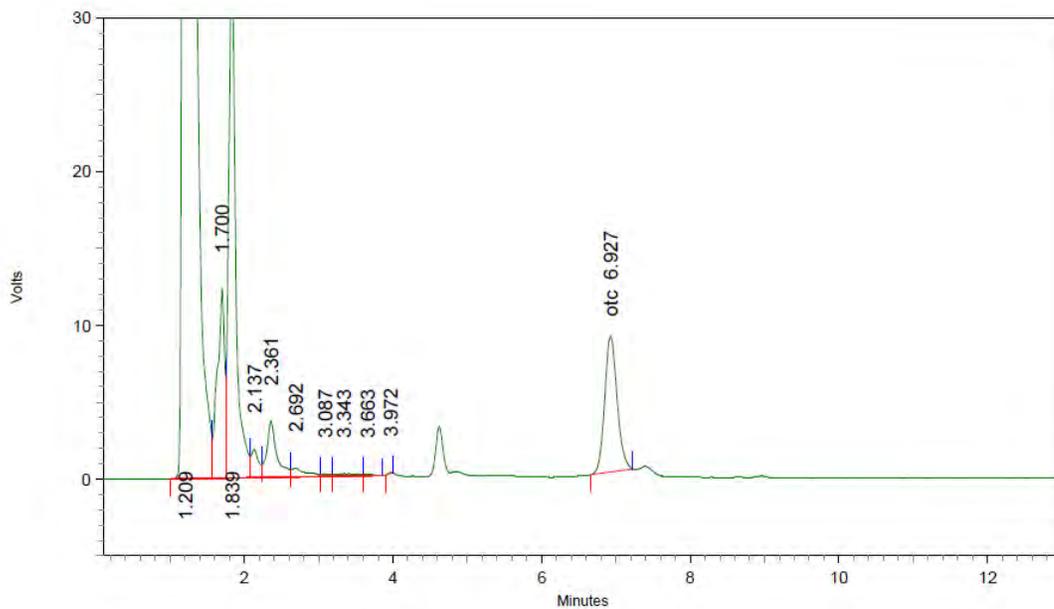


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.916	187256	8173.25



PC-11 OTC 19-Noviembre-2015

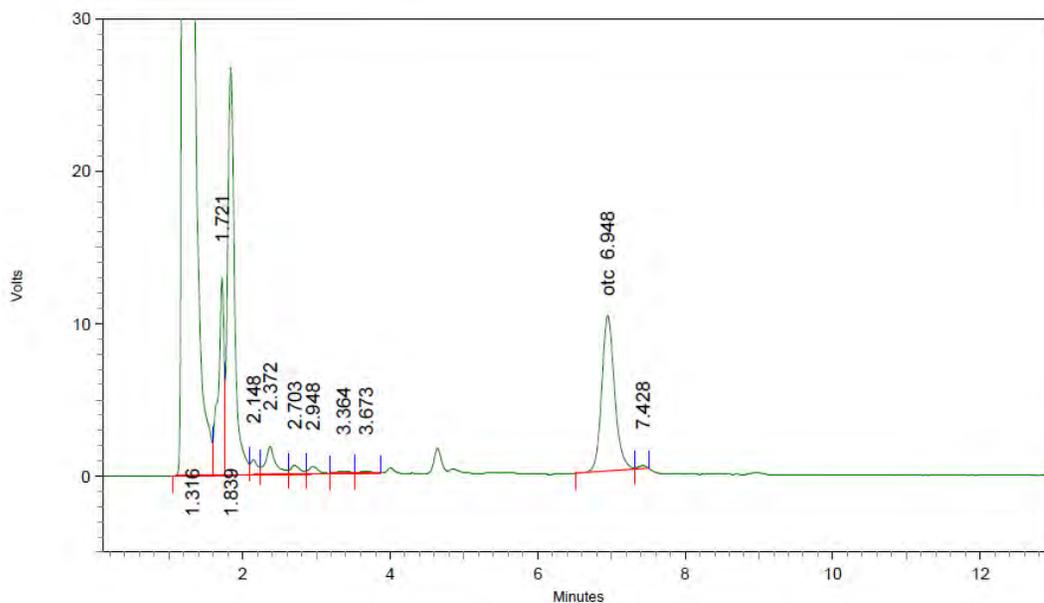


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.927	102445	8205.68



PC-12 OTC 19-Noviembre-2015

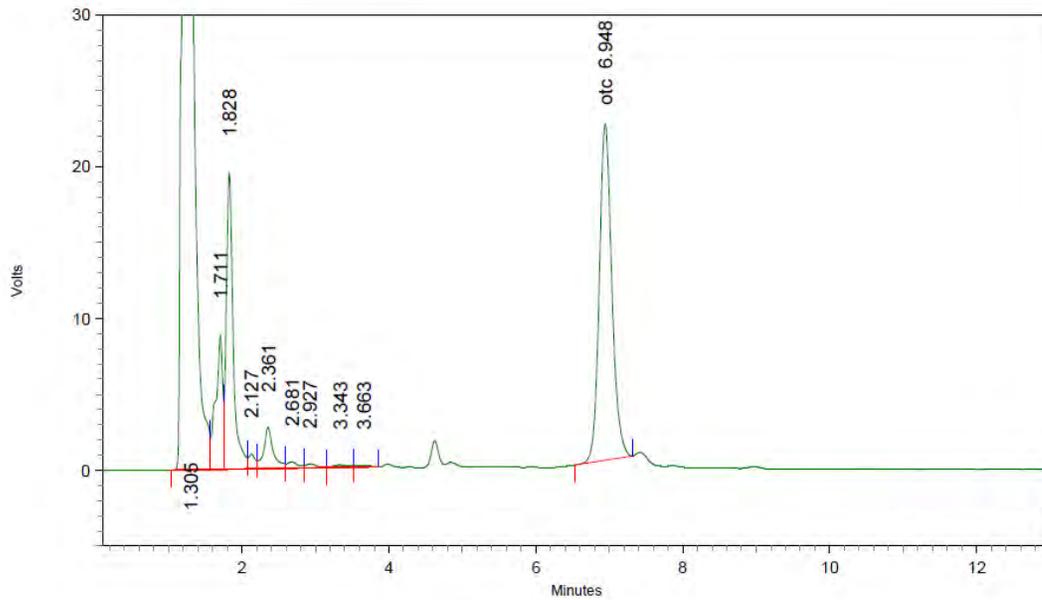


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.948	123444	7641.41



PC-13 OTC 19-Noviembre-2015

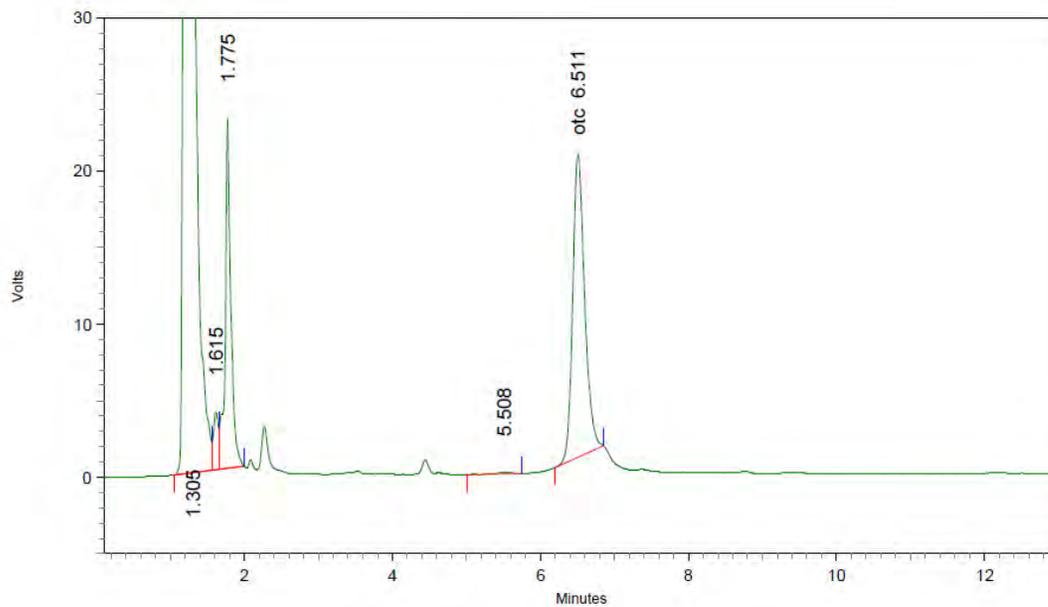


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.948	263155	7987.79



NA-14 OTC 30-Noviembre-2015

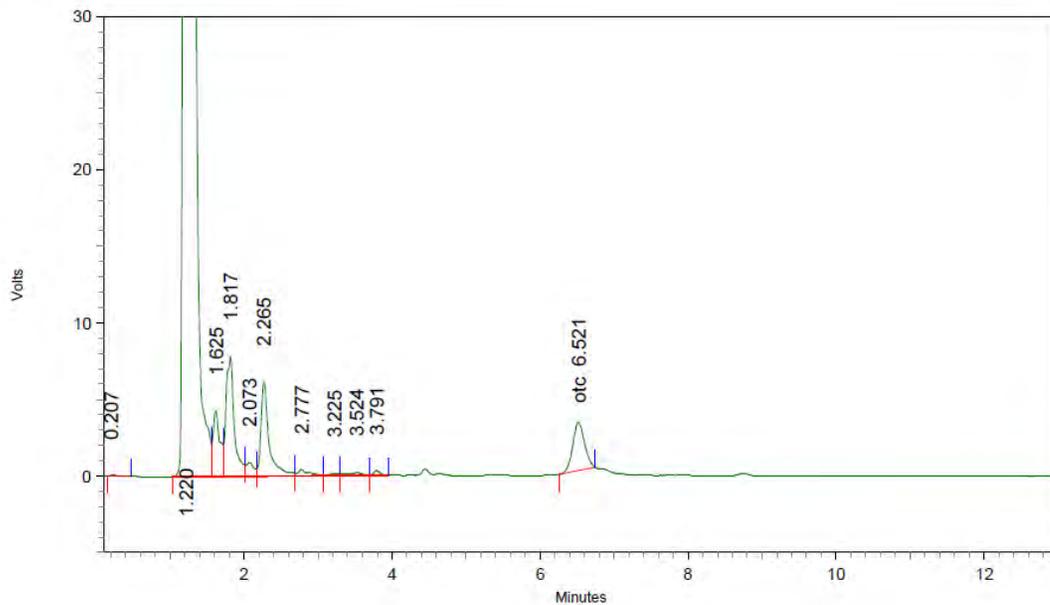


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.511	221007	8000.71



NA-15 OTC 30-Noviembre-2015

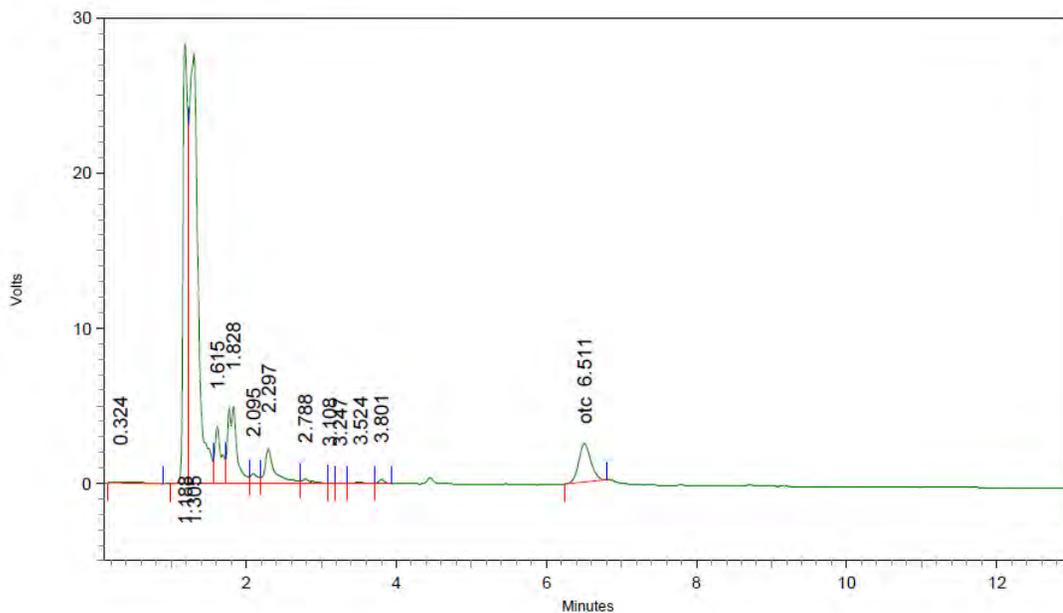


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.521	34998	7356.45



NA-16 OTC 30-Noviembre-2015

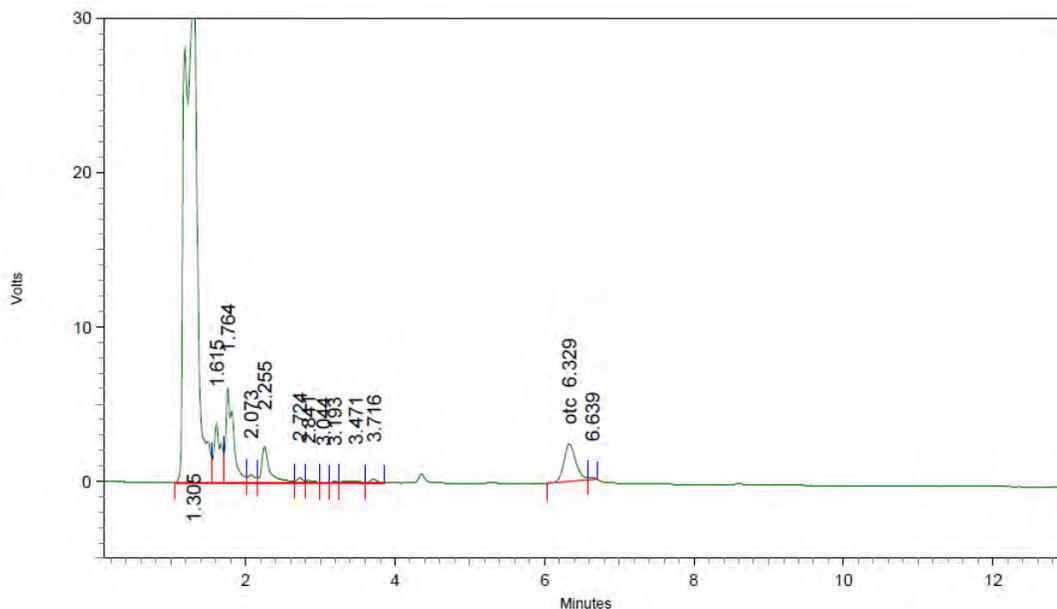


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.511	27770	7640.95



NA-17 OTC 30-Noviembre-2015

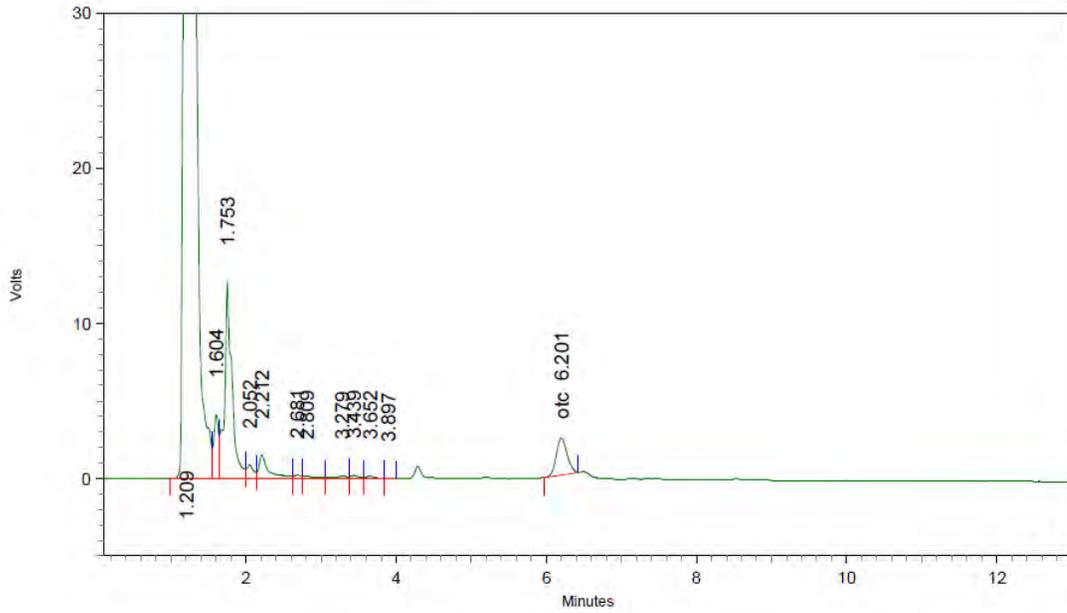


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.329	26908	7414.60



NA-18 OTC 30-Noviembre-2015

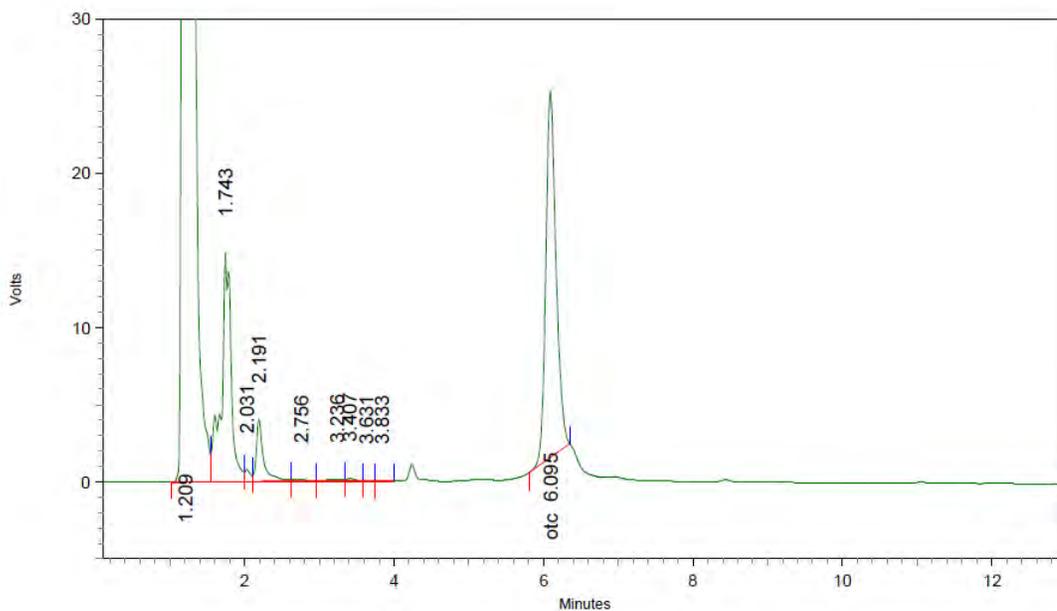


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.201	23618	8546.47



PA-14 OTC 30-Noviembre-2015

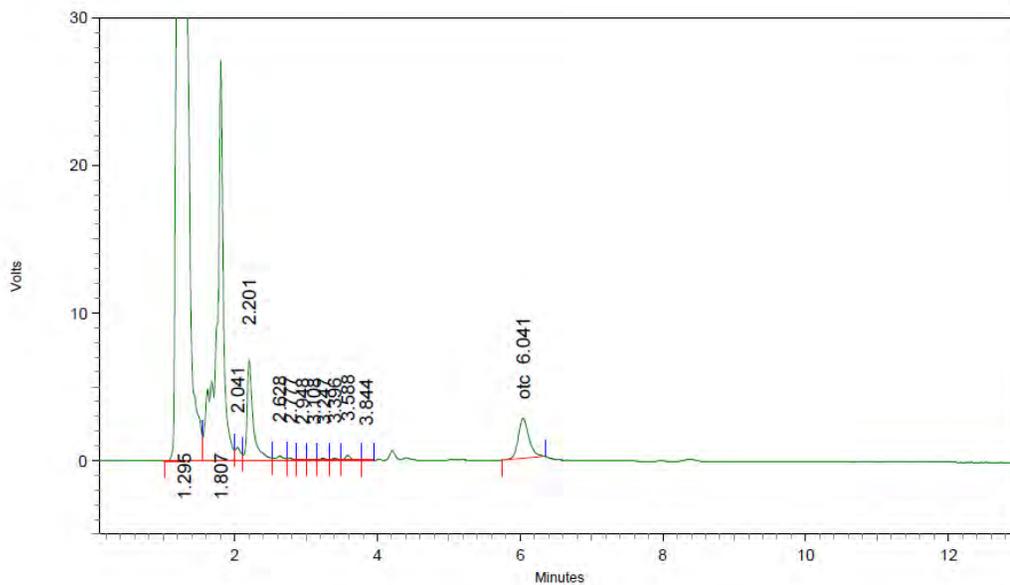


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.095	226279	9054.72



PA-15 OTC 30-Noviembre-2015

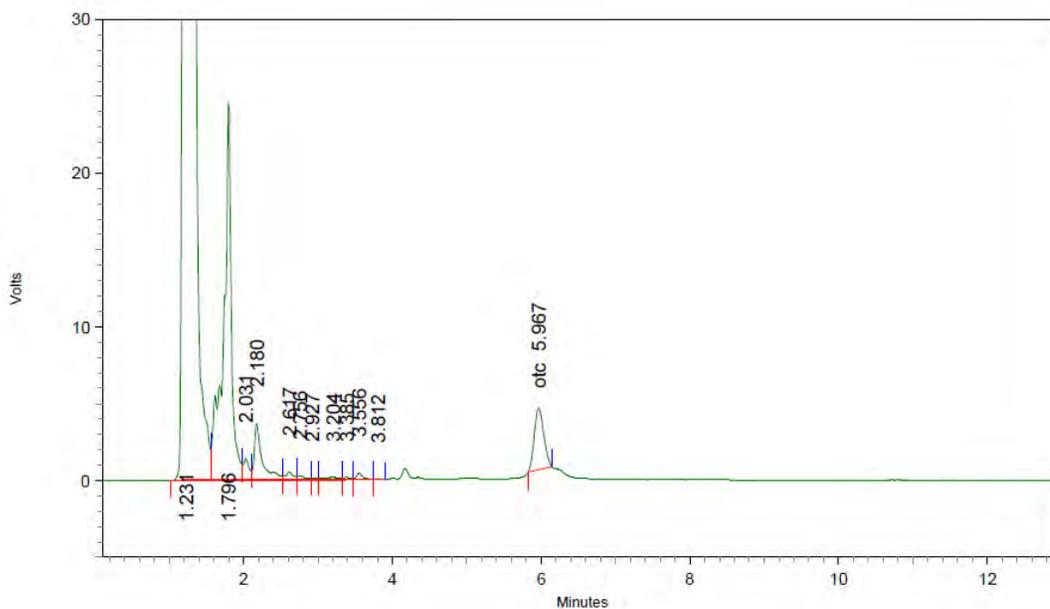


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.041	28125	7858.26



PA-16 OTC 30-Noviembre-2015

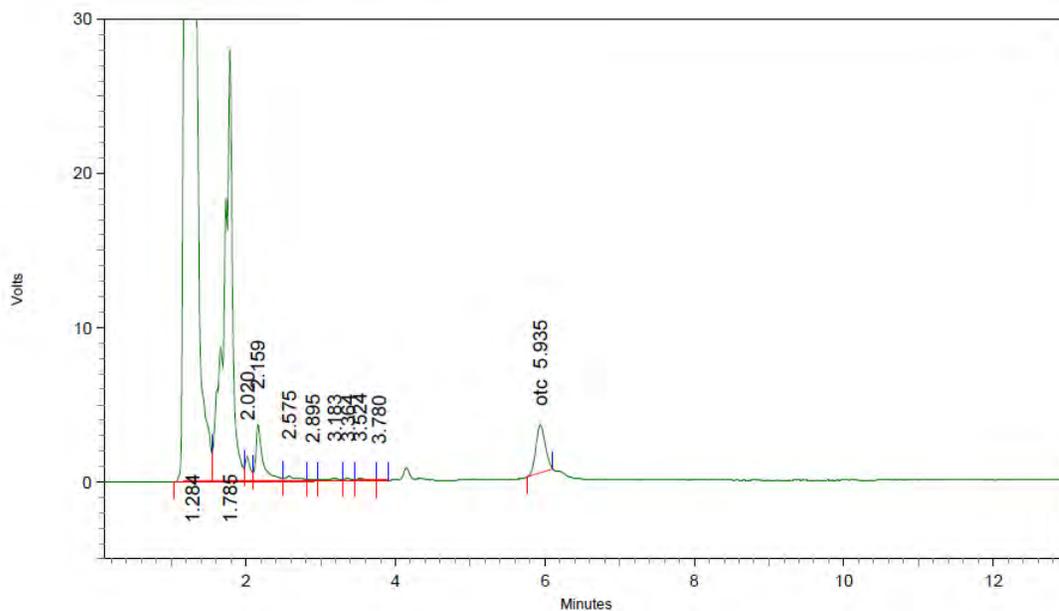


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	5.967	35507	9395.84



PA-17 OTC 30-Noviembre-2015

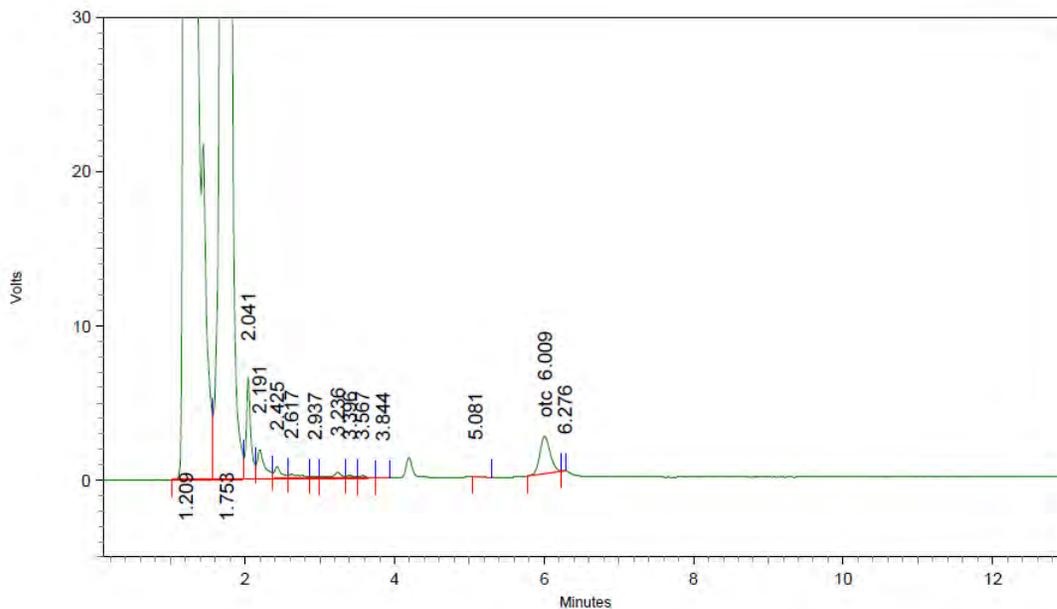


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	5.935	27155	9308.93



PA-18 OTC 30-Noviembre-2015

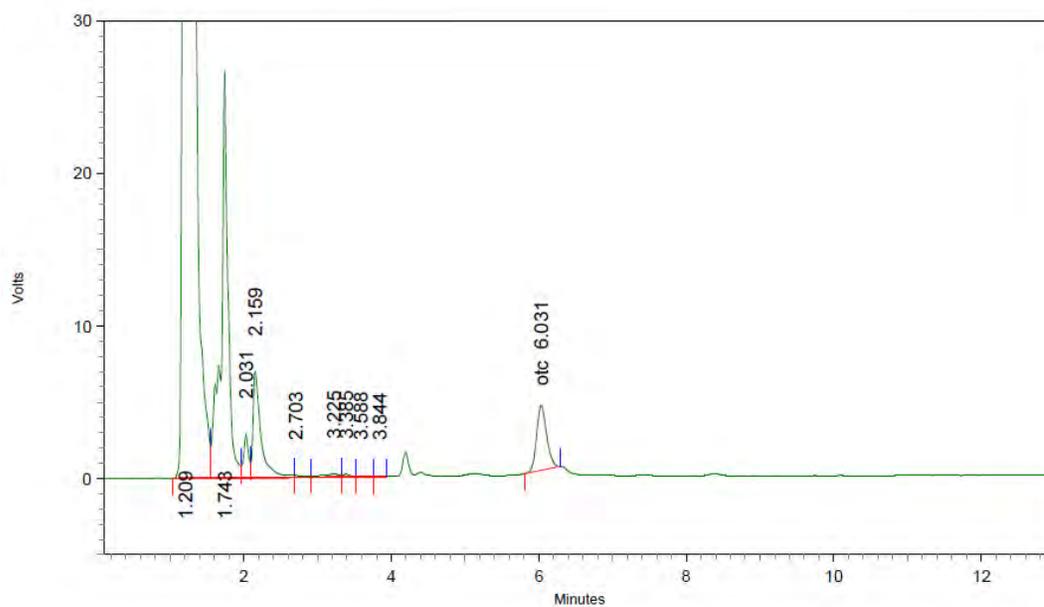


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.009	23288	8529.10



NB-14 OTC 30-Noviembre-2015

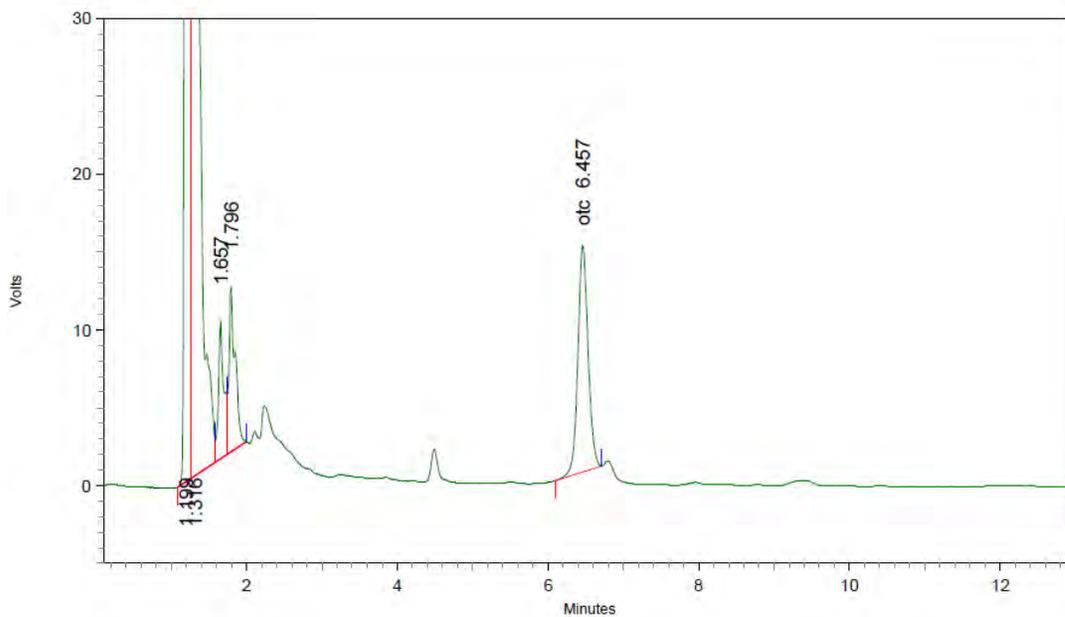


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.031	40164	9065.36



NB 15 OTC 20-Enero-2016

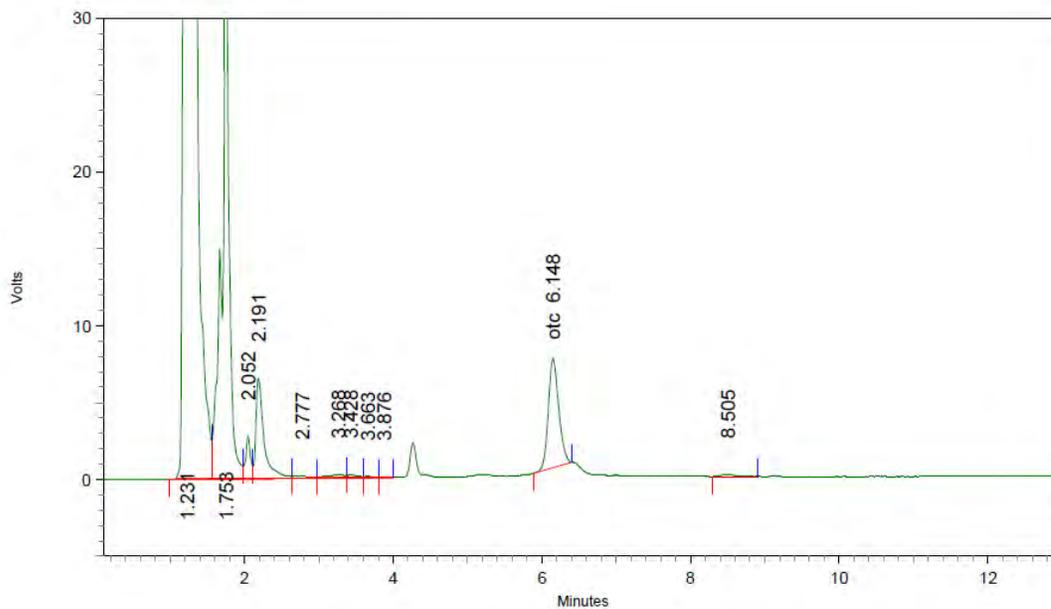


2: 355 mm, 8 mm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.457	136792	10991.21



NB-16 OTC 30-Noviembre-2015

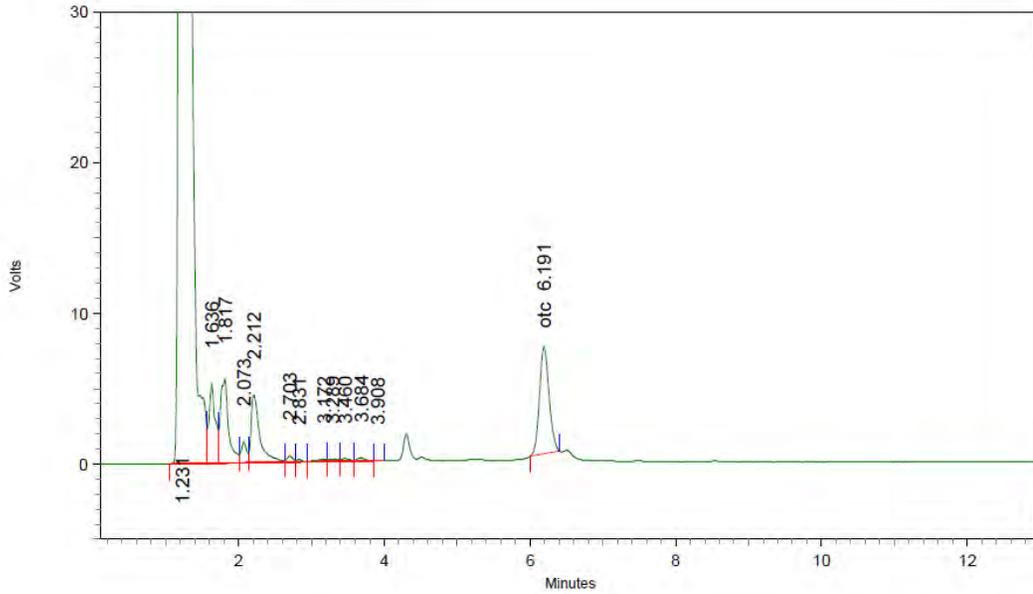


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.148	69247	8948.62



NB-17 OTC 30-Noviembre-2015

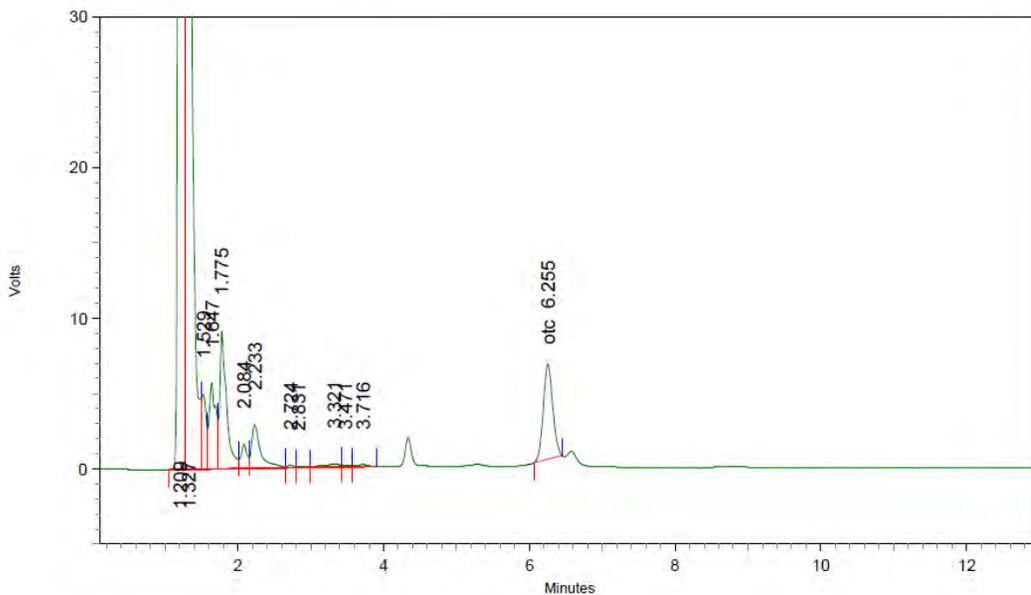


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.191	64929	10043.23



NB-18 OTC 30-Noviembre-2015

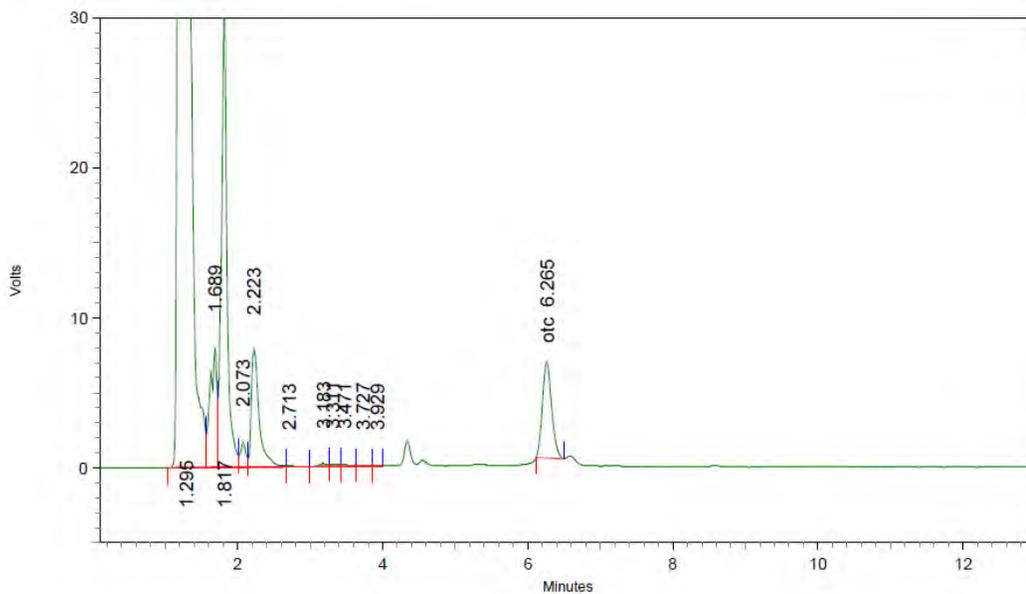


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.255	56515	10471.08



PB-14 OTC 30-Noviembre-2015

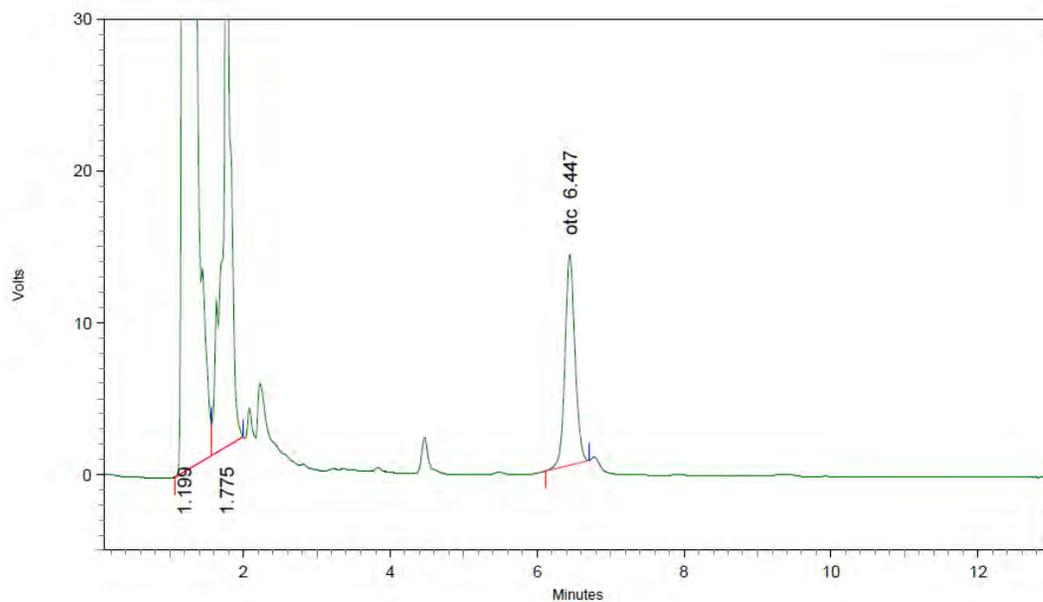


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.265	56599	10985.34



PB 15 OTC 20-Enero-2016

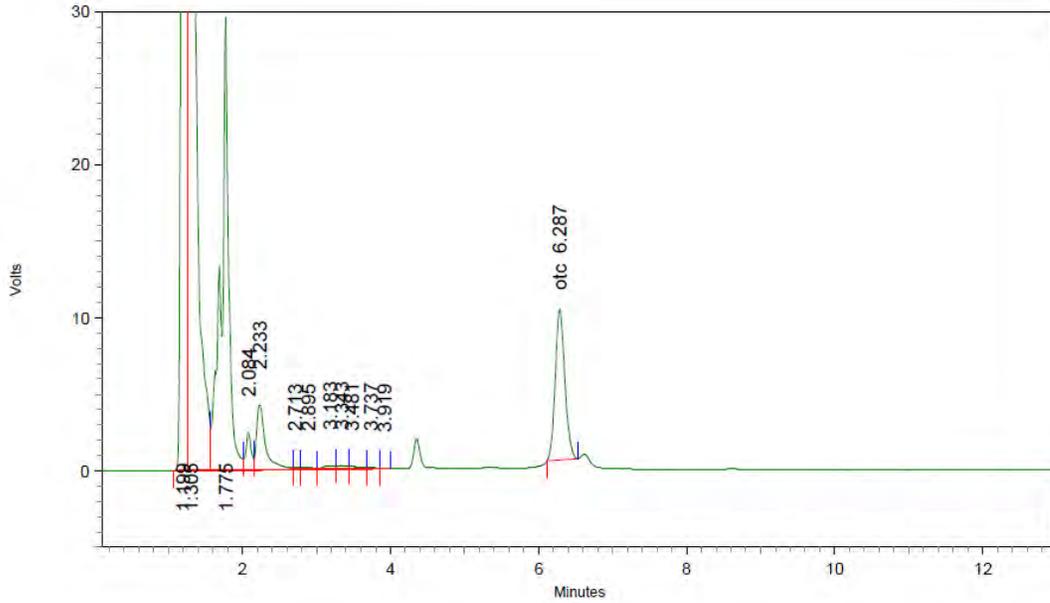


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.447	131484	10535.62



PB-16 OTC 30-Noviembre-2015

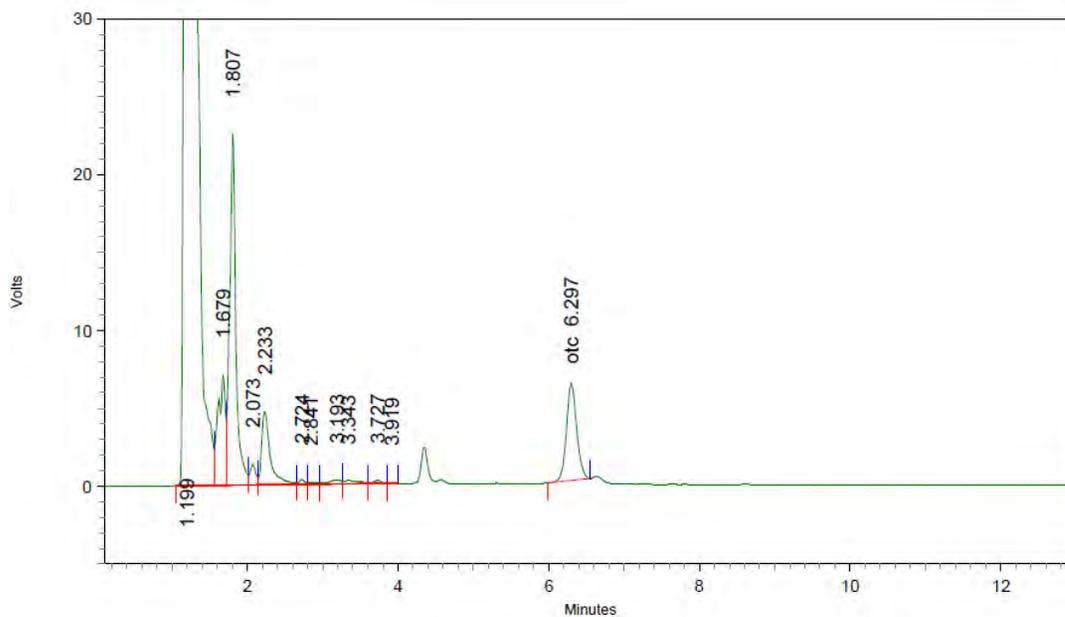


2: 355 nm. 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.287	88682	10613.00



PB-17 OTC 30-Noviembre-2015

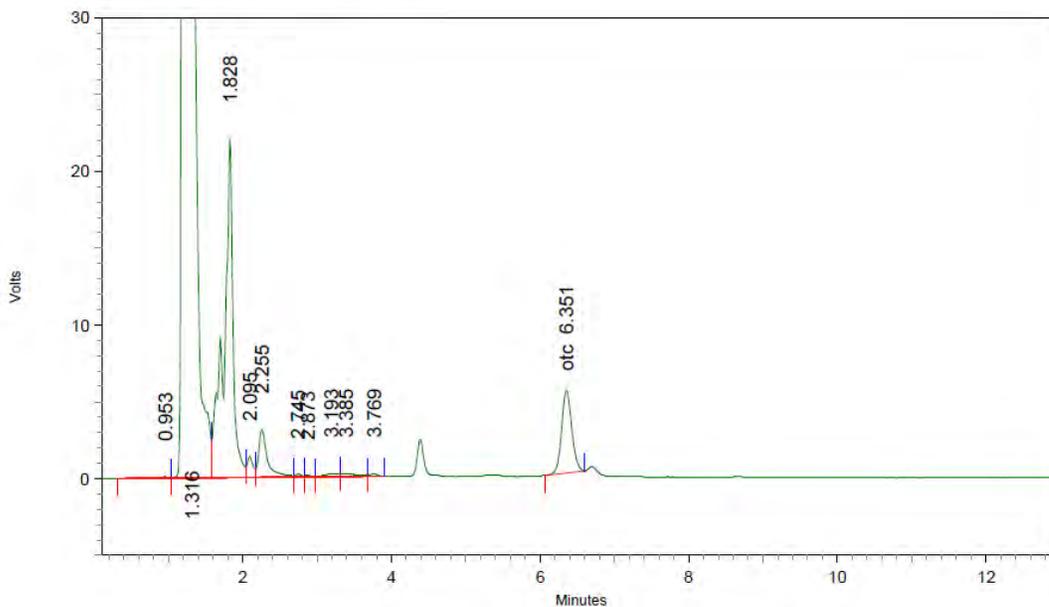


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.297	58937	10151.83



PB-18 OTC 30-Noviembre-2015

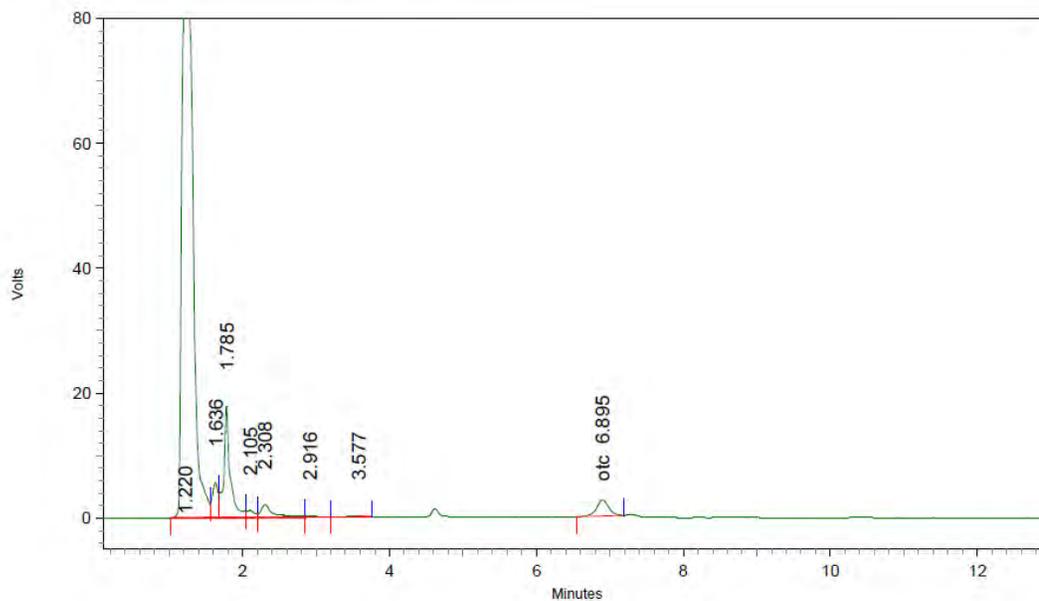


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.351	51031	9842.57



NC-14 OTC 10-Diciembre-2015

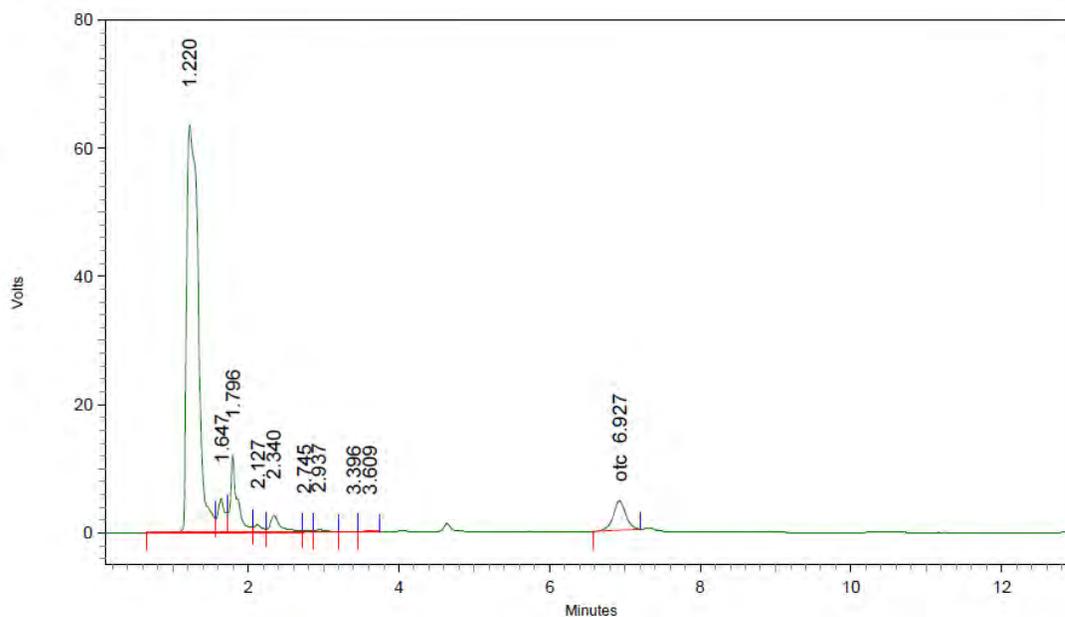


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.895	29813	8607.43



NC-15 OTC 10-Diciembre-2015

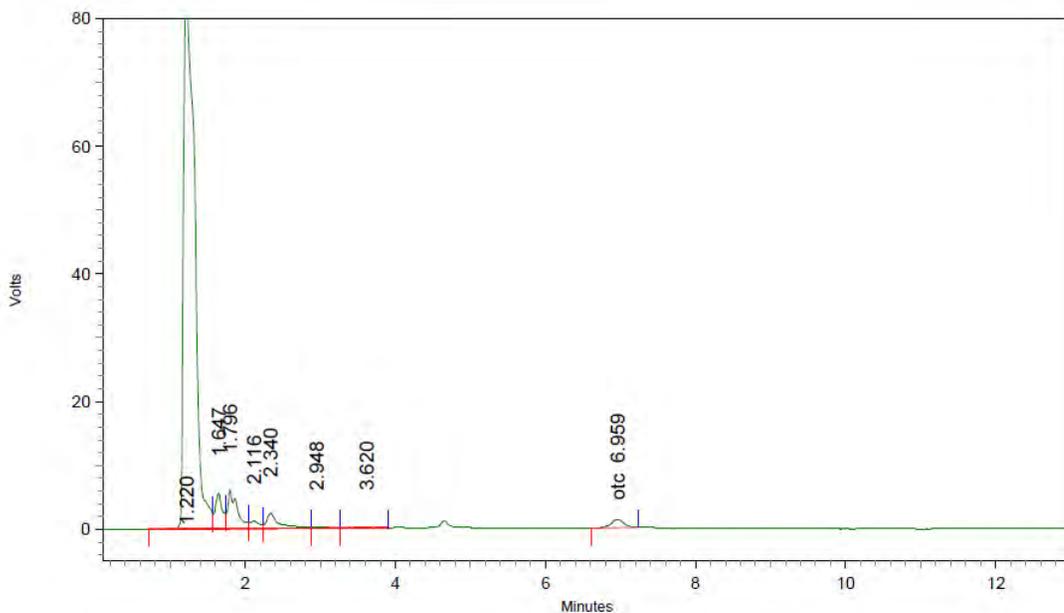


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.927	53109	8492.99



NC-16 OTC 10-Diciembre-2015

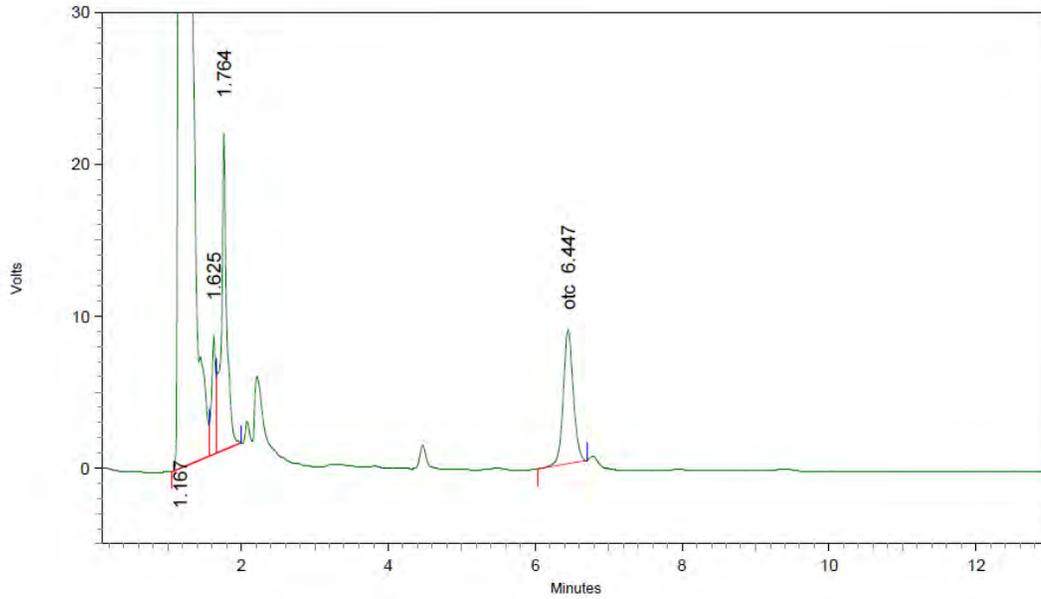


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.959	15690	8283.33



NC 17 OTC 20-Enero-2016

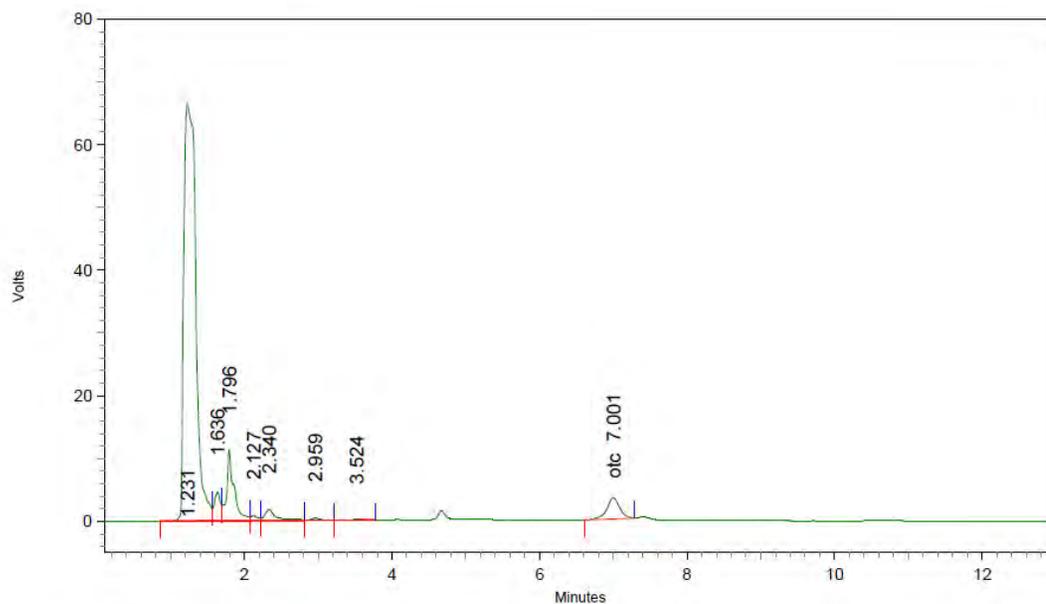


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.447	83367	10756.52



NC-18 OTC 10-Diciembre-2015

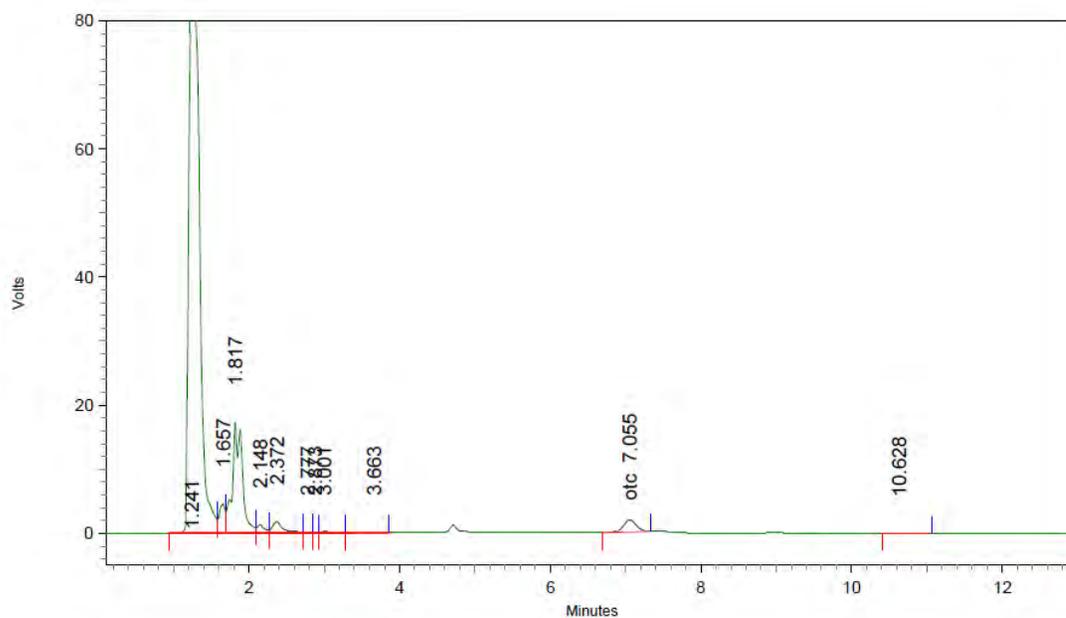


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.001	40726	8204.99



PC-14 OTC 10-Diciembre-2015

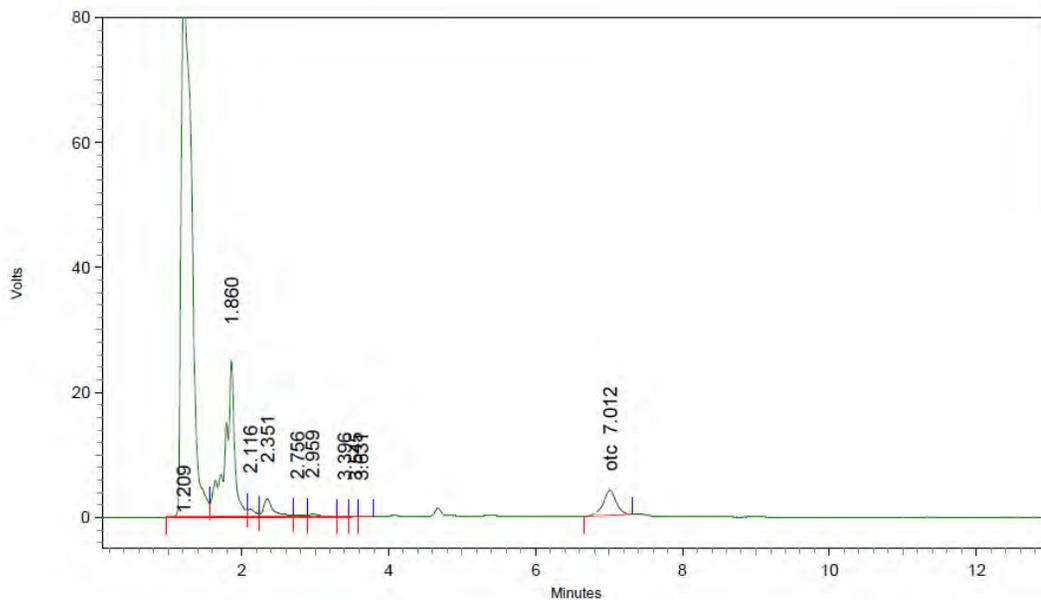


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.055	22163	8497.85



PC-15 OTC 10-Diciembre-2015

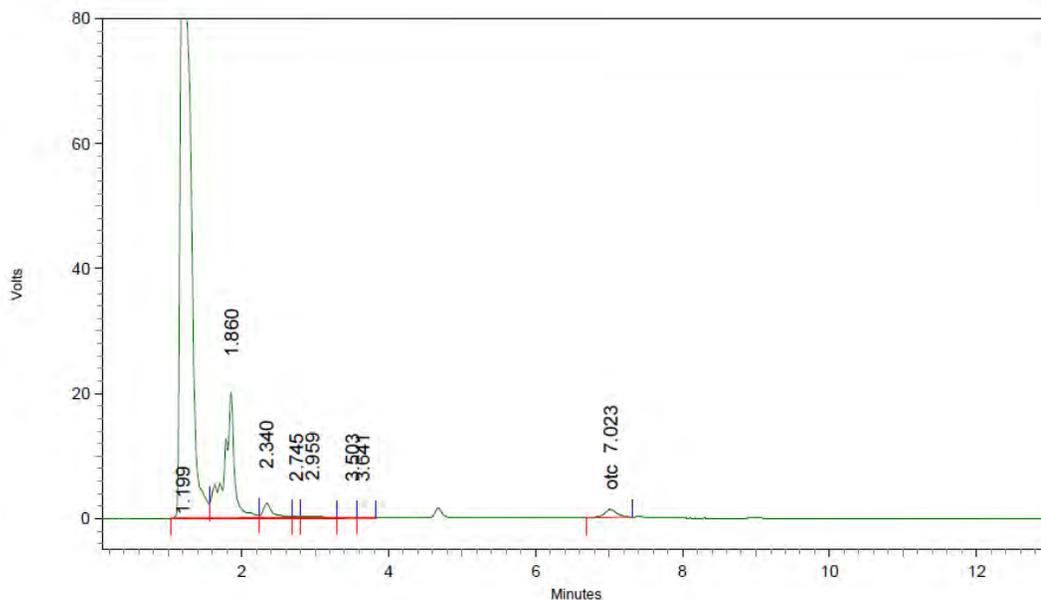


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.012	48984	7902.28



PC-16 OTC 10-Diciembre-2015

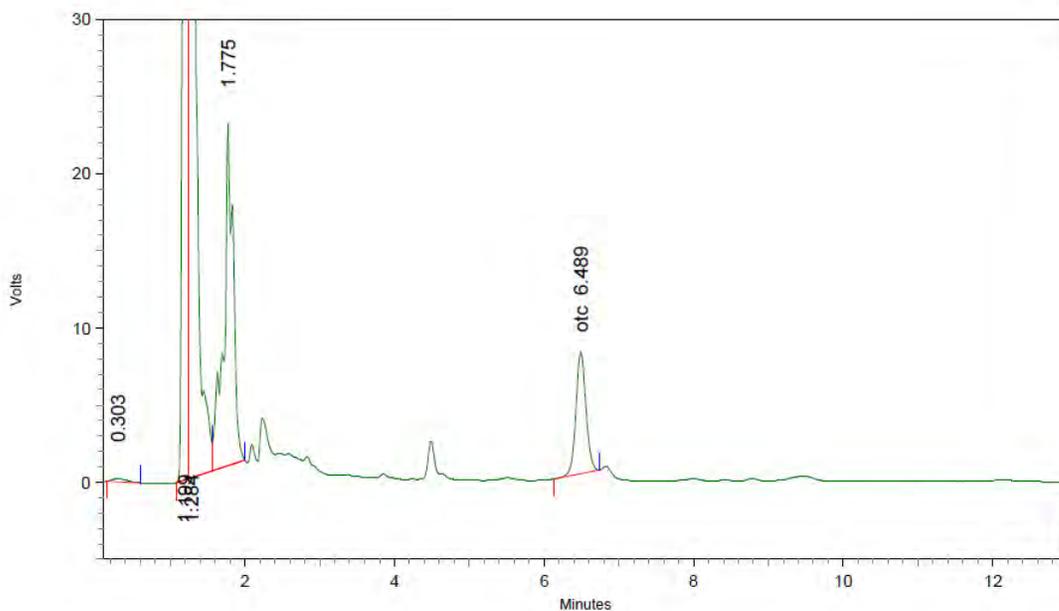


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.023	14800	8062.48



PC 19 OTC 20-Enero-2016

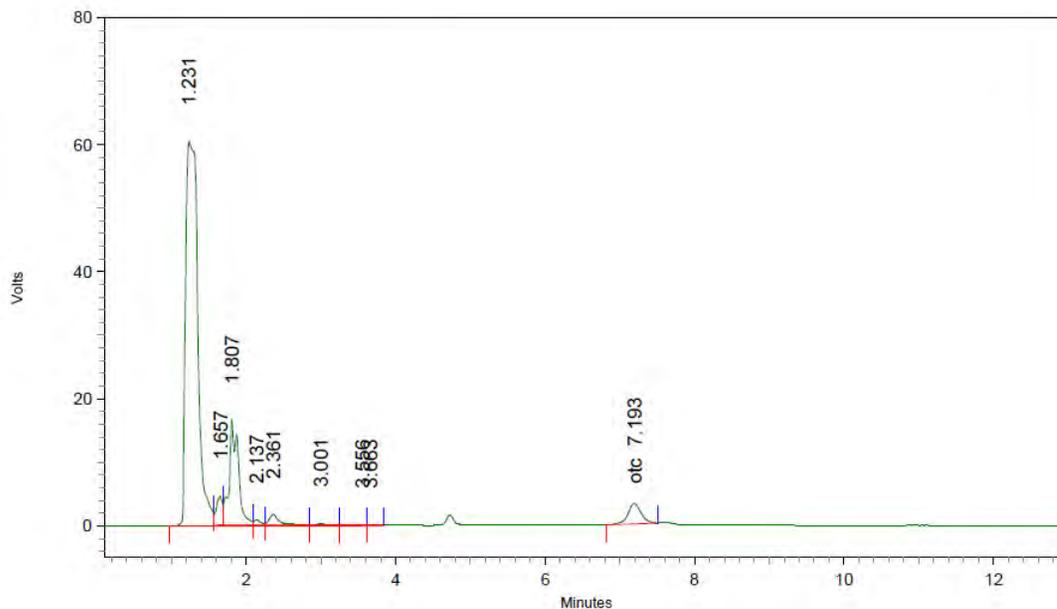


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.489	73468	11092.63



PC-18 OTC 10-Diciembre-2015

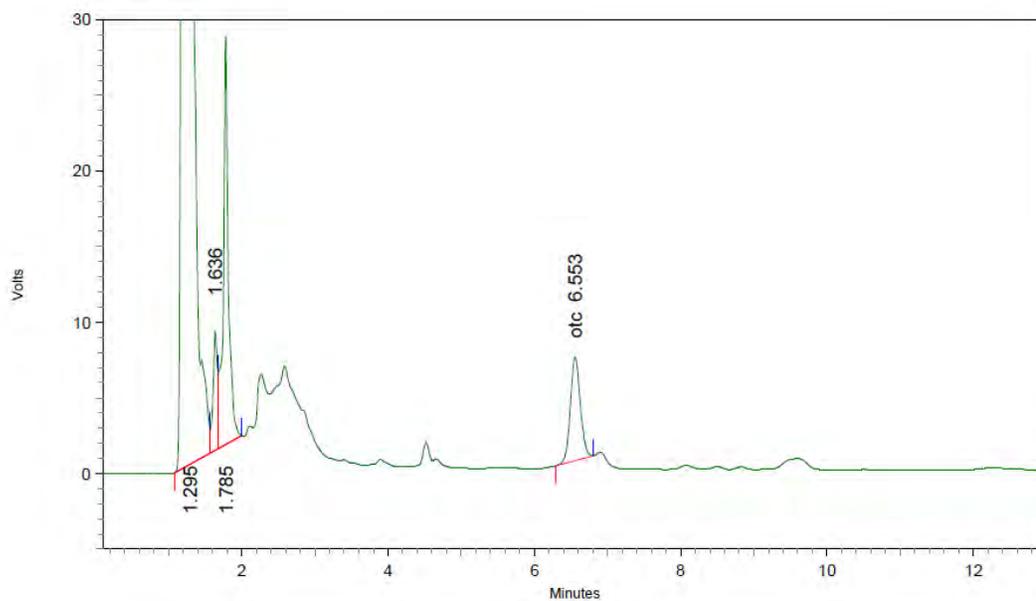


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.193	39075	8458.54



NA 19 OTC 20-Enero-2016

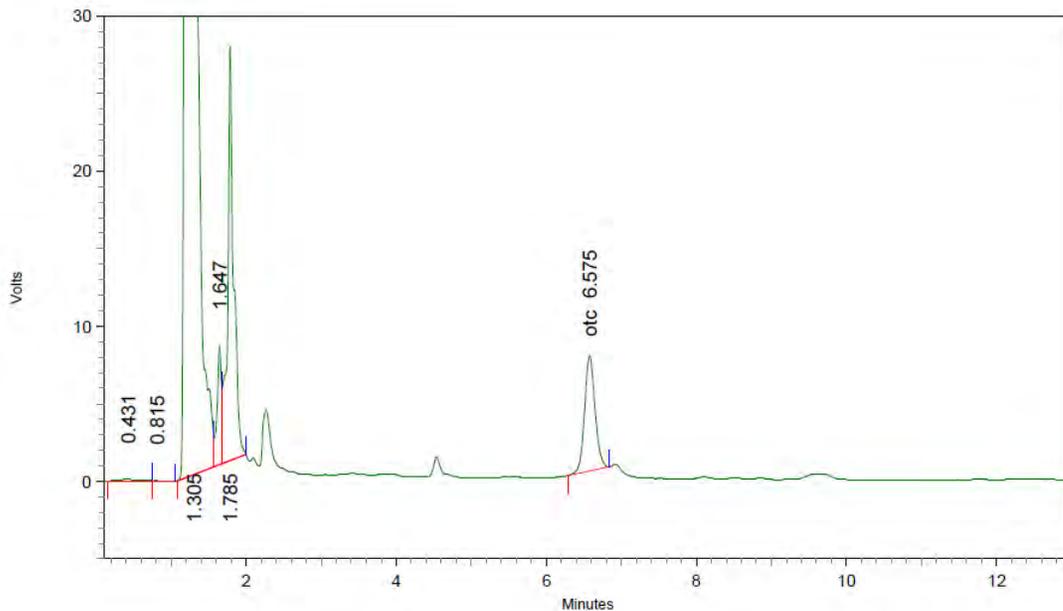


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.553	64294	10515.07



NA 20 OTC 20-Enero-2016

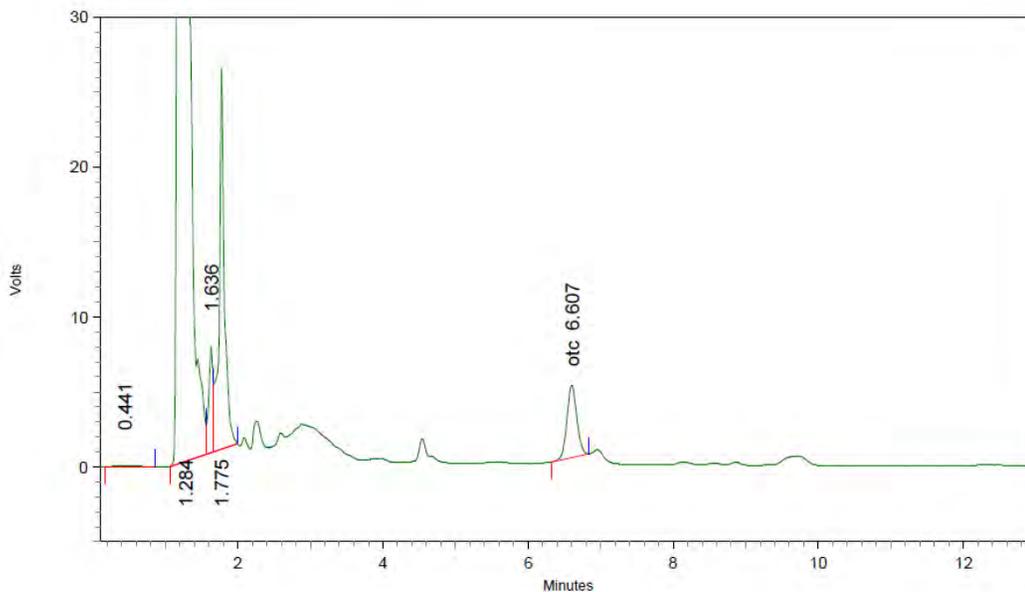


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.575	71677	10642.22



NA 21 OTC 20-Enero-2016

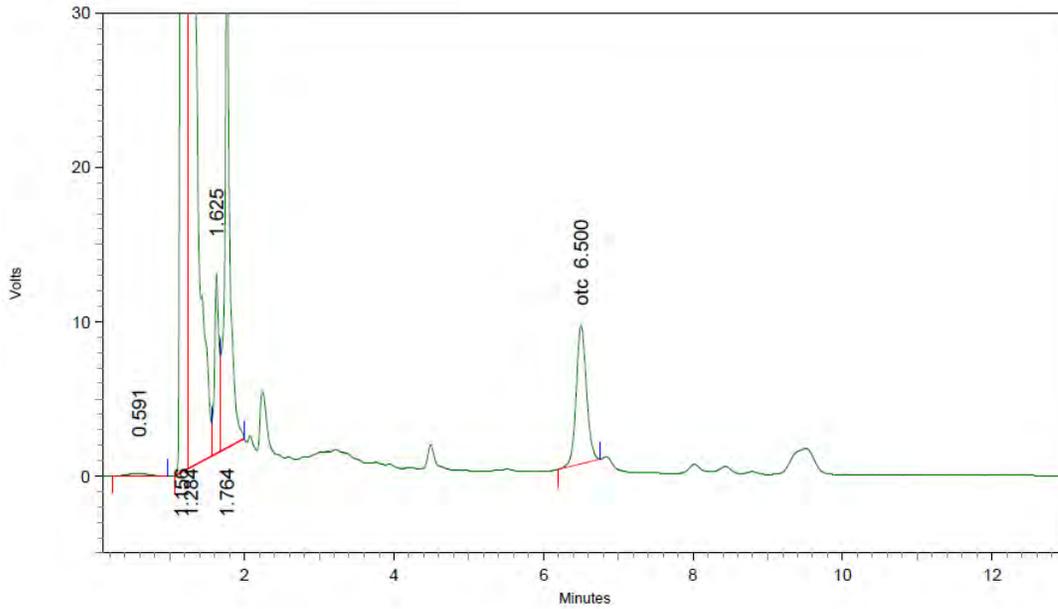


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.607	45564	10669.00



NA 22 OTC 20-Enero-2016

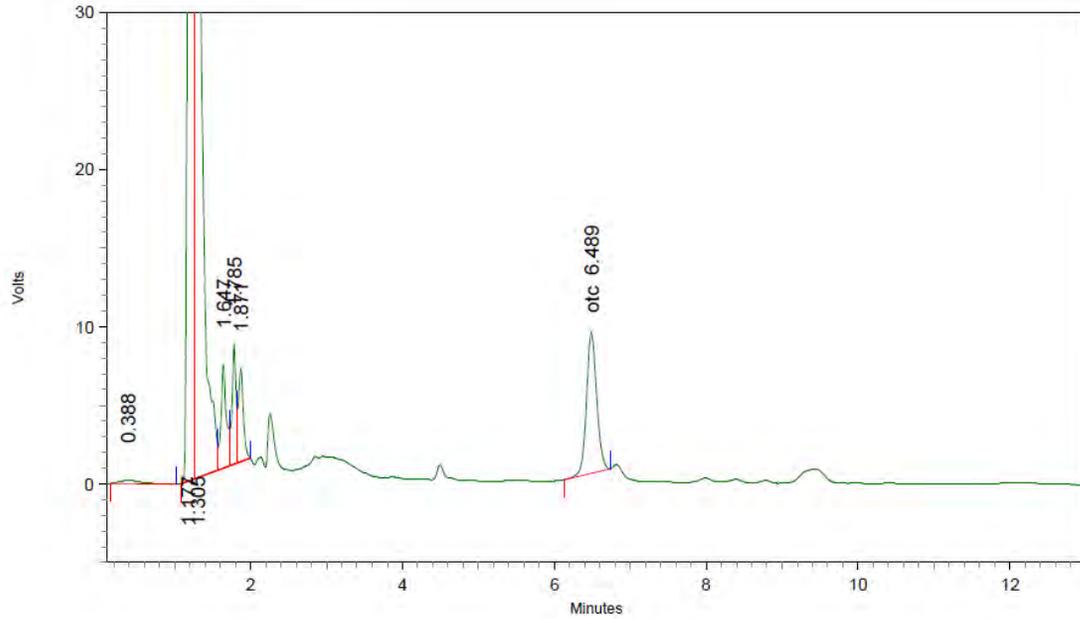


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.500	85373	10830.36



NA 23 OTC 20-Enero-2016

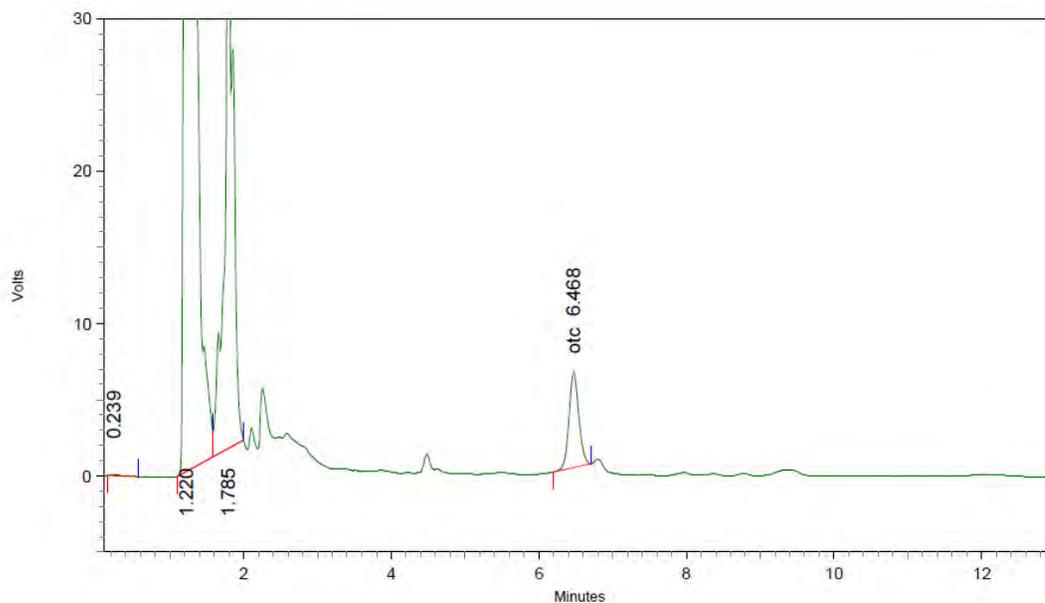


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.489	83447	10863.47



PA 19 OTC 20-Enero-2016

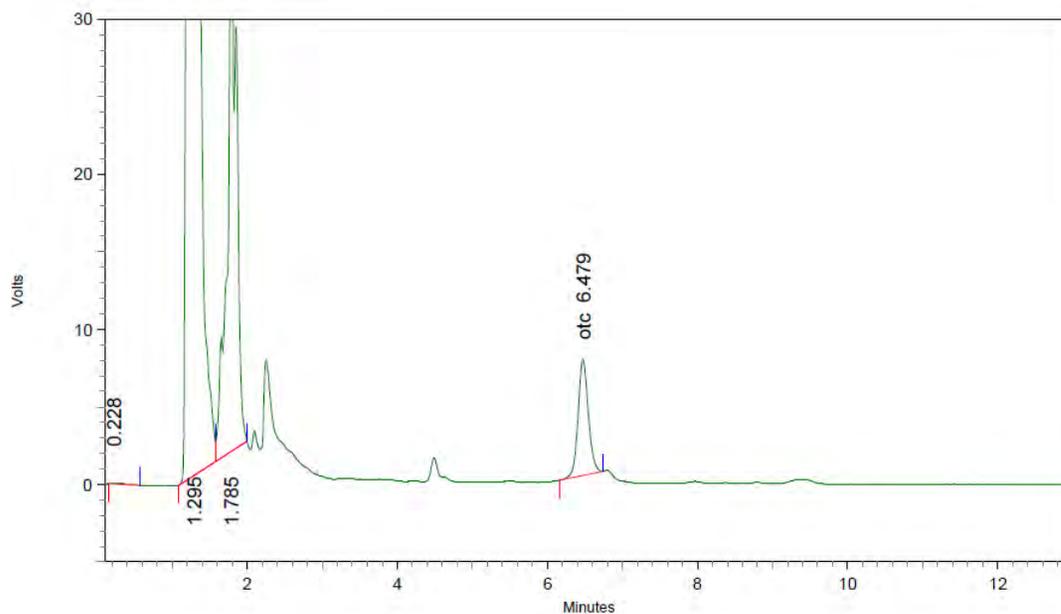


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.468	57642	11148.93



PA 20 OTC 20-Enero-2016

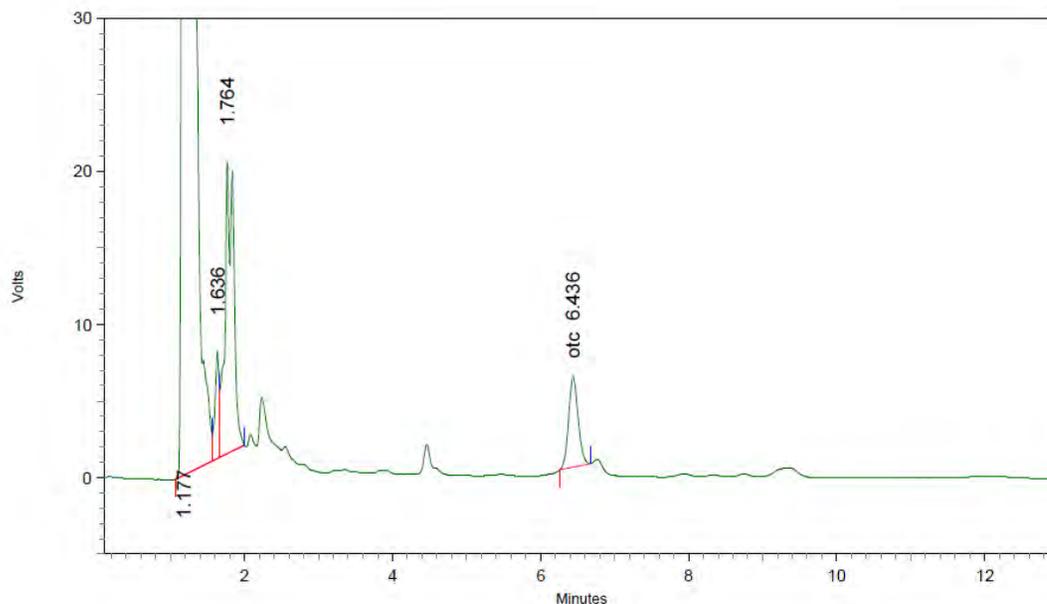


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.479	70980	10429.07



PA 21 OTC 20-Enero-2016

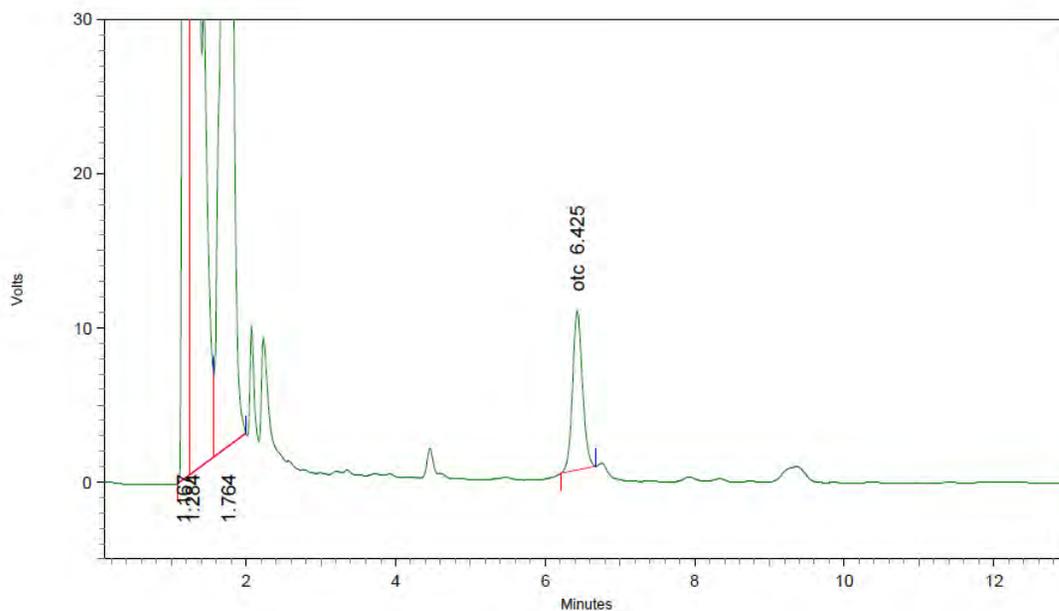


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.436	52393	11559.93



PA 22 OTC 20-Enero-2016

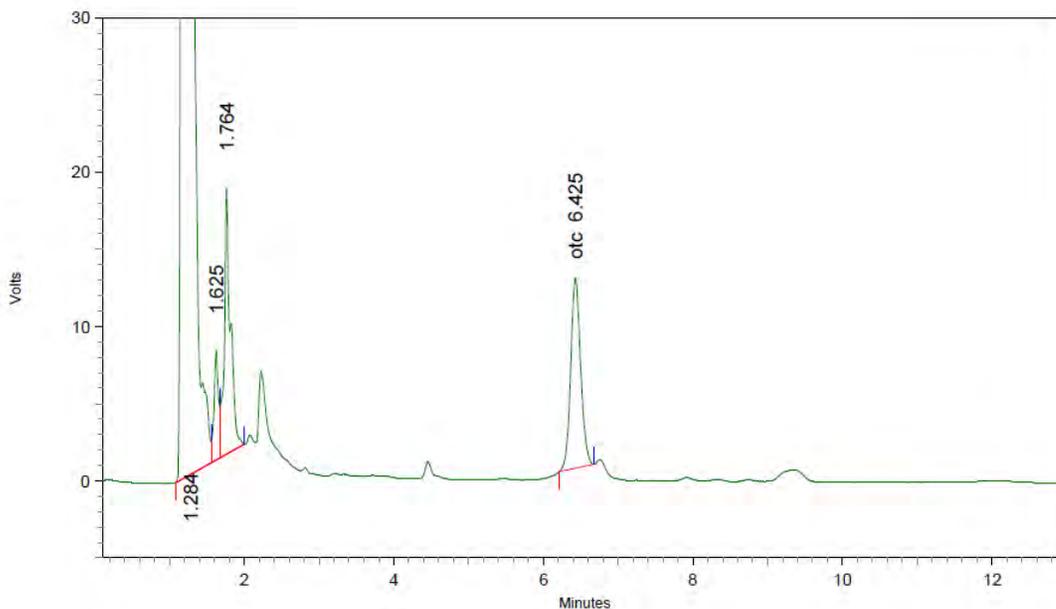


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.425	95404	11035.75



PA 23 OTC 20-Enero-2016

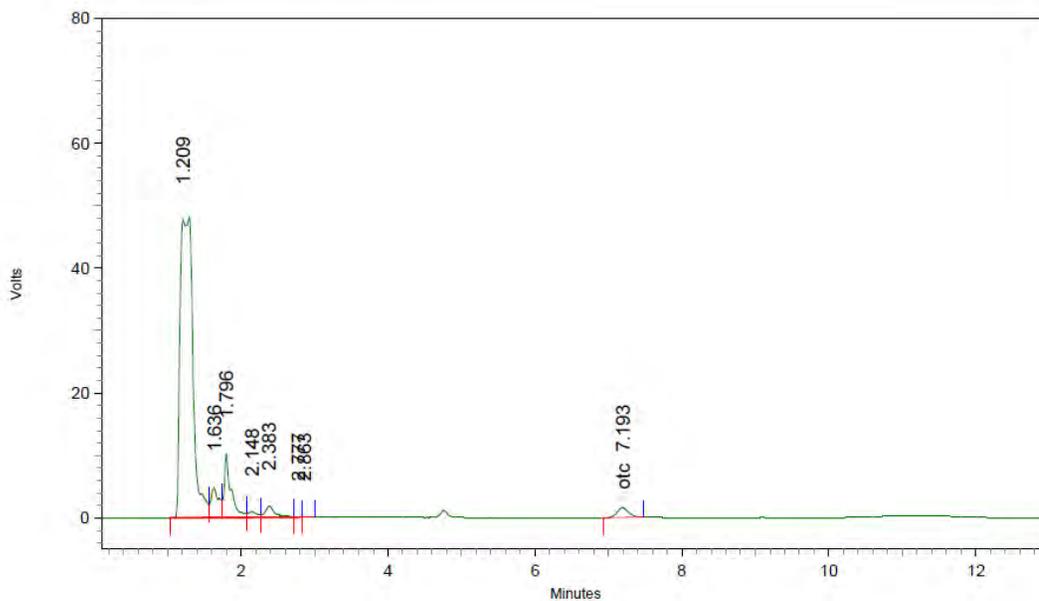


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.425	113991	10987.59



NB-19 OTC 16-Diciembre-2015

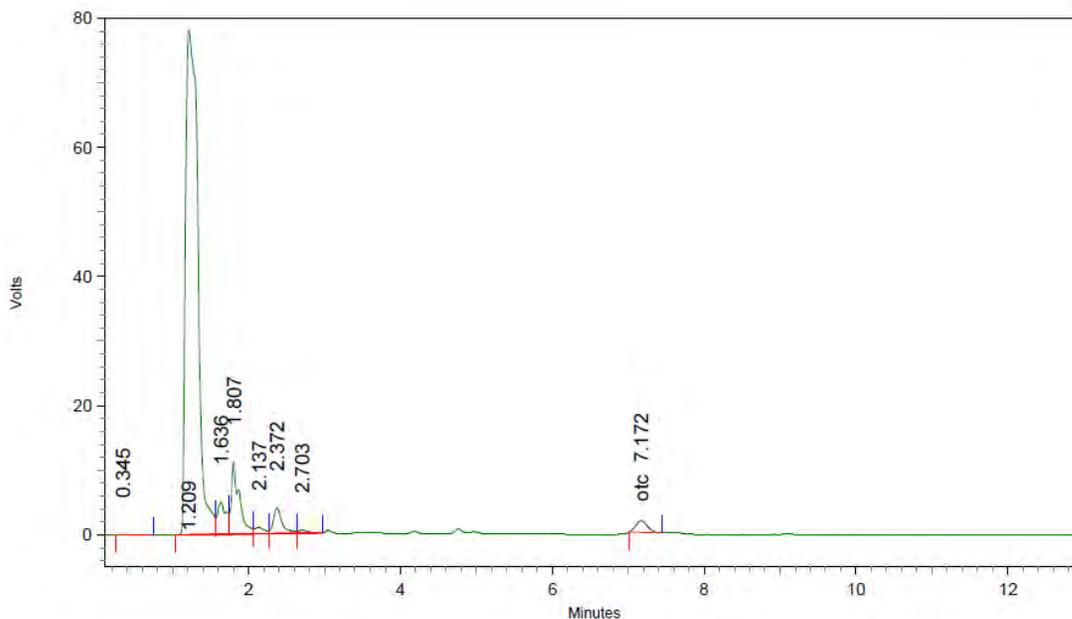


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.193	17055	9283.68



NB-20 OTC 16-Diciembre-2015

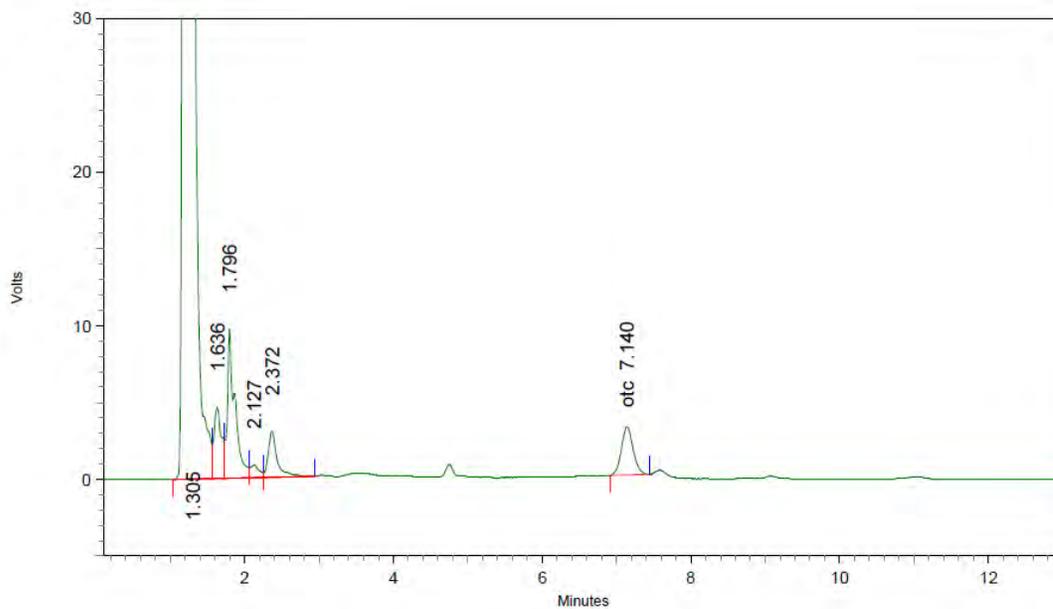


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.172	19259	9619.30



NB-21 OTC 16-Diciembre-2015

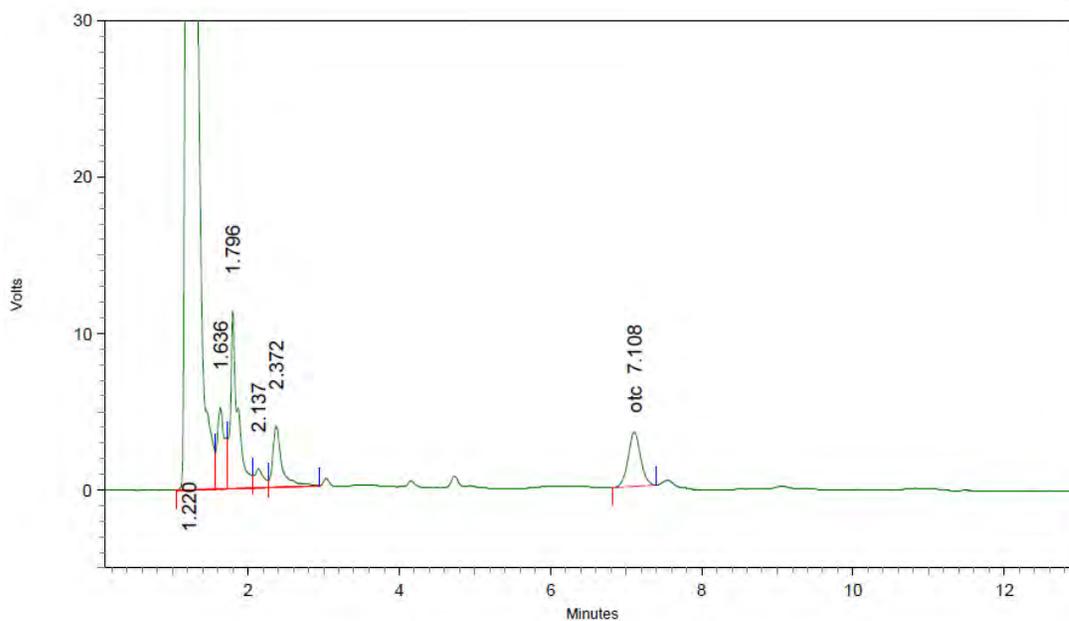


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.140	34307	9500.78



NB-22 OTC 16-Diciembre-2015

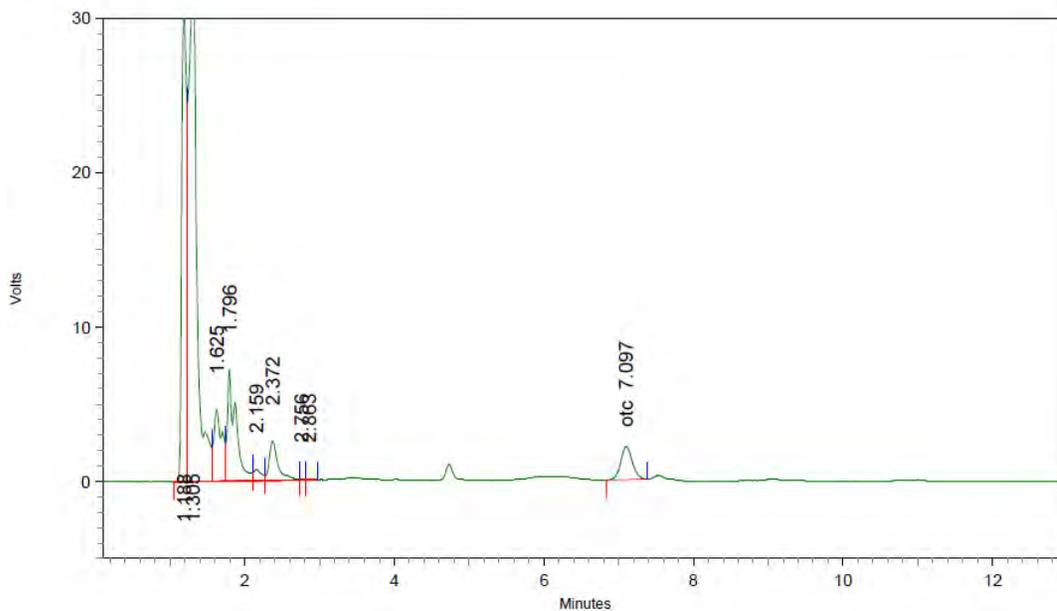


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.108	39587	8678.34



NB-23 OTC 16-Diciembre-2015

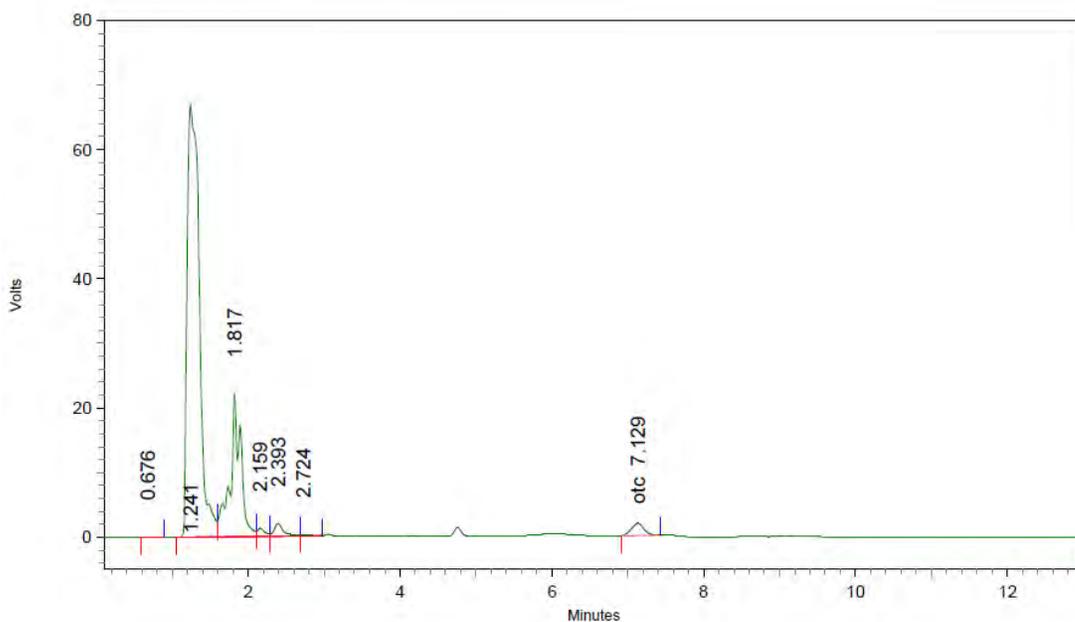


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.097	23193	9672.96



PB-19 OTC 16-Diciembre-2015

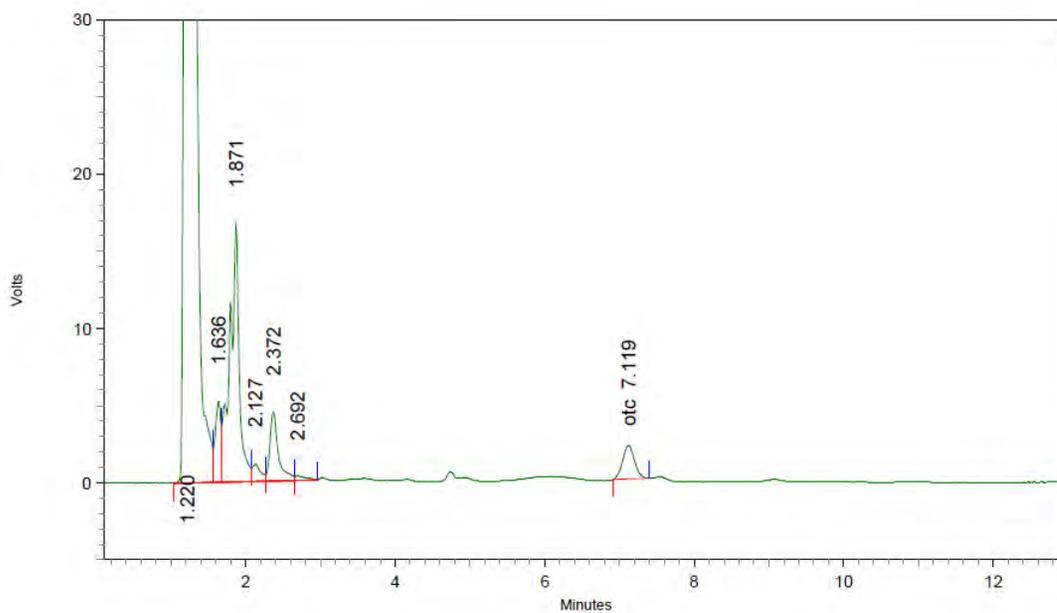


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.129	22153	8001.28



PB-20 OTC 16-Diciembre-2015

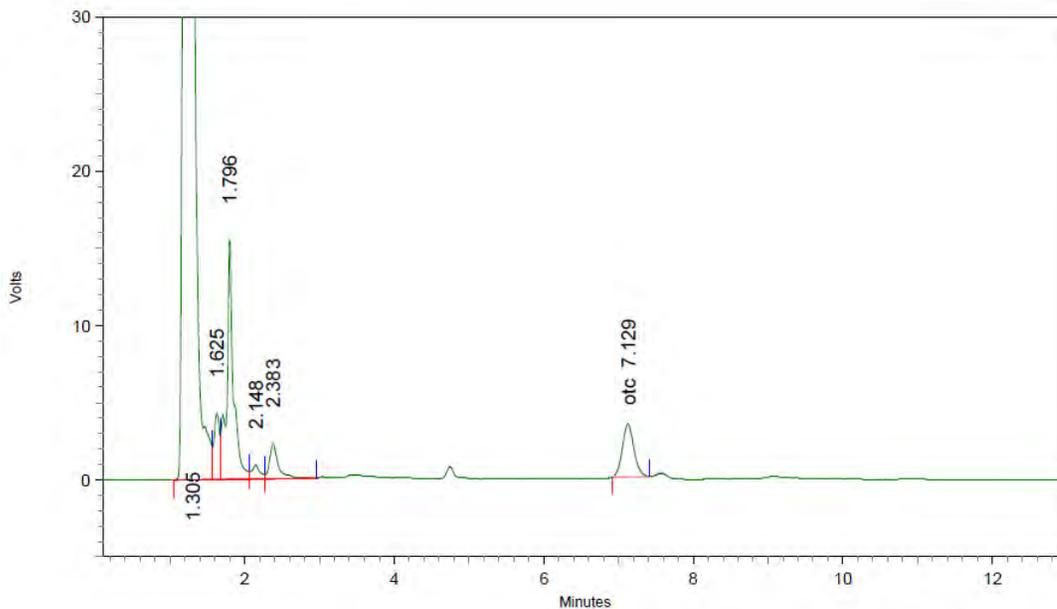


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.119	23921	9210.13



PB-21 OTC 16-Diciembre-2015

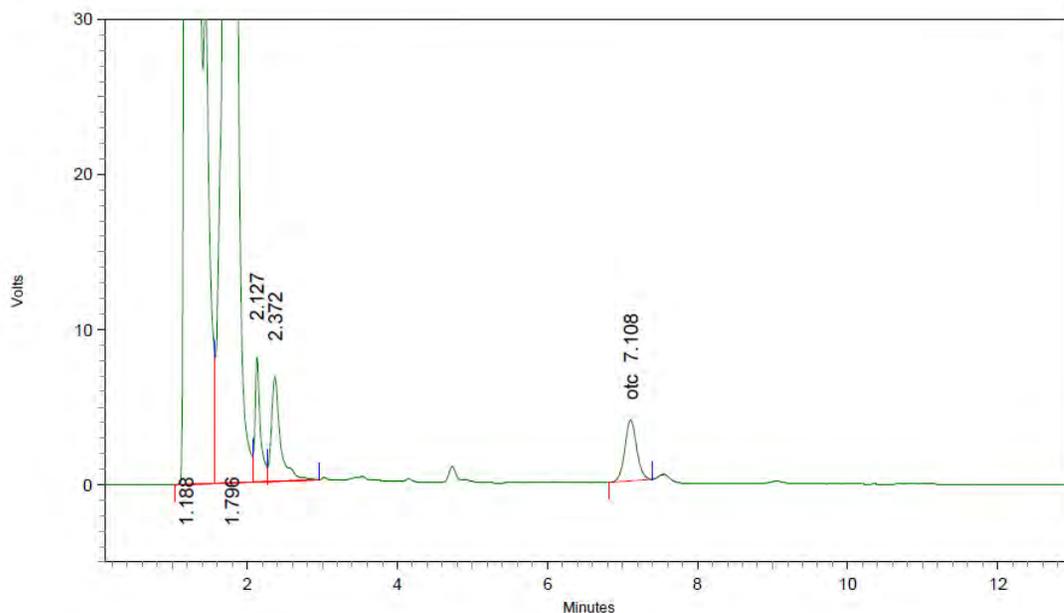


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.129	36817	9930.72



PB-22 OTC 16-Diciembre-2015

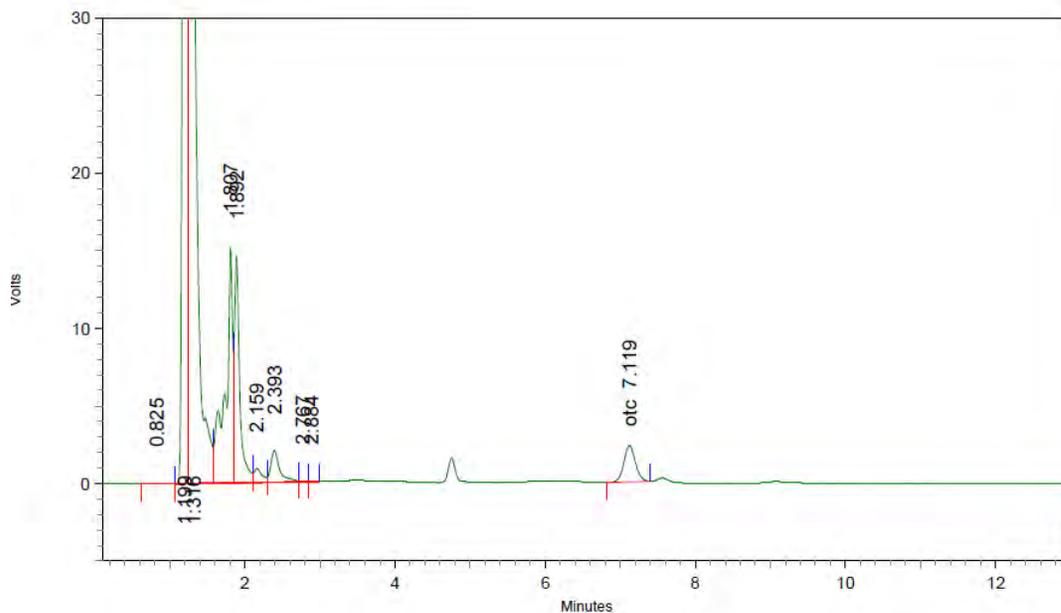


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.108	43031	9474.40



PB-23 OTC 16-Diciembre-2015

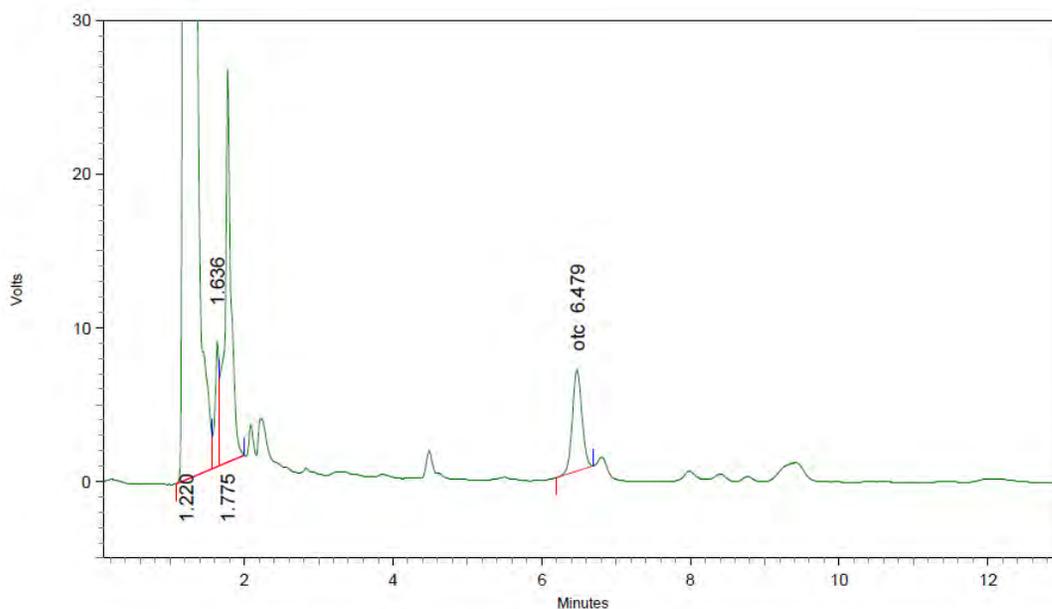


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.119	25102	9898.56



NC 19 OTC 20-Enero-2016

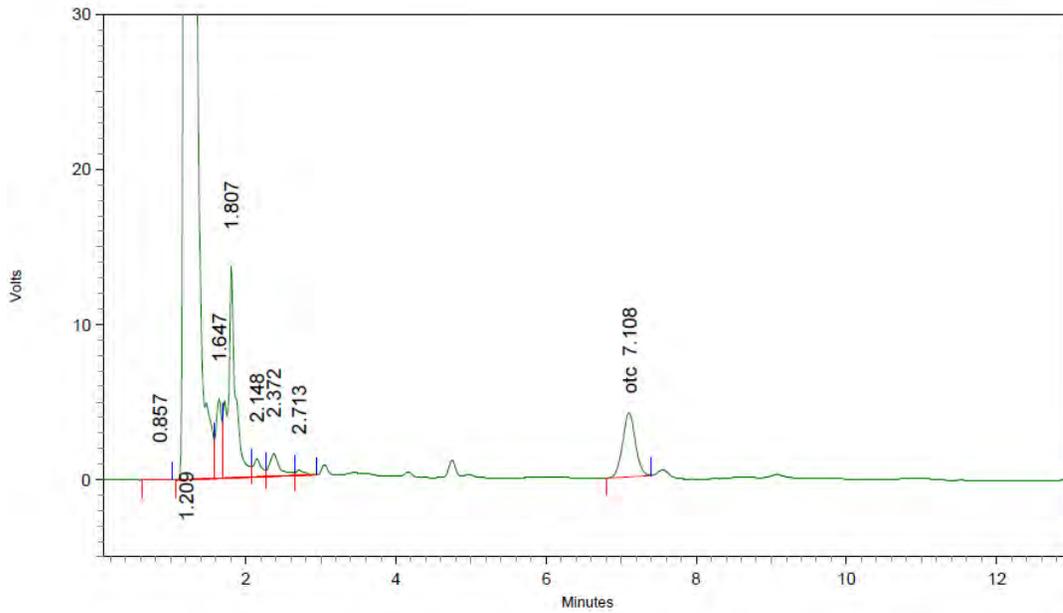


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.479	58891	11339.48



NC-20 OTC 16-Diciembre-2015

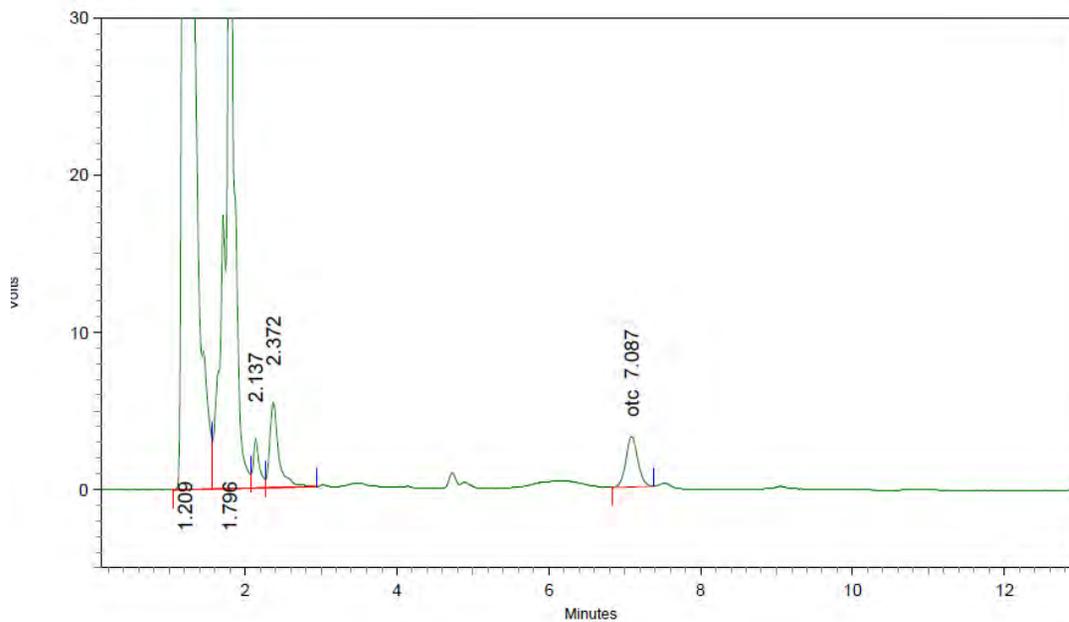


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.108	48764	7958.80



NC-21 OTC 16-Diciembre-2015

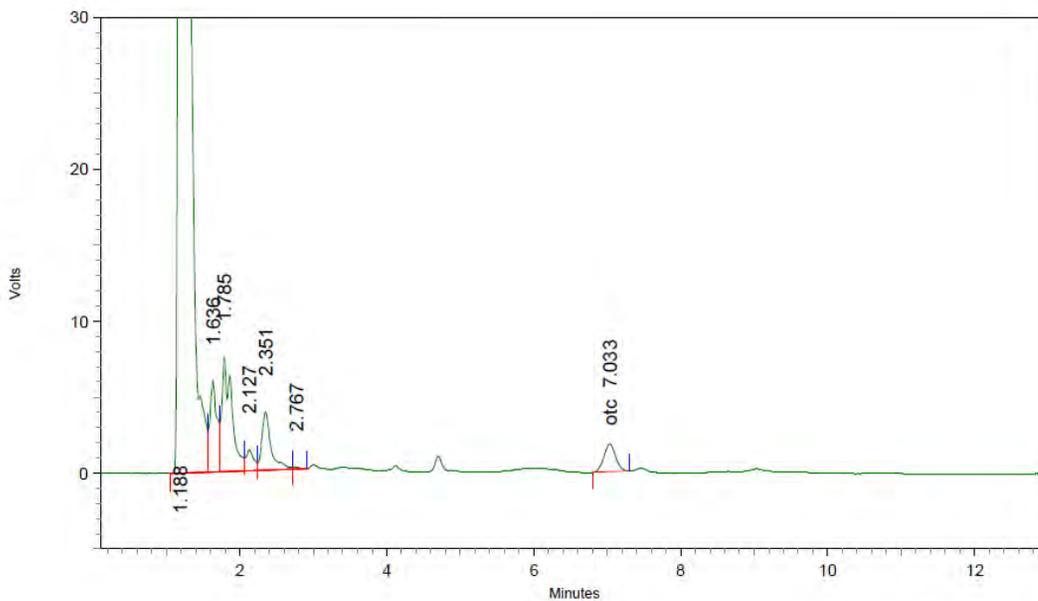


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.087	34956	9510.12



NC-22 OTC 16-Diciembre-2015

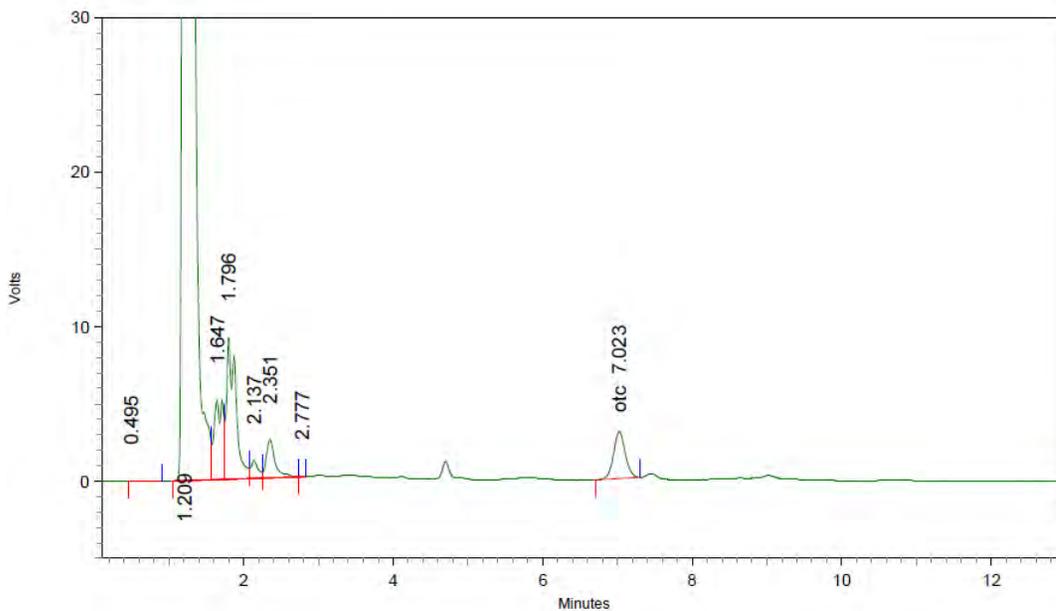


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.033	20058	8956.99



NC-23 OTC 16-Diciembre-2015

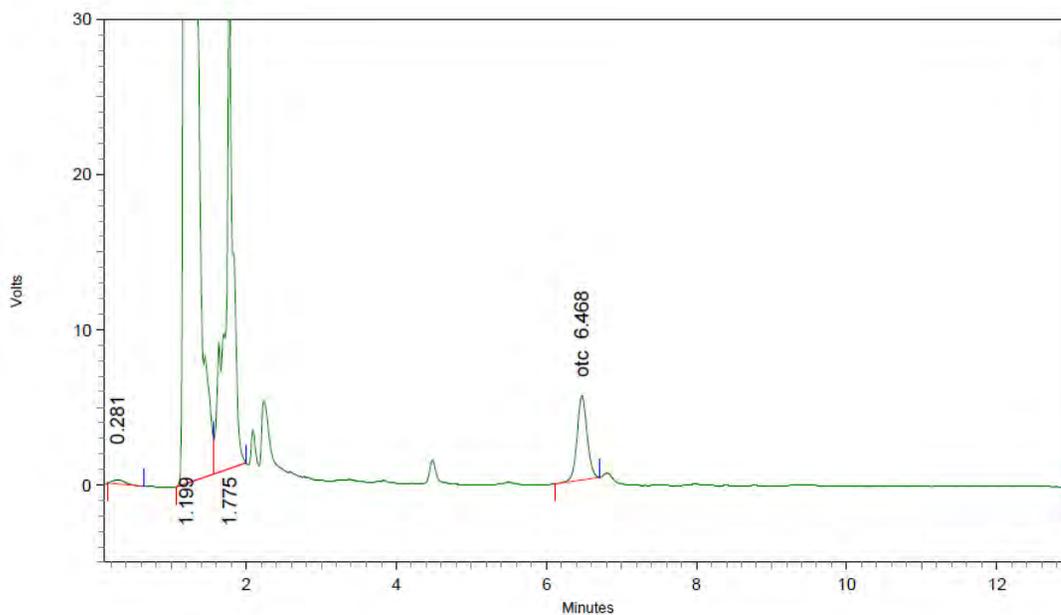


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.023	33166	9438.88



PC 17 OTC 20-Enero-2016

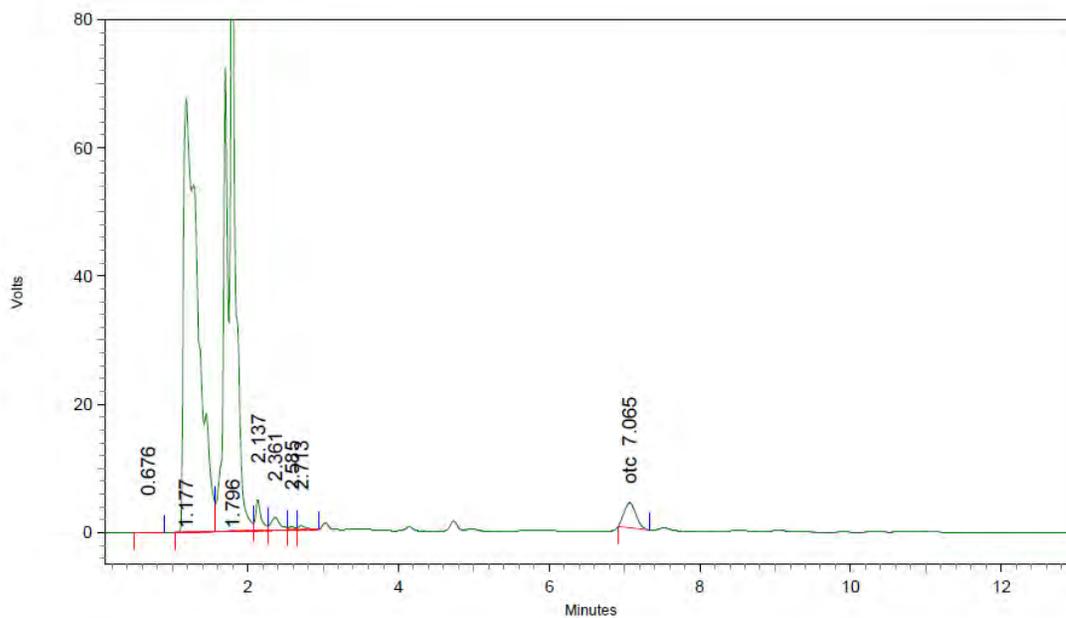


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.468	50115	10598.00



PC-20 OTC 16-Diciembre-2015

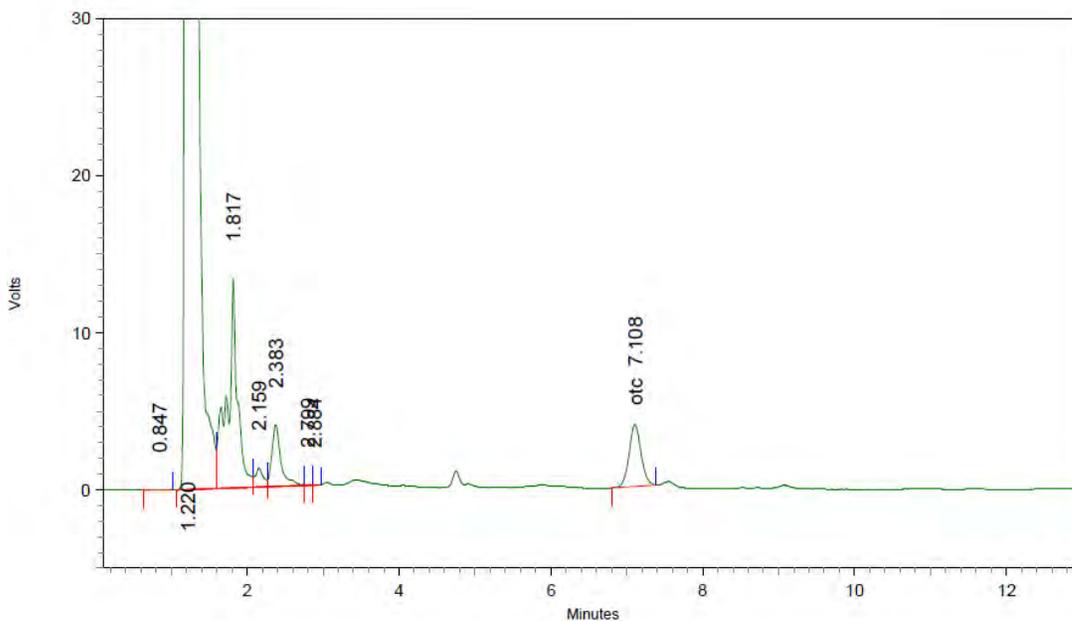


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.065	42223	8671.42



PC-21 OTC 16-Diciembre-2015

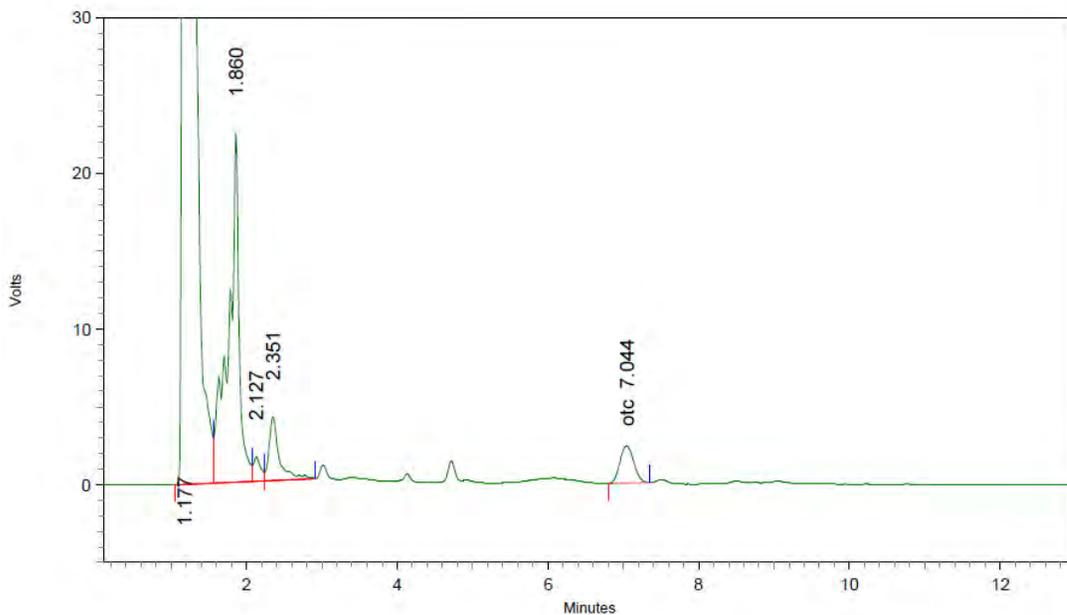


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.108	43480	9355.72



PC-22 OTC 16-Diciembre-2015

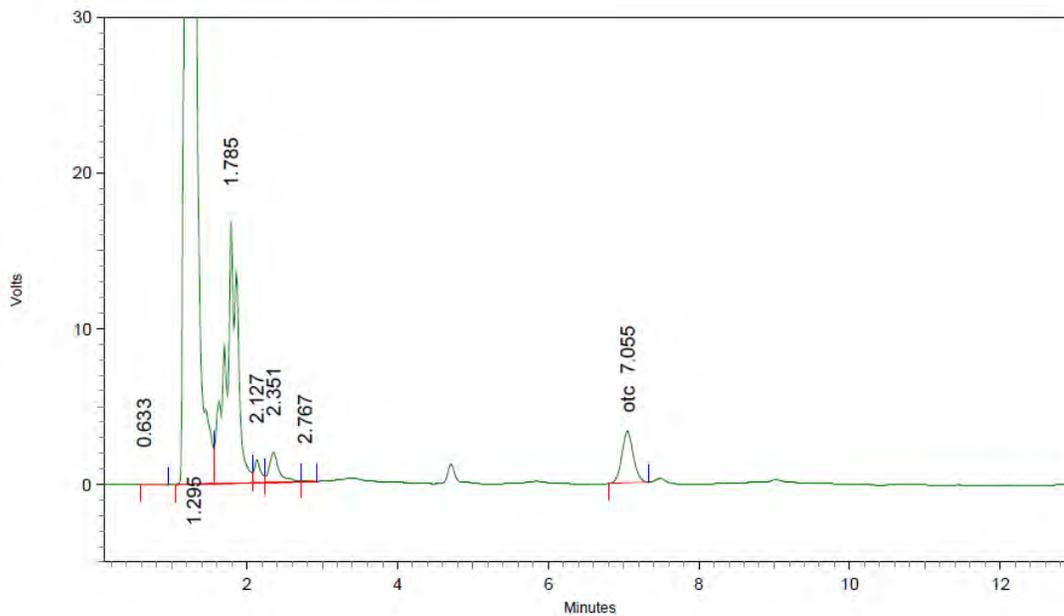


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.044	30262	6866.18



PC-23 OTC 16-Diciembre-2015



2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.055	34970	9981.44

A N E X O 8

Resultados y Cromatogramas de OTC en piel-músculo
para el cálculo de las curvas de depleción.



Anexo 8.1. Resultados de OTC en piel-músculo de Coho para el cálculo de la curva de depleci3n de Liguamicina en condiciones controladas.

Fecha análisis	Nº Mx	Días post-inyecci3n	área	Conc obtenida ng/g
30/11/2015	NA-14	33	221.007	1689,9
20/01/2016	NA15	33	84.987	657,1
20/01/2016	NA16	33	113.295	897,5
20/01/2016	NA17	33	85.742	674,6
20/01/2016	NA18	33	69.223	551,7
30/11/2015	NB-14	33	40.164	315,3
20/01/2016	NB15	33	136.792	1071,5
30/11/2015	NB-16	33	69.247	524,9
30/11/2015	NB-17	33	64.929	497,6
30/11/2015	NB-18	33	56.515	450,9
10/12/2015	NC-14	33	29.813	238,1
10/12/2015	NC-15	33	53.109	410,5
20/01/2016	NC16	33	42.011	319,3
20/01/2016	NC17	33	83.367	657,2
10/12/2015	NC-18	33	40.726	321,6
20/01/2016	NA19	40	64.294	513,3
20/01/2016	NA20	40	71.677	547,5
20/01/2016	NA21	40	45.564	365,2
20/01/2016	NA22	40	85.373	673,0
20/01/2016	NA23	40	83.447	661,7
20/01/2016	NB19	40	31.342	244,5
20/01/2016	NB20	40	45.696	357,0
16/12/2015	NB-21	40	34.307	262,8
16/12/2015	NB-22	40	39.587	312,6
20/01/2016	NB23	40	41.082	326,4
20/01/2016	NC19	40	58.891	441,0
16/12/2015	NC-20	40	48.764	382,6
16/12/2015	NC-21	40	34.956	273,0



20/01/2016	NC22	40	35.490	273,5
16/12/2015	NC-23	40	33.166	248,7
22/12/2015	NA-24	47	68.705	534,9
22/12/2015	NA-25	47	45.954	368,3
22/12/2015	NA-26	47	44.140	346,8
22/12/2015	NA-27	47	27.259	217,0
22/12/2015	NA-28	47	101.968	774,0
22/12/2015	NB-24	47	36.139	276,9
22/12/2015	NB-25	47	27.727	219,9
22/12/2015	NB-26	47	64.630	502,0
22/12/2015	NB-27	47	34.529	268,6
22/12/2015	NB-28	47	26.659	209,7
30/12/2015	NC-24	47	15.876	119,2
30/12/2015	NC-25	47	28.415	216,0
30/12/2015	NC-26	47	31.110	247,5
30/12/2015	NC-27	47	22.360	172,4
30/12/2015	NC-28	47	28.620	228,4
30/12/2015	NA-29	54	12.358	92,7
30/12/2015	NA-30	54	11.108	86,1
30/12/2015	NA-31	54	7.588	56,1
30/12/2015	NA-32	54	8.500	64,0
30/12/2015	NA-33	54	27.011	203,6
30/12/2015	NB-29	54	6.735	51,7
30/12/2015	NB-30	54	7.468	56,5
30/12/2015	NB-31	54	14.363	112,0
30/12/2015	NB-32	54	13.828	108,8
30/12/2015	NB-33	54	32.936	252,2
30/12/2015	NC-29	54	14.215	110,0
30/12/2015	NC-30	54	22.822	176,7
30/12/2015	NC-31	54	26.618	206,5
30/12/2015	NC-32	54	30.804	245,6
30/12/2015	NC-33	54	26.304	199,4
11/01/2016	NA34	59	10.644	82,9
11/01/2016	NA35	59	22.652	176,7



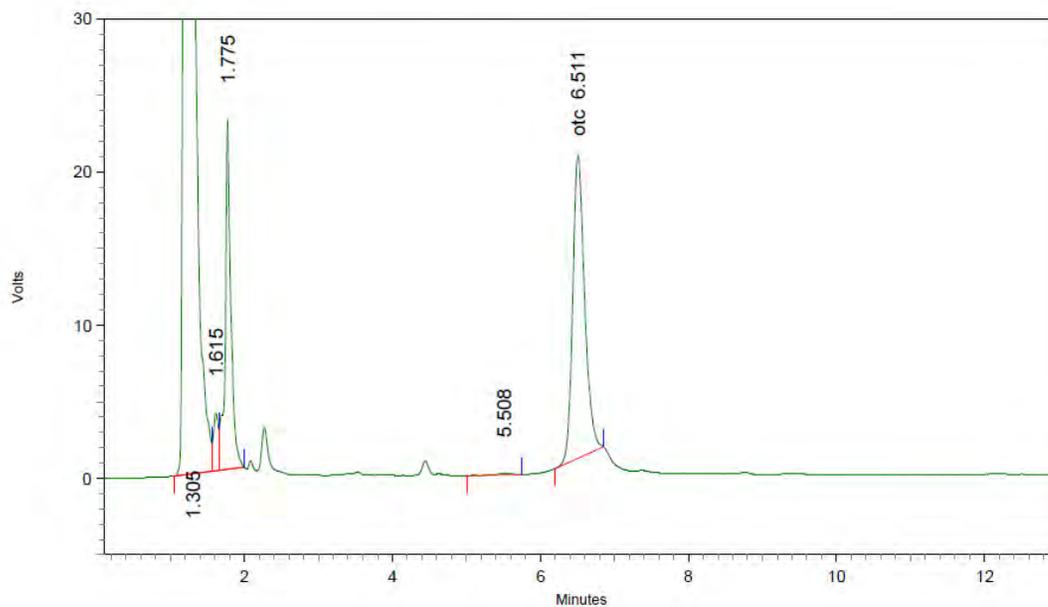
11/01/2016	NA36	59	21.961	172,6
11/01/2016	NA37	59	20.781	158,5
11/01/2016	NA38	59	32.422	251,1
18/01/2016	B-34	59	9.215	71,5
18/01/2016	B-35	59	18.289	141,9
18/01/2016	B-36	59	7.002	50,7
18/01/2016	B-37	59	25.557	200,9
18/01/2016	B-38	59	36.601	290,0
18/01/2016	C-34	59	13.293	103,9
18/01/2016	C-35	59	10.852	81,1
18/01/2016	C-36	59	19.508	153,4
18/01/2016	C-38	59	7.721	58,9
11/01/2016	NA39	59	10.158	75,2
11/01/2016	NA40	74	7.833	57,5
11/01/2016	NA41	74	9.271	71,8
11/01/2016	NA42	74	13.846	104,0
11/01/2016	NA43	74	10.270	78,9
11/01/2016	NB39	74	5.041	35,9
11/01/2016	NB40	74	4.851	36,1
11/01/2016	NB41	74	11.822	90,7
11/01/2016	NB42	74	9.630	73,6
11/01/2016	NB43	74	5.032	38,1
11/01/2016	NC39	74	10.313	80,0
11/01/2016	NC40	74	6.327	46,6
11/01/2016	NC41	74	10.178	75,1
11/01/2016	NC42	74	7.365	56,4
11/01/2016	NC43	74	5.741	42,8





Anexo 8.2. Cromatogramas de curva de depleci3n liq coho, condiciones controladas

NA-14 OTC 30-Noviembre-2015

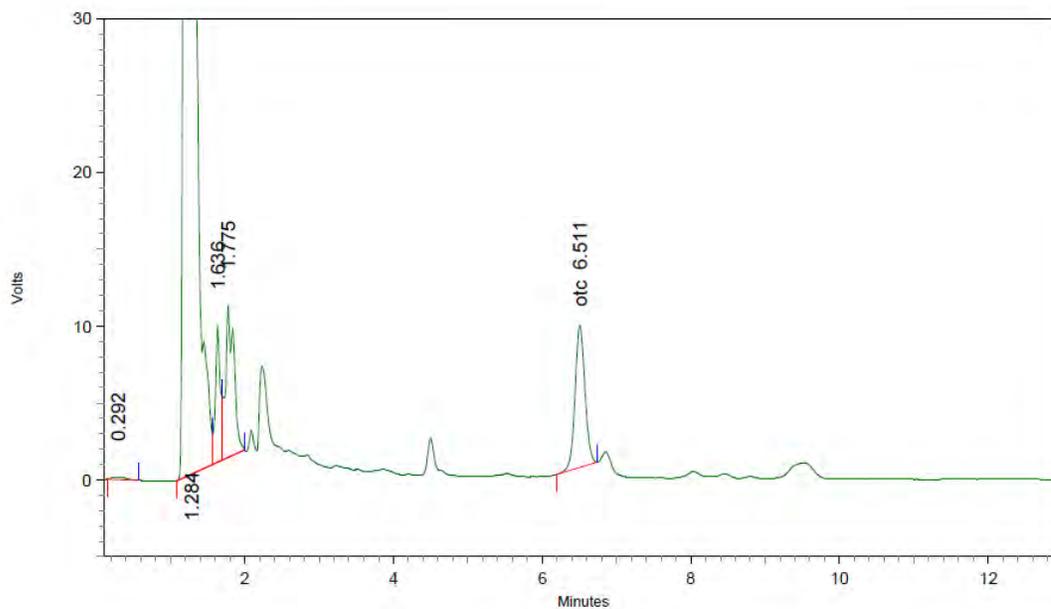


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.511	221007	8000.71



NA 15 OTC 20-Enero-2016

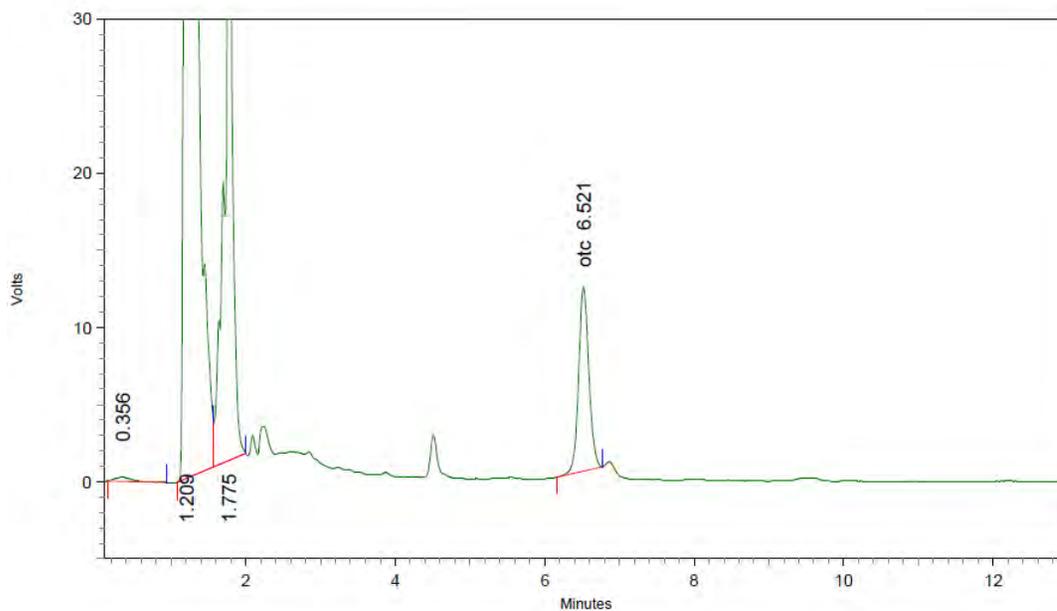


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.511	84987	10939.98



NA 16 OTC 20-Enero-2016

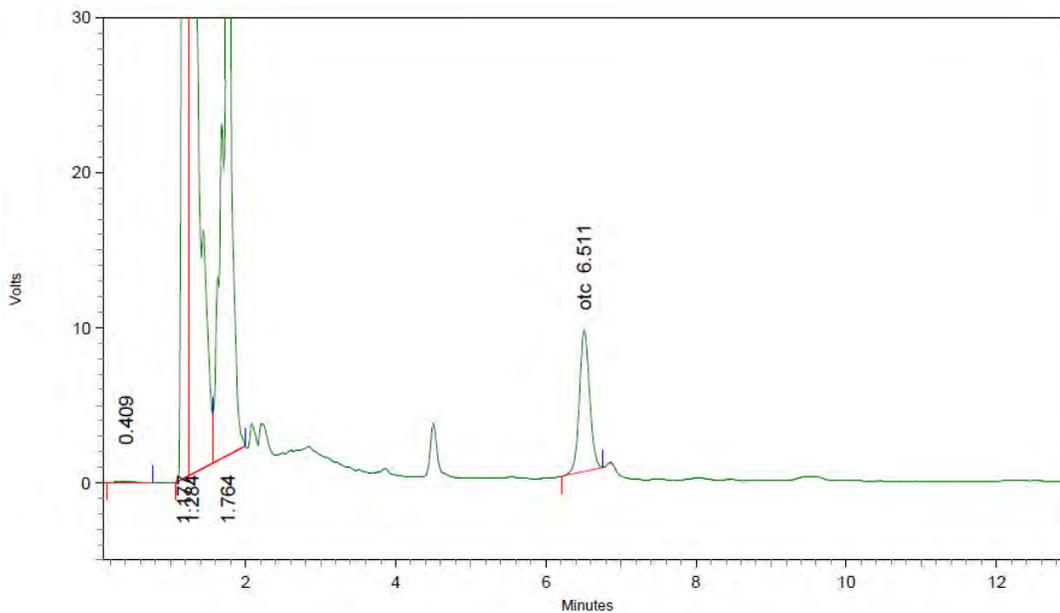


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.521	113295	10660.06



NA 17 OTC 20-Enero-2016

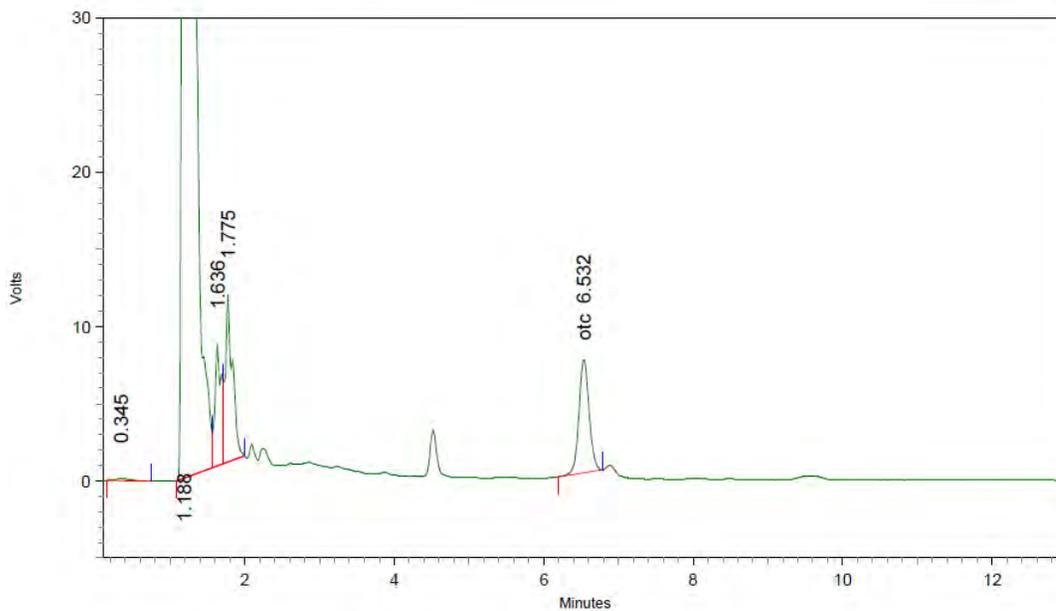


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.511	85742	10898.39



NA 18 OTC 20-Enero-2016

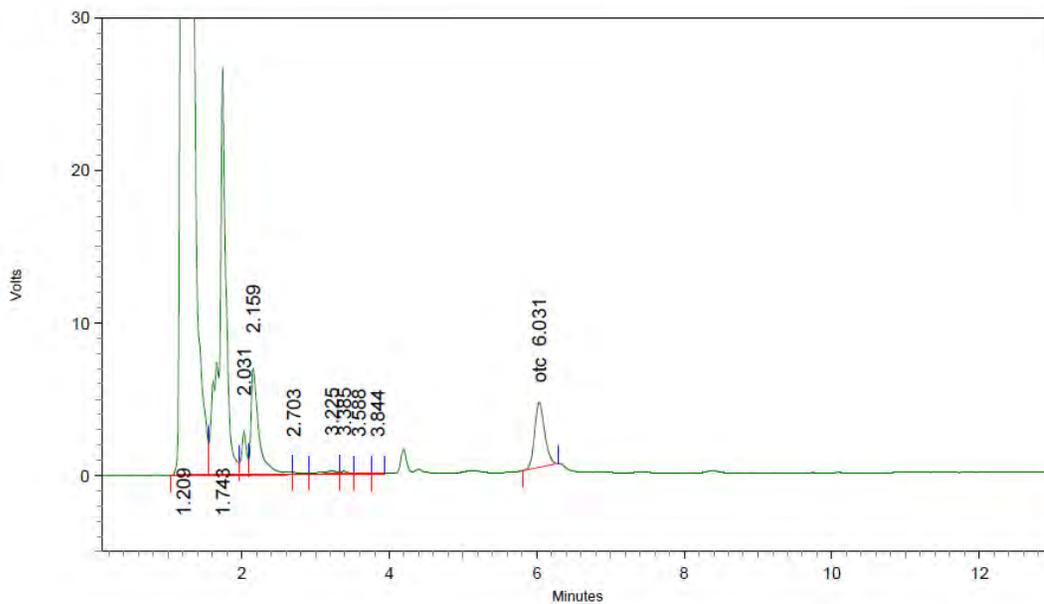


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.532	69223	10572.94



NB-14 OTC 30-Noviembre-2015

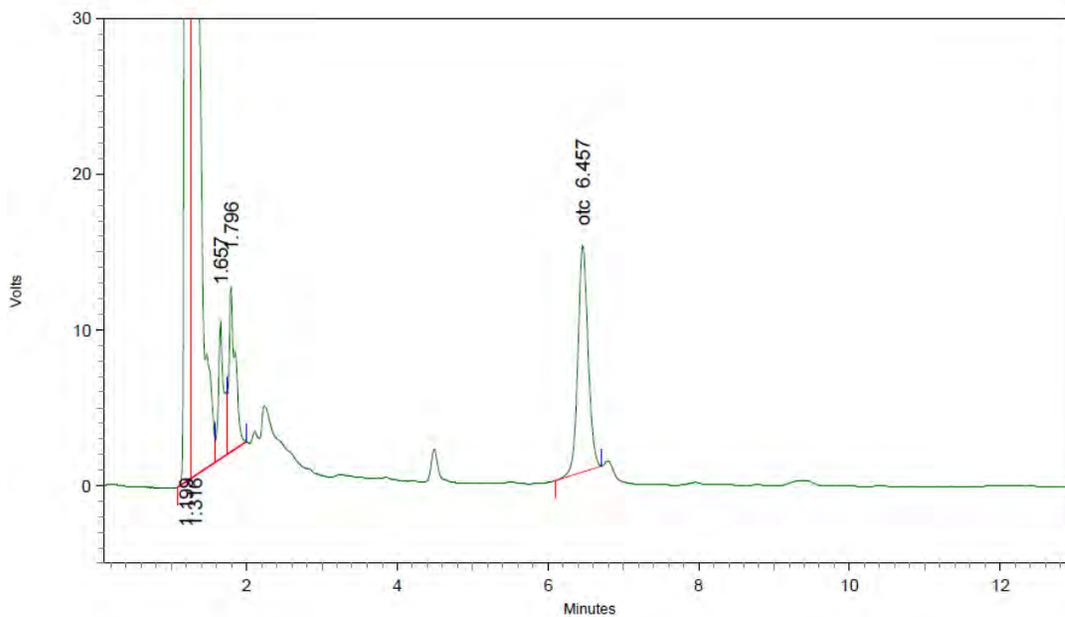


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.031	40164	9065.36



NB 15 OTC 20-Enero-2016

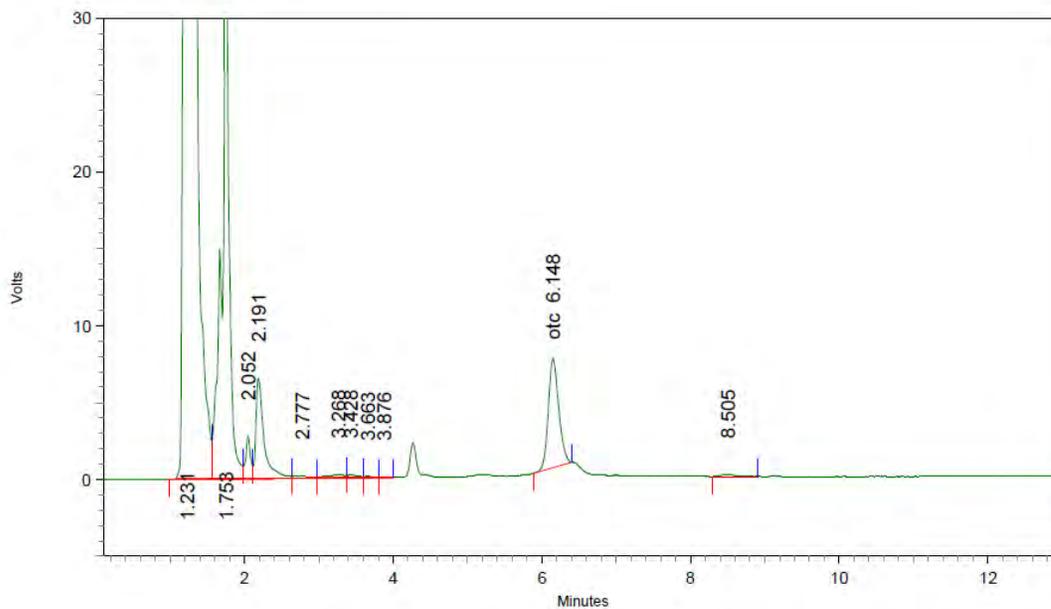


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.457	136792	10991.21



NB-16 OTC 30-Noviembre-2015

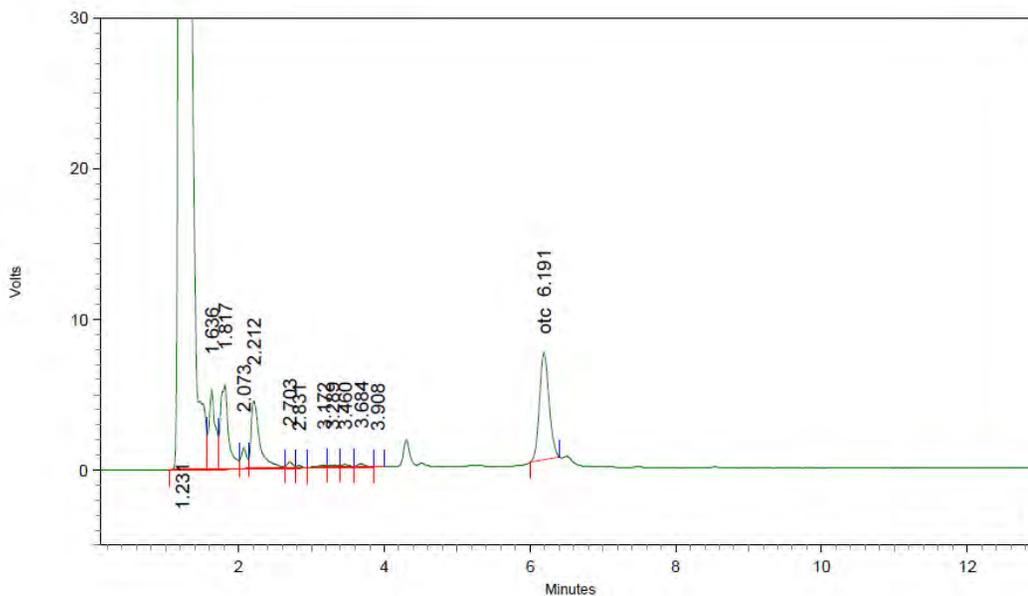


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.148	69247	8948.62



NB-17 OTC 30-Noviembre-2015

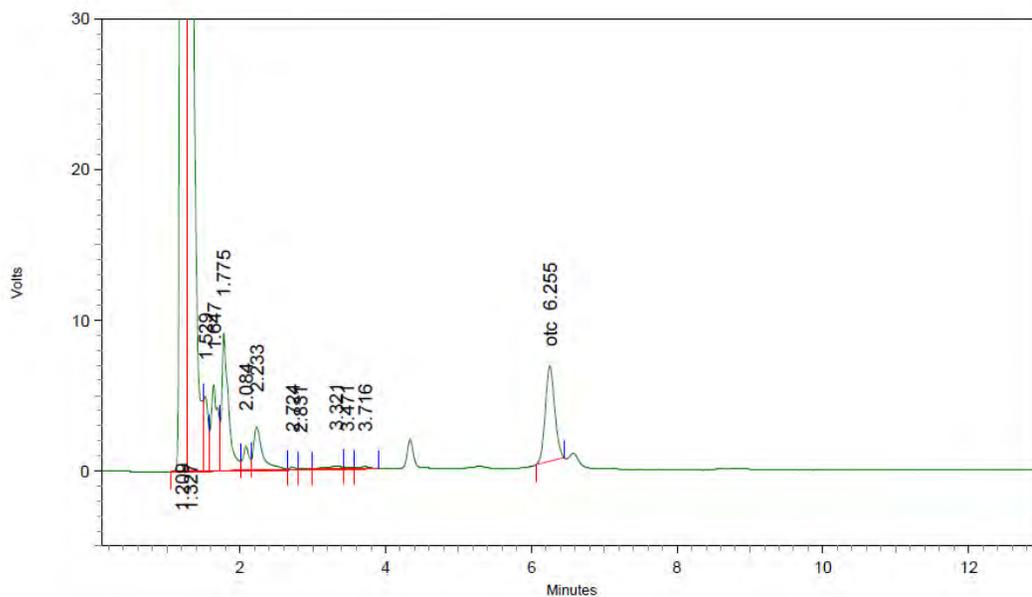


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.191	64929	10043.23



NB-18 OTC 30-Noviembre-2015

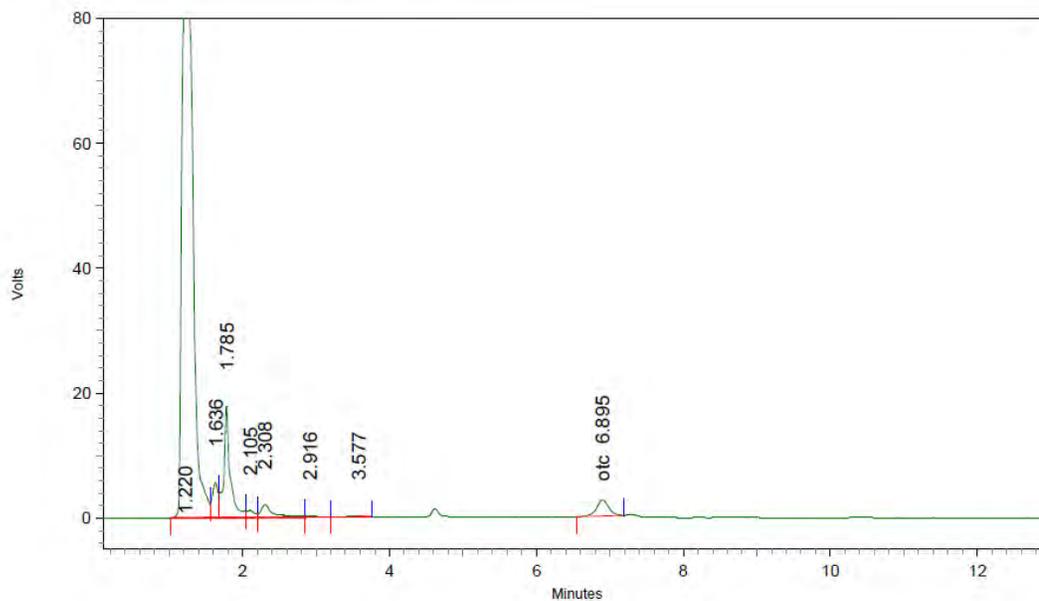


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.255	56515	10471.08



NC-14 OTC 10-Diciembre-2015

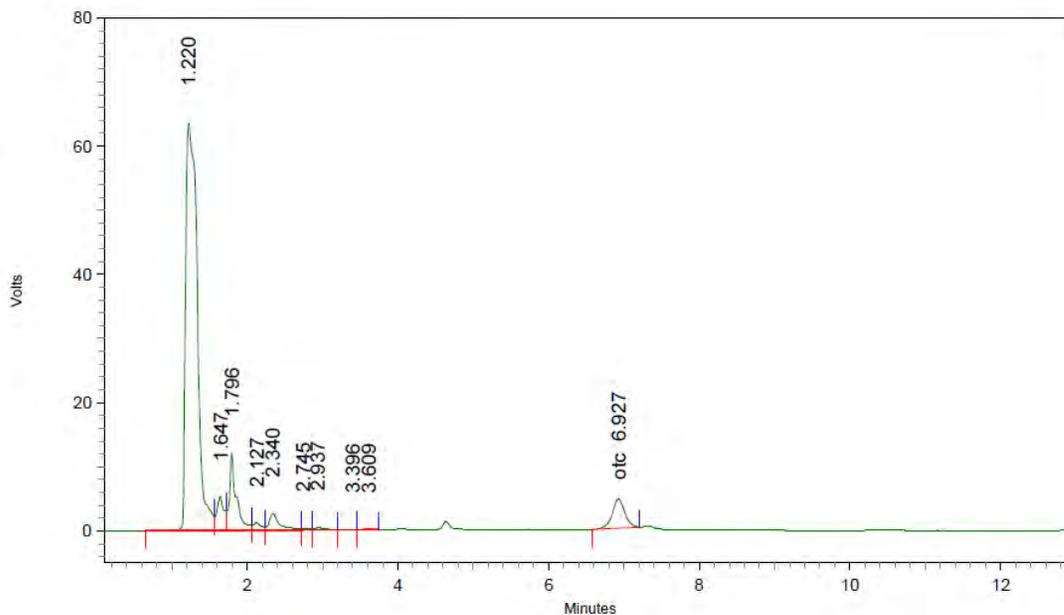


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.895	29813	8607.43



NC-15 OTC 10-Diciembre-2015

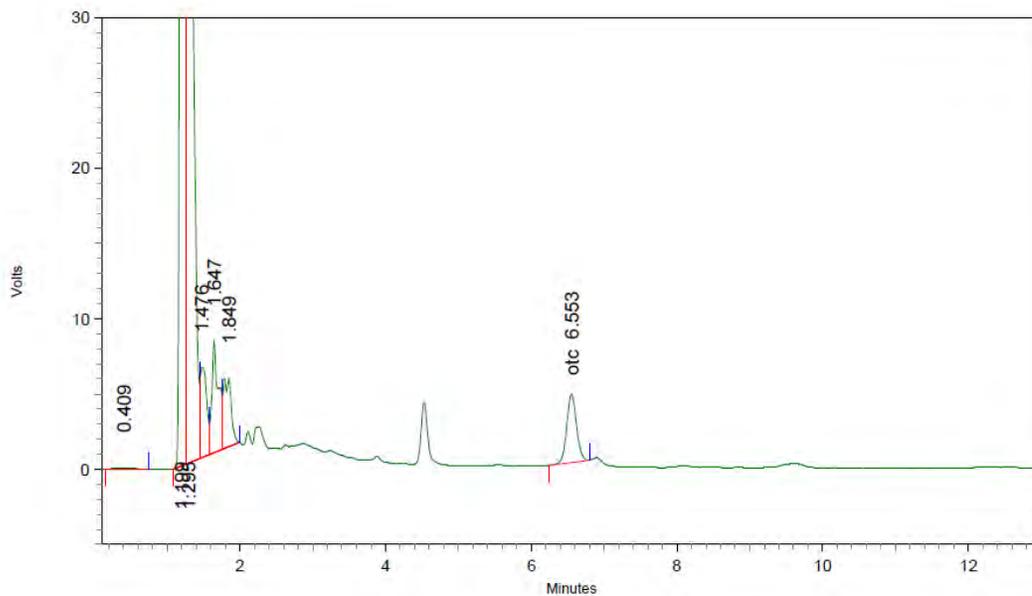


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.927	53109	8492.99



NC 16 OTC 20-Enero-2016

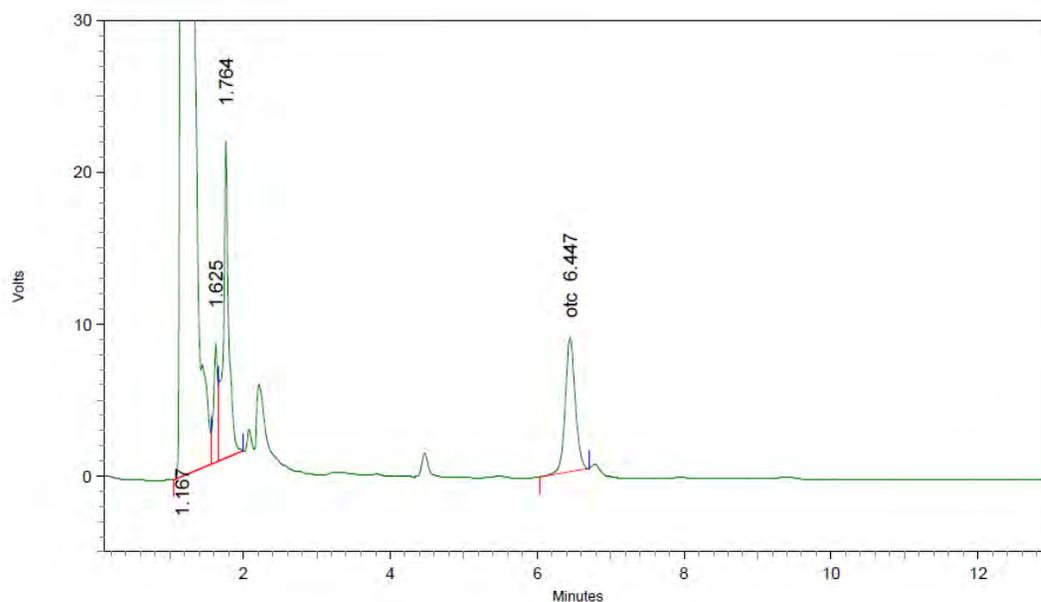


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.553	42011	11174.91



NC 17 OTC 20-Enero-2016

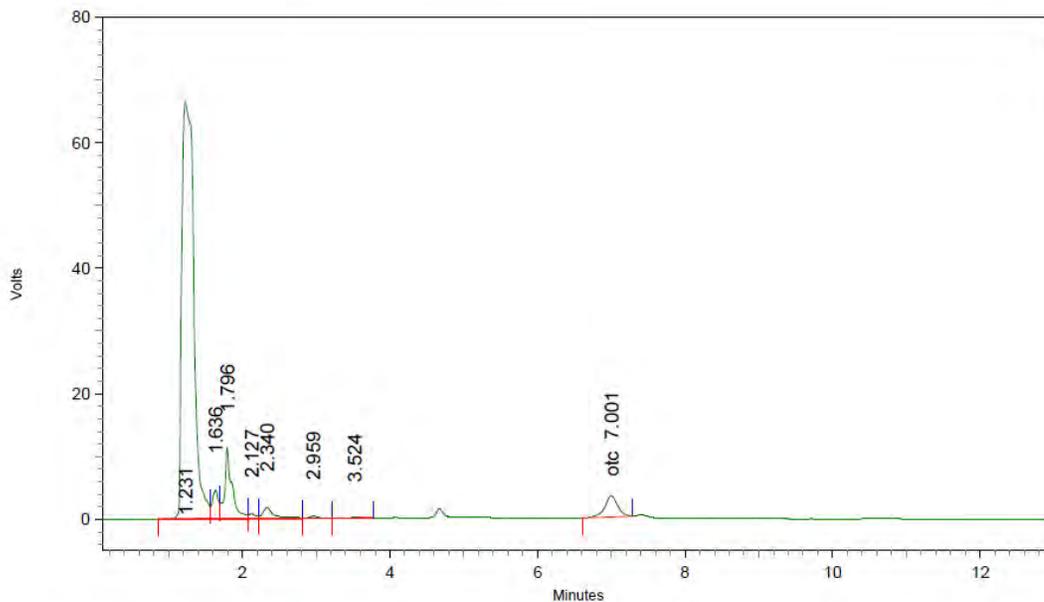


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.447	83367	10756.52



NC-18 OTC 10-Diciembre-2015

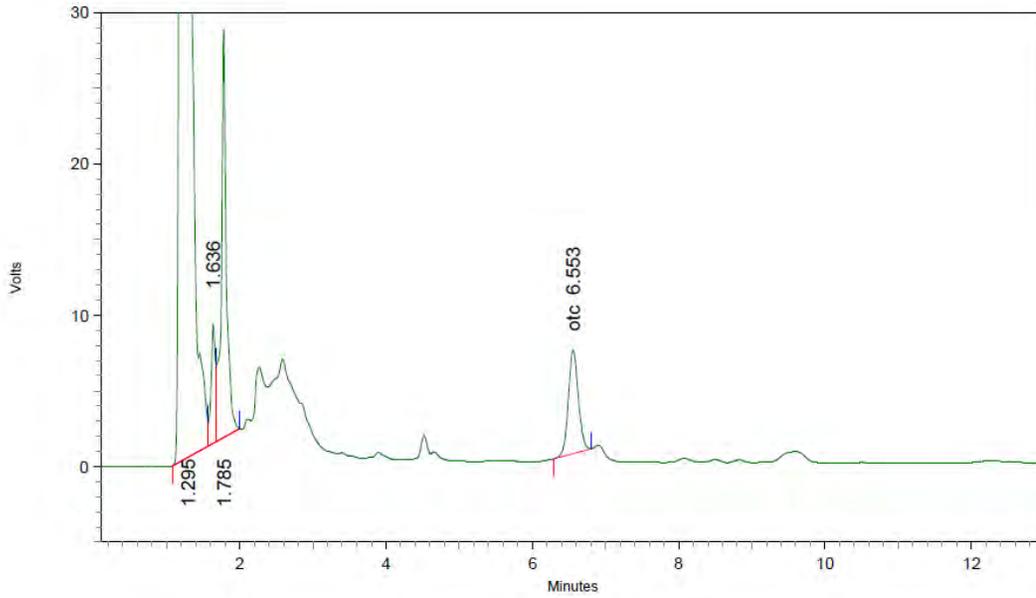


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.001	40726	8204.99



NA 19 OTC 20-Enero-2016

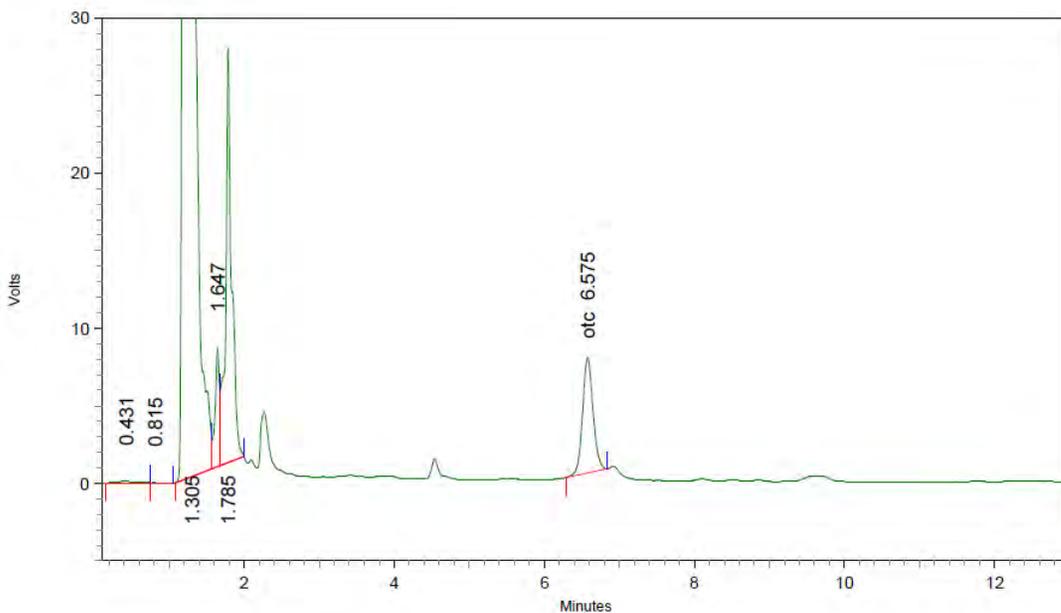


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.553	64294	10515.07



NA 20 OTC 20-Enero-2016

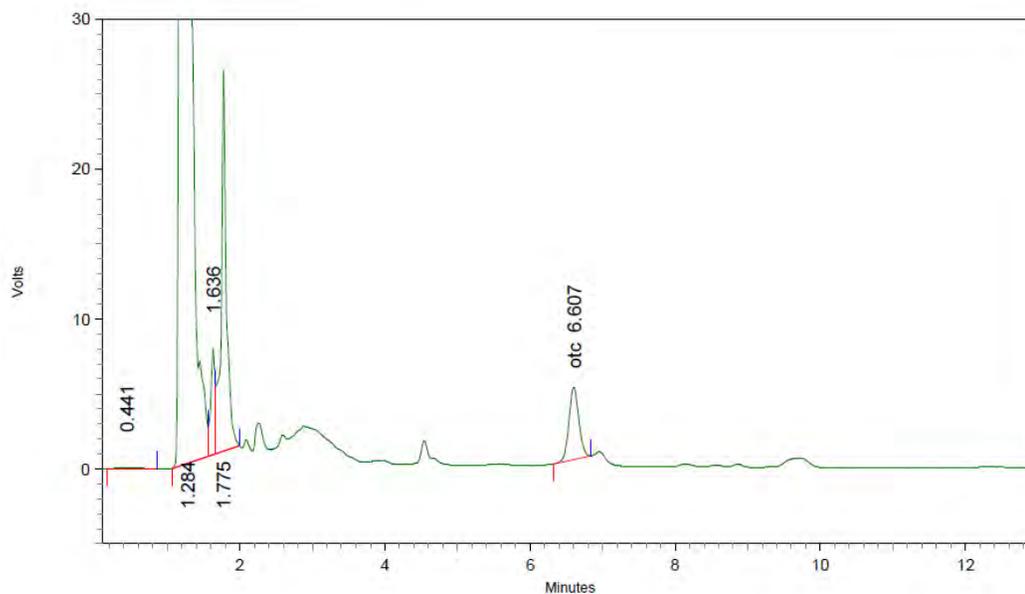


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.575	71677	10642.22



NA 21 OTC 20-Enero-2016

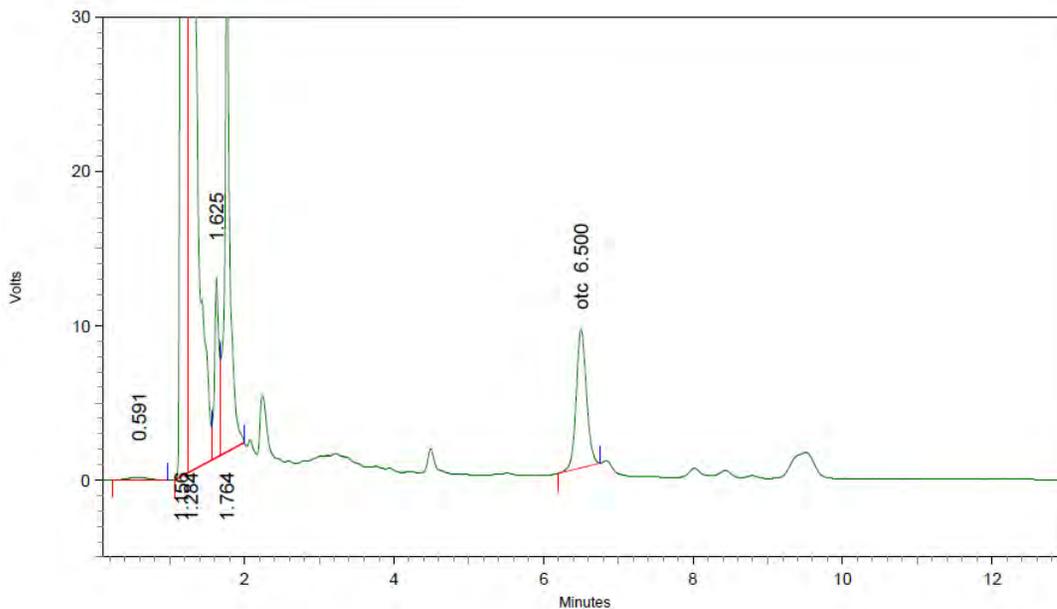


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.607	45564	10669.00



NA 22 OTC 20-Enero-2016

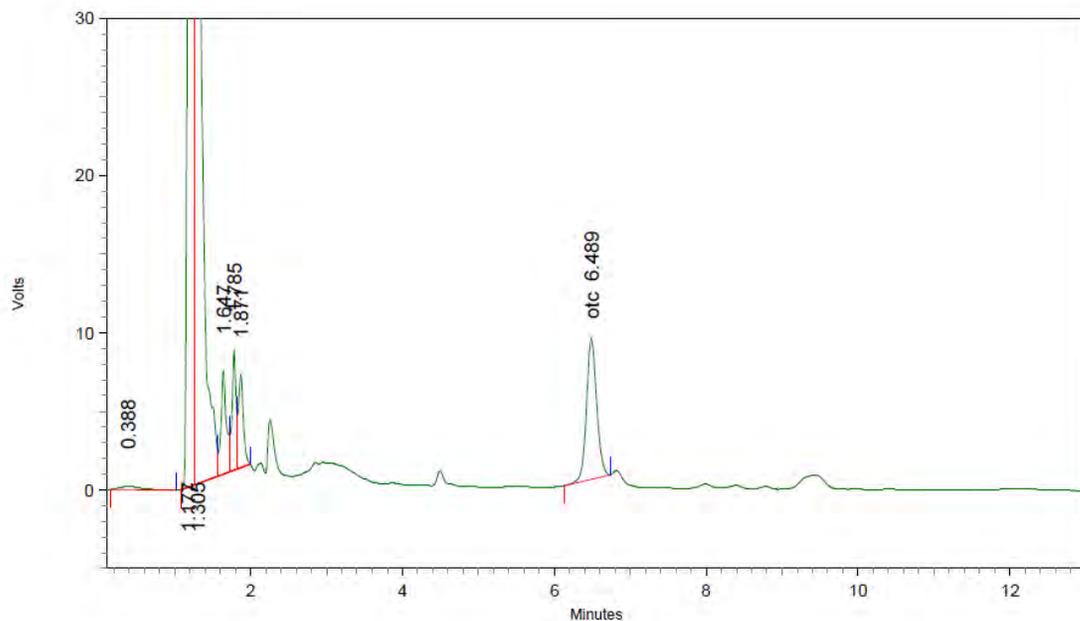


2: 355 mm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.500	85373	10830.36



NA 23 OTC 20-Enero-2016

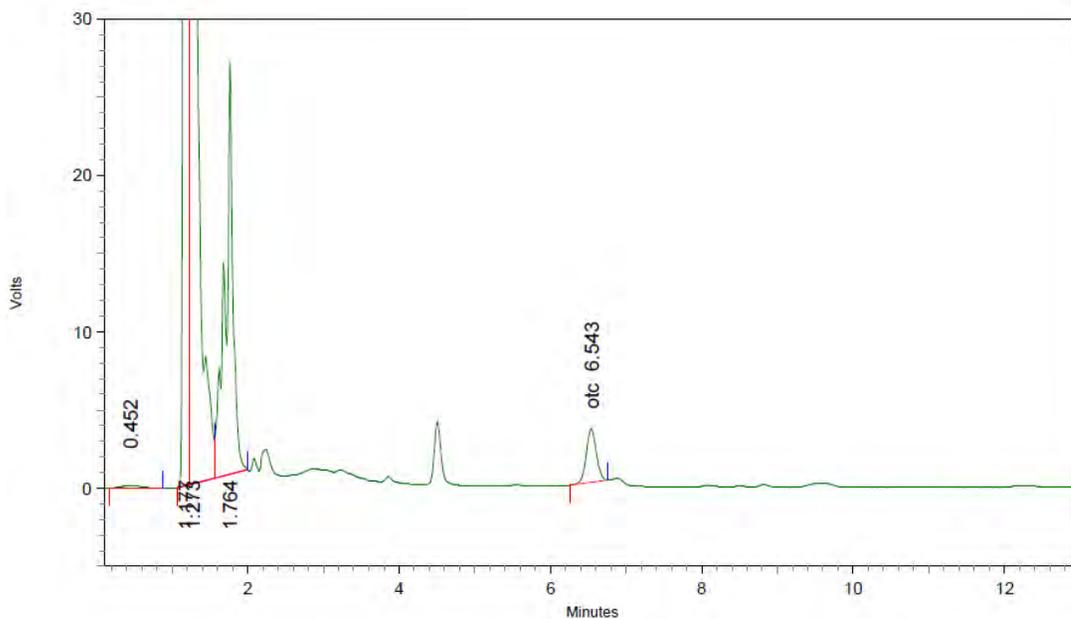


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.489	83447	10863.47



NB 19 OTC 20-Enero-2016

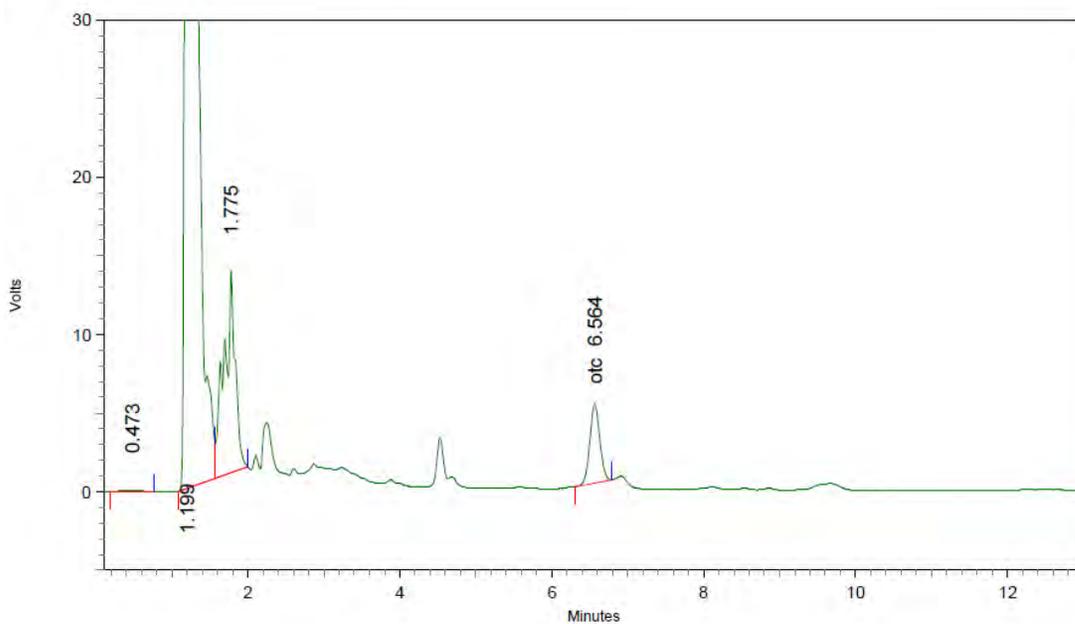


2: 355 mm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.543	31342	10966.71



NB 20 OTC 20-Enero-2016

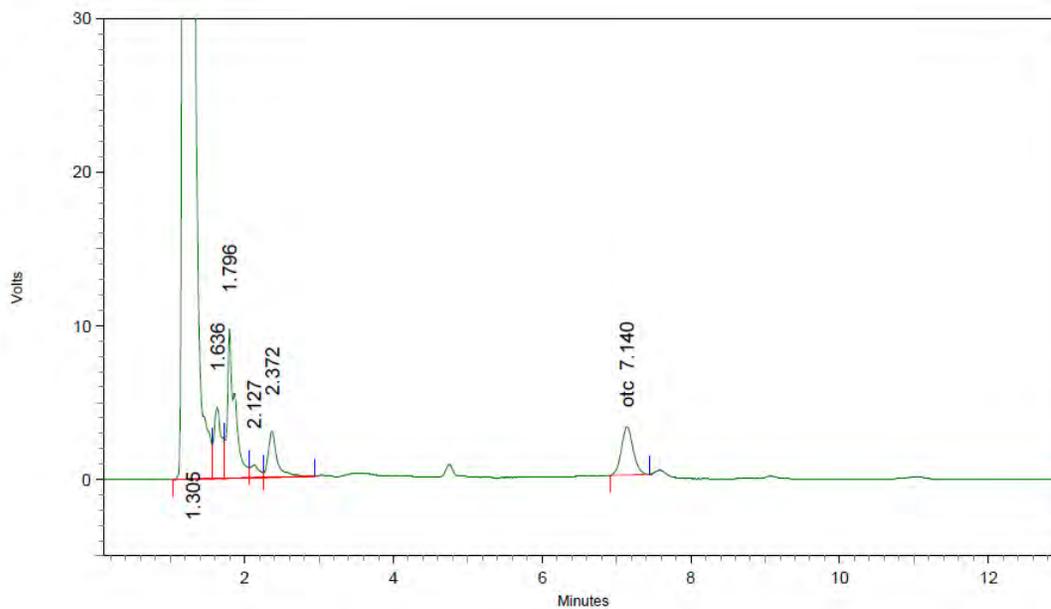


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.564	45696	11507.46



NB-21 OTC 16-Diciembre-2015

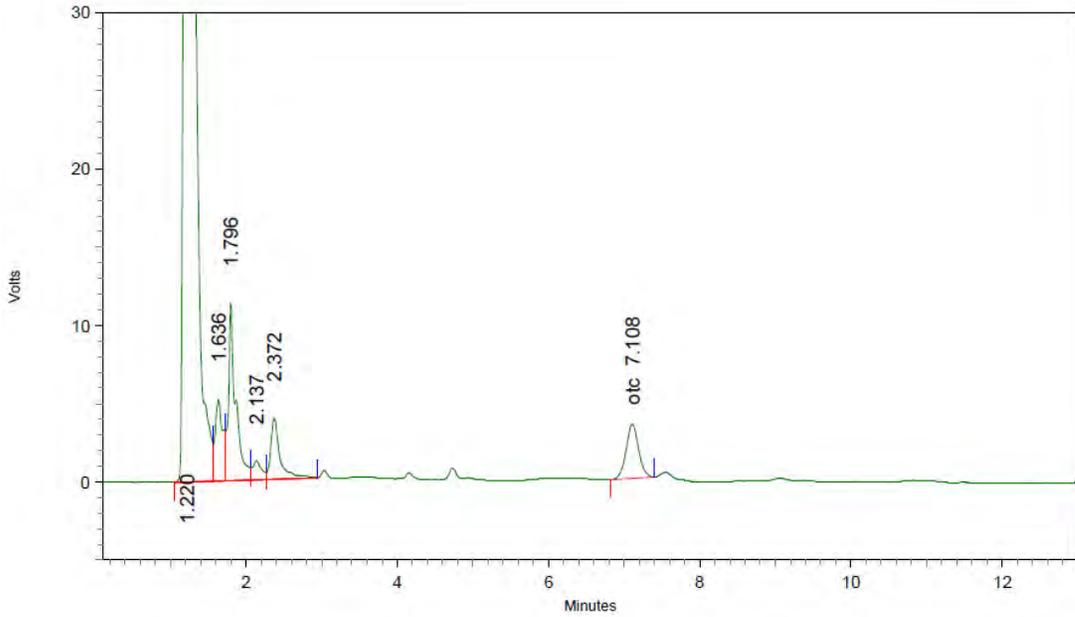


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.140	34307	9500.78



NB-22 OTC 16-Diciembre-2015

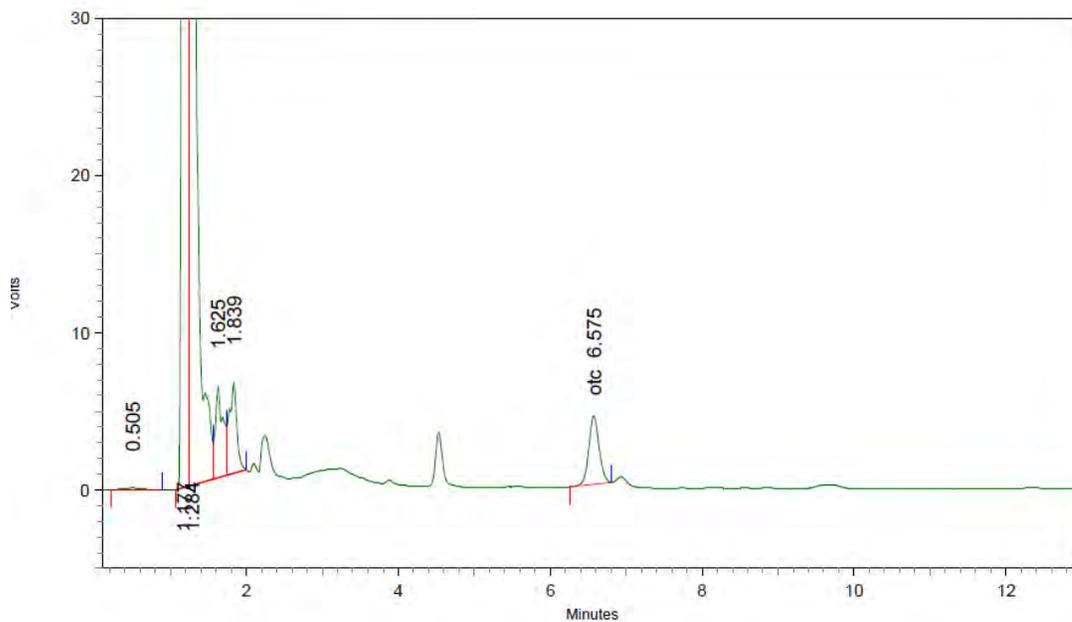


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.108	39587	8678.34



NB 23 OTC 20-Enero-2016

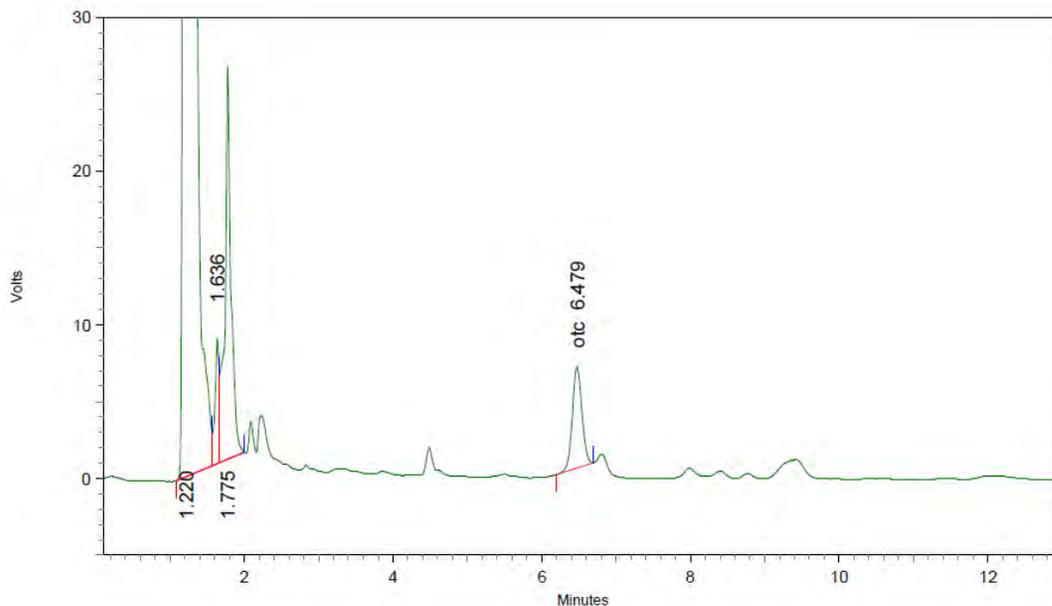


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.575	41082	10823.23



NC 19 OTC 20-Enero-2016

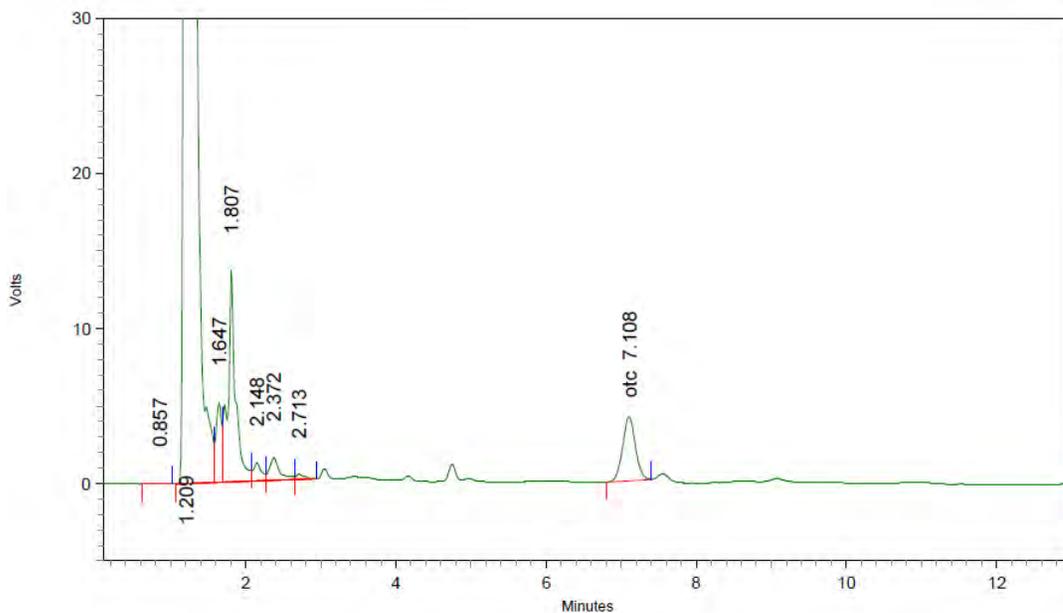


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.479	58891	11339.48



NC-20 OTC 16-Diciembre-2015

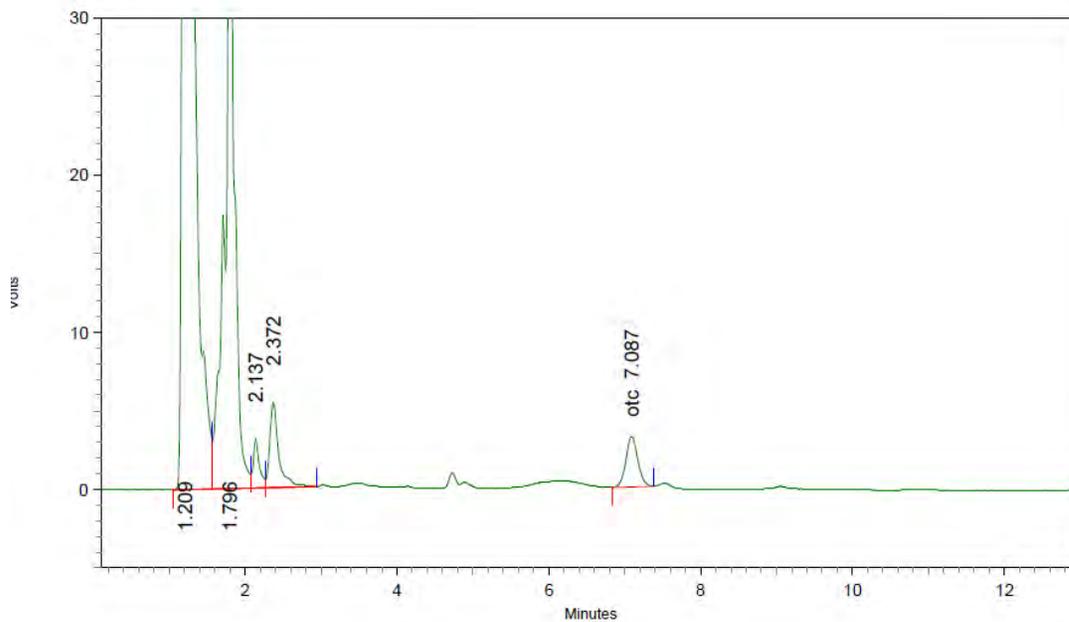


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.108	48764	7958.80



NC-21 OTC 16-Diciembre-2015

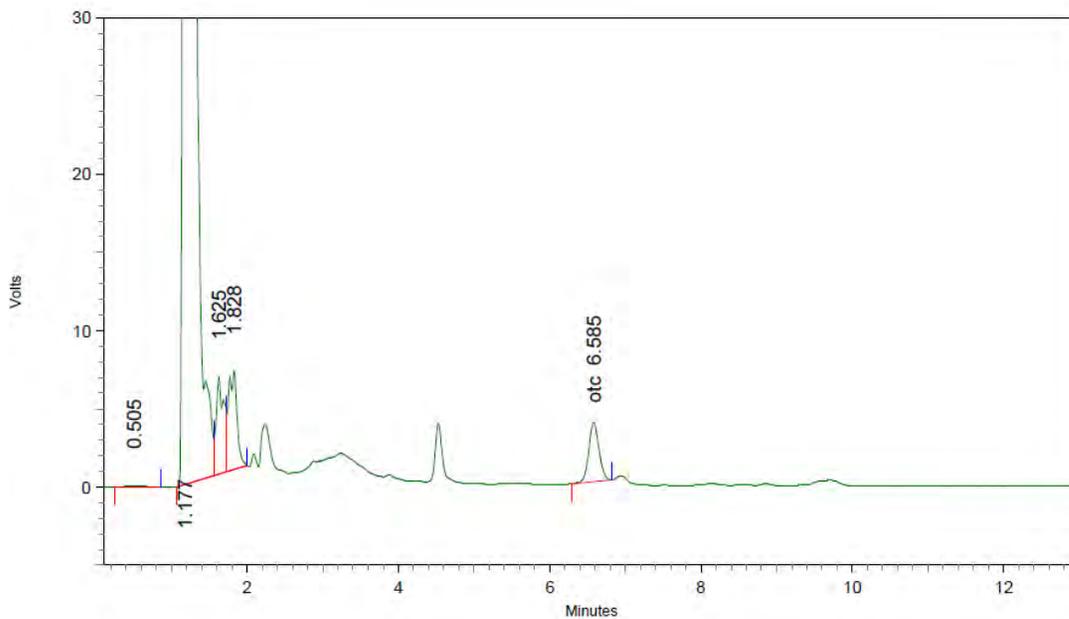


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.087	34956	9510.12



NC 22 OTC 20-Enero-2016

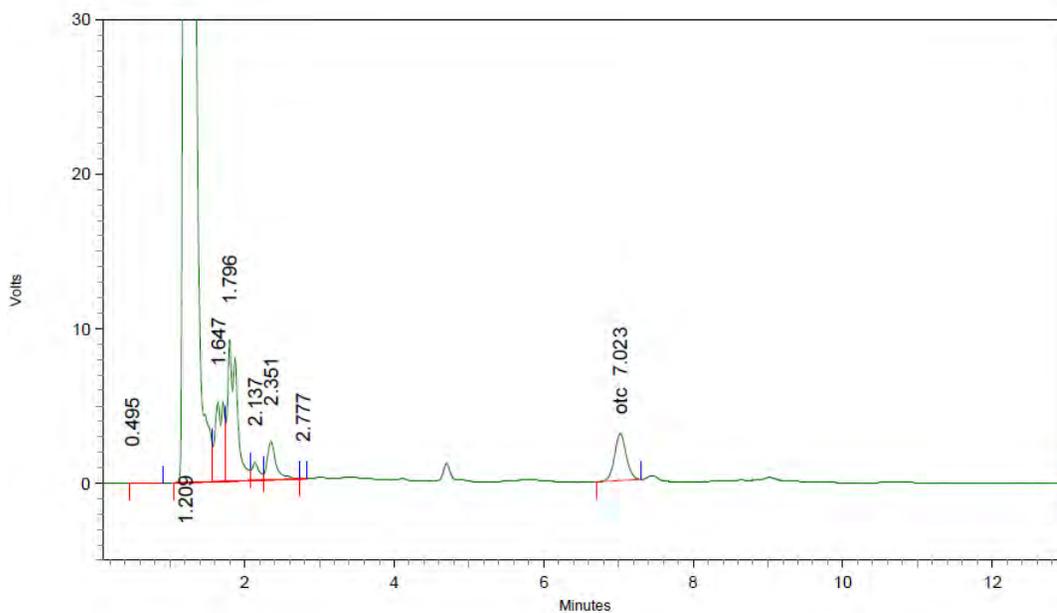


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.585	35490	10885.35



NC-23 OTC 16-Diciembre-2015

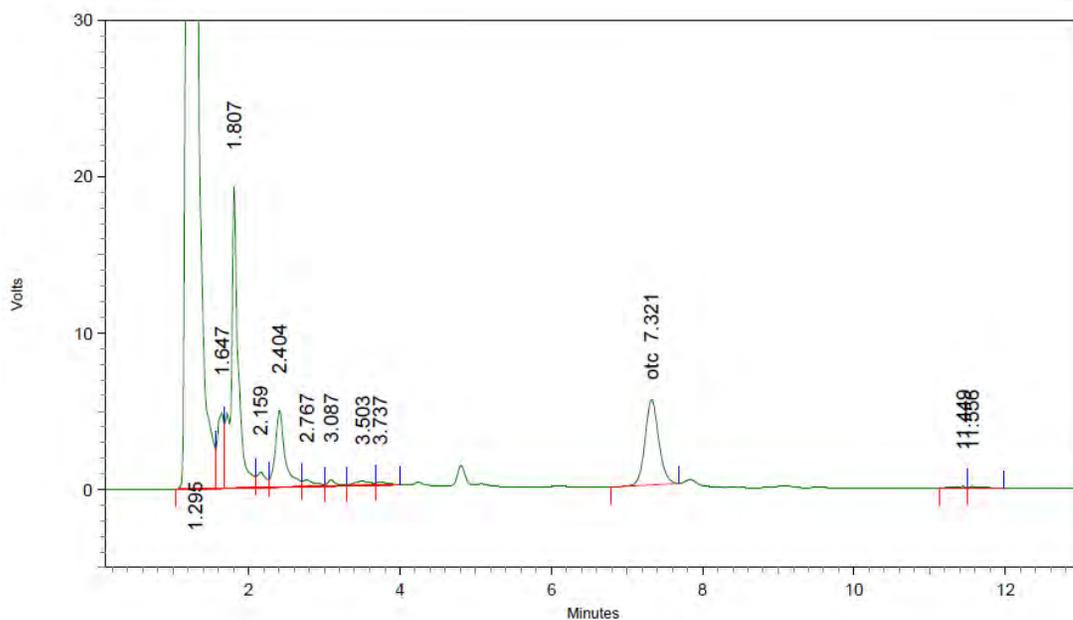


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.023	33166	9438.88



NA-24 OTC 22-Diciembre-2015

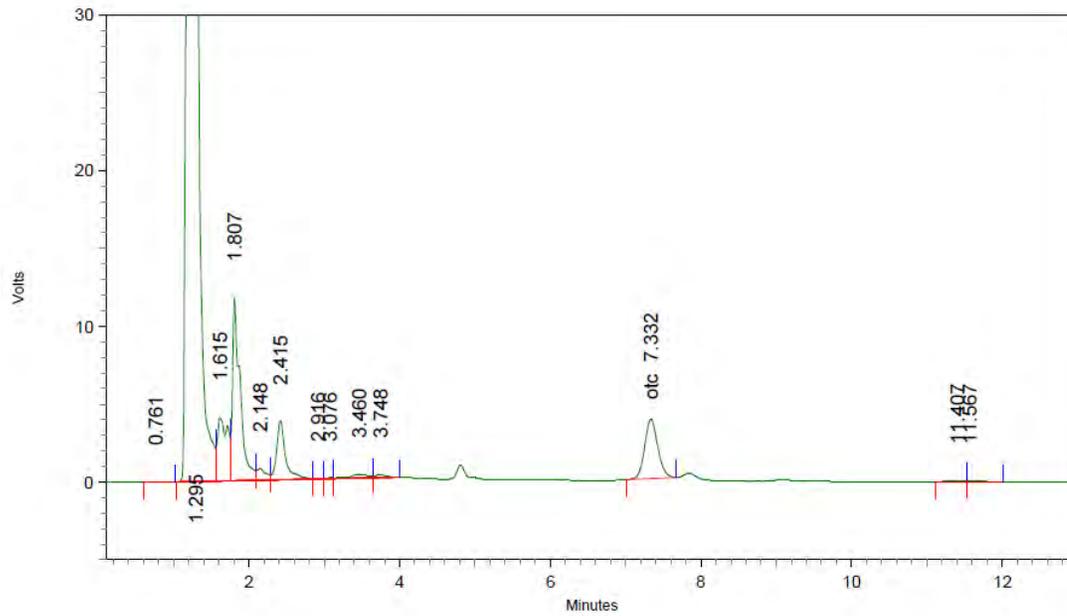


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.321	68705	7871.33



NA 25 OTC 22-Diciembre-2015

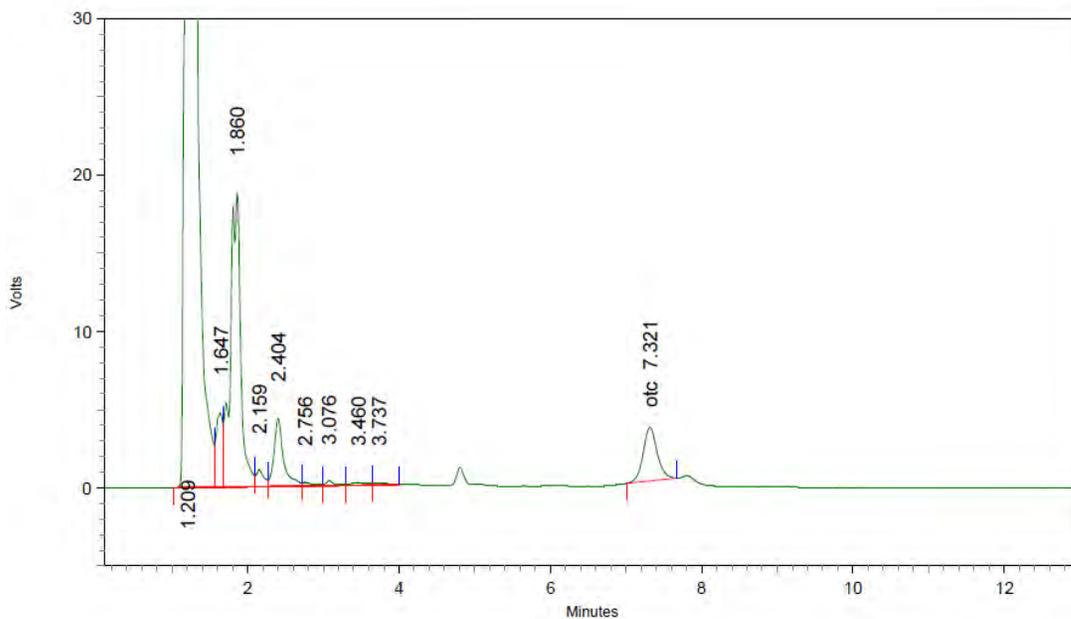


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.332	45954	8364.58



NA 26 OTC 22-Diciembre-2015

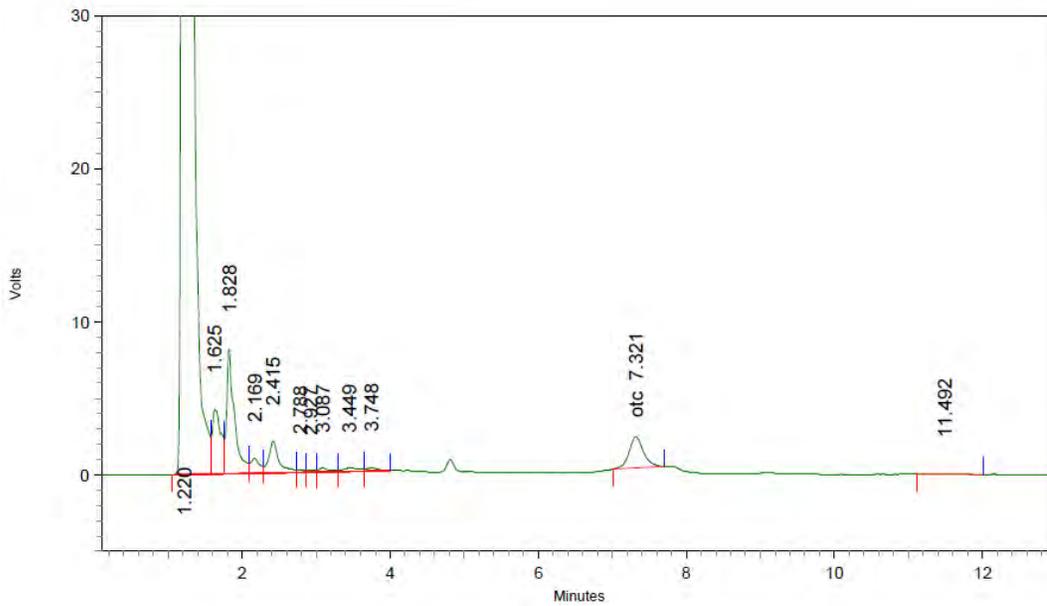


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.321	44140	7595.17



NA 27 OTC 22-Diciembre-2015

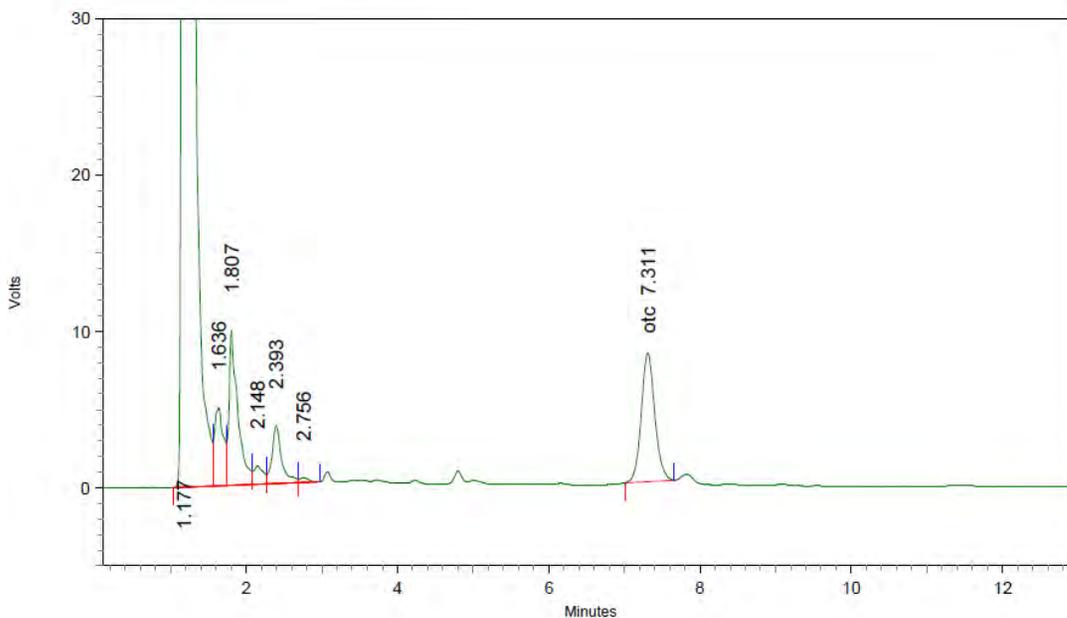


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.321	27259	7204.33



NA 28 OTC 22-Diciembre-2015

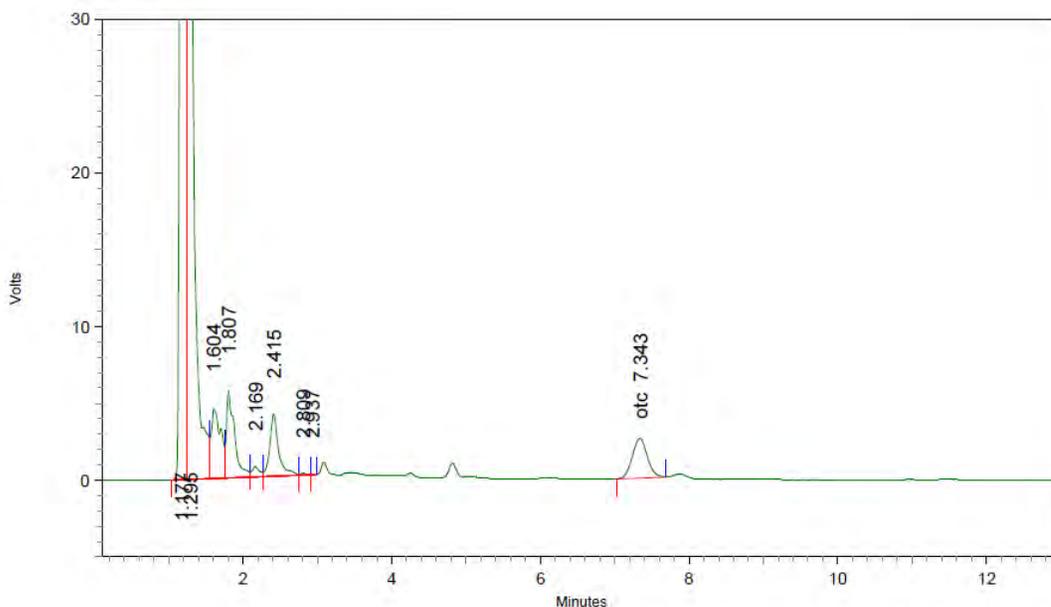


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.311	101968	8118.74



NB 24 OTC 22-Diciembre-2015

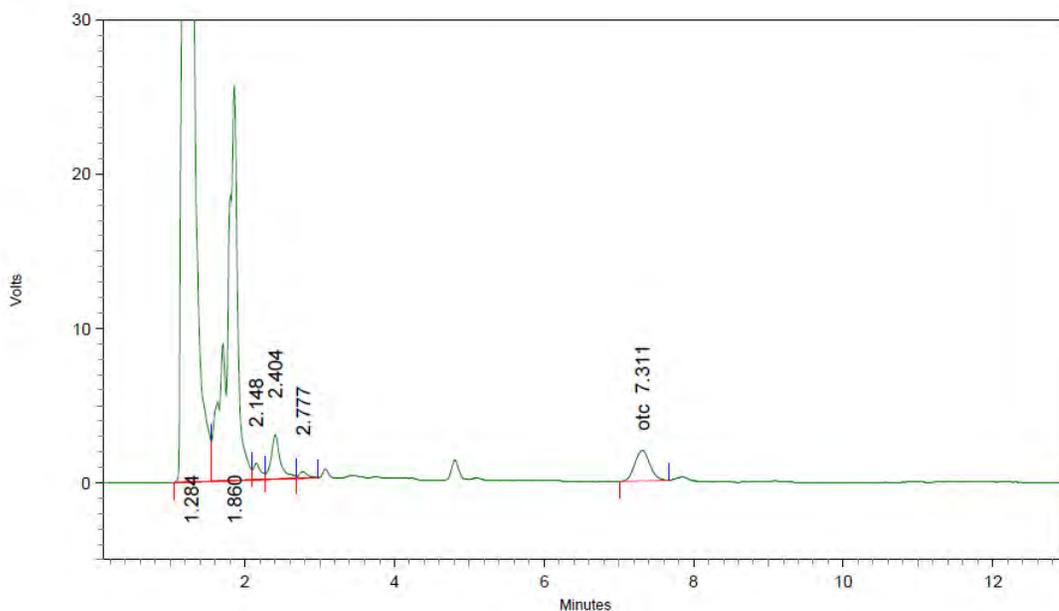


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.343	36139	6080.36



NB 25 OTC 22-Diciembre-2015

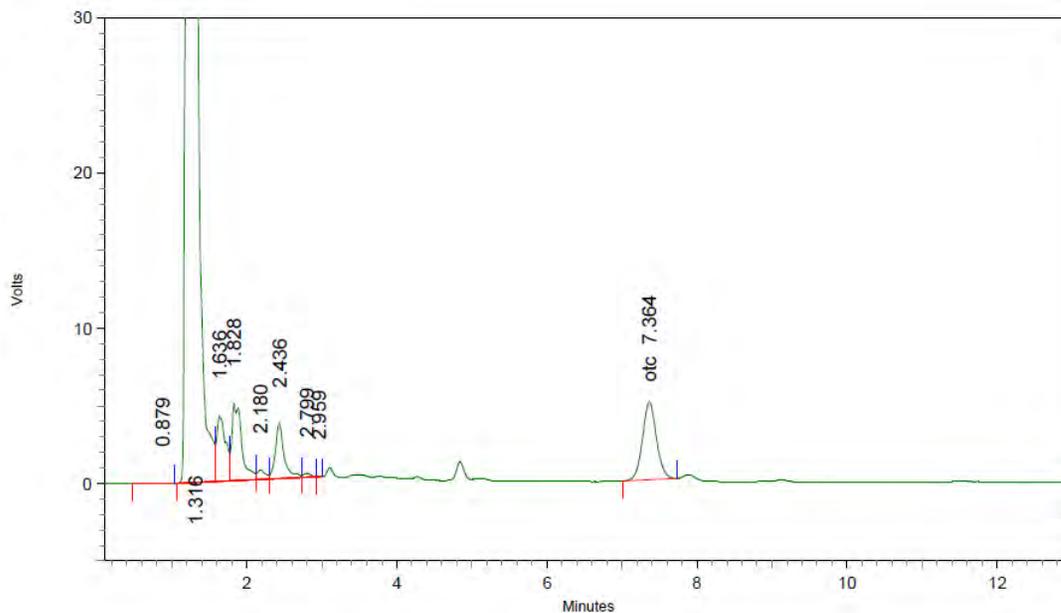


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.311	27727	6041.62



NB 26 OTC 22-Diciembre-2015

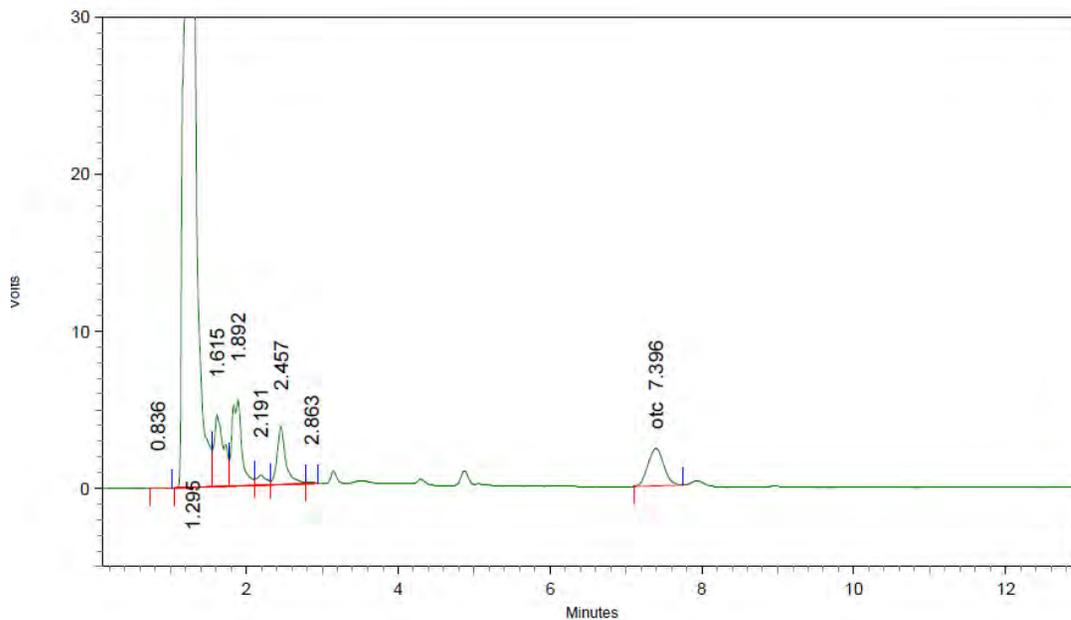


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.364	64630	7531.84



NB 27 OTC 22-Diciembre-2015

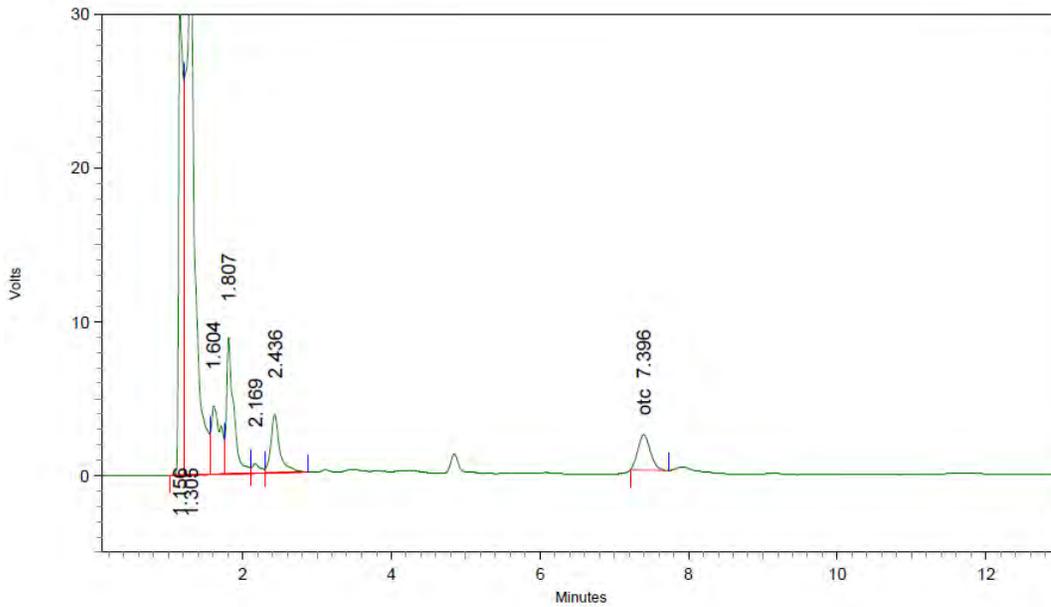


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.396	34529	5756.39



NB 28 OTC 22-Diciembre-2015

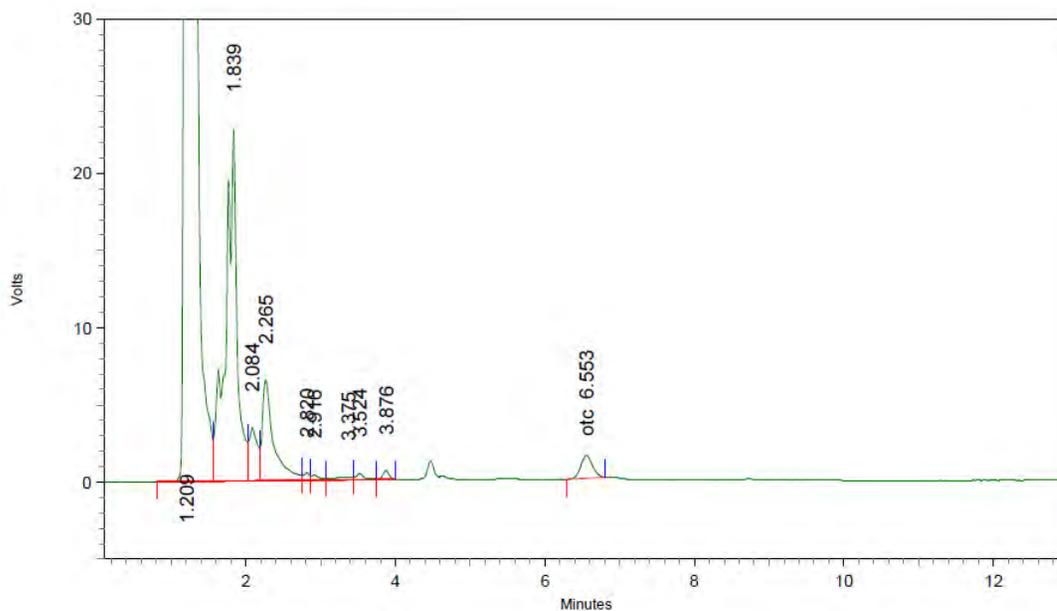


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.396	26659	8653.37



NC-24 30-Diciembre-2015

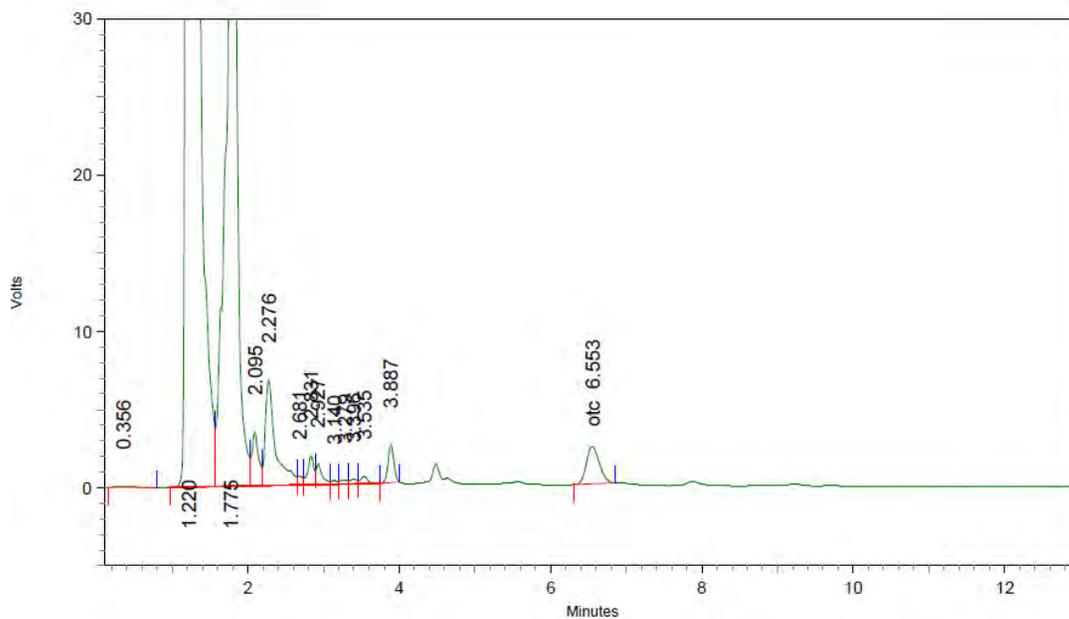


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.553	15876	7996.50



NC 25- 30-Diciembre-2015

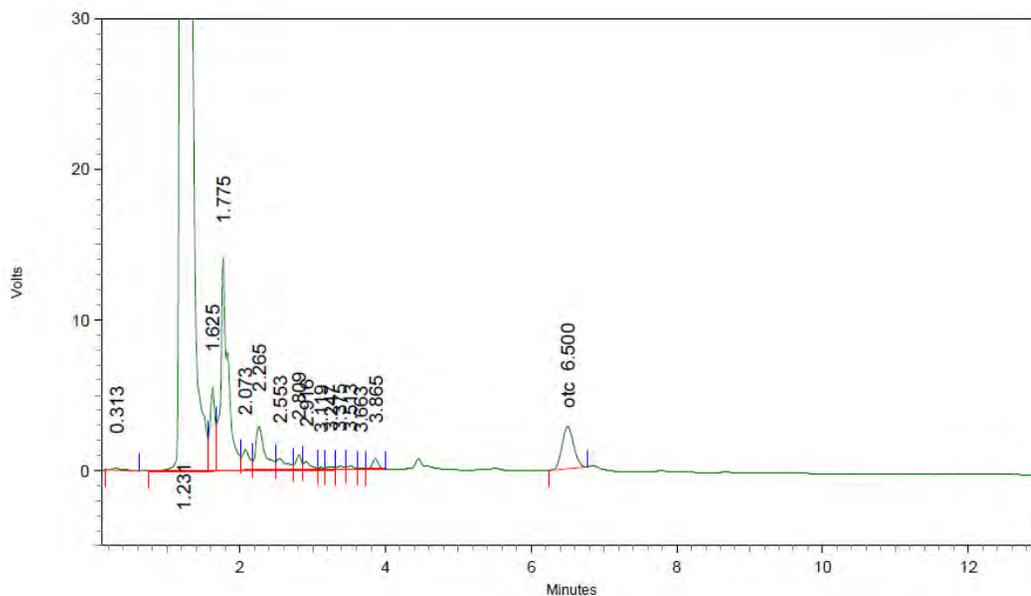


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.553	28415	6749.69



NC 26 30-Diciembre-2015

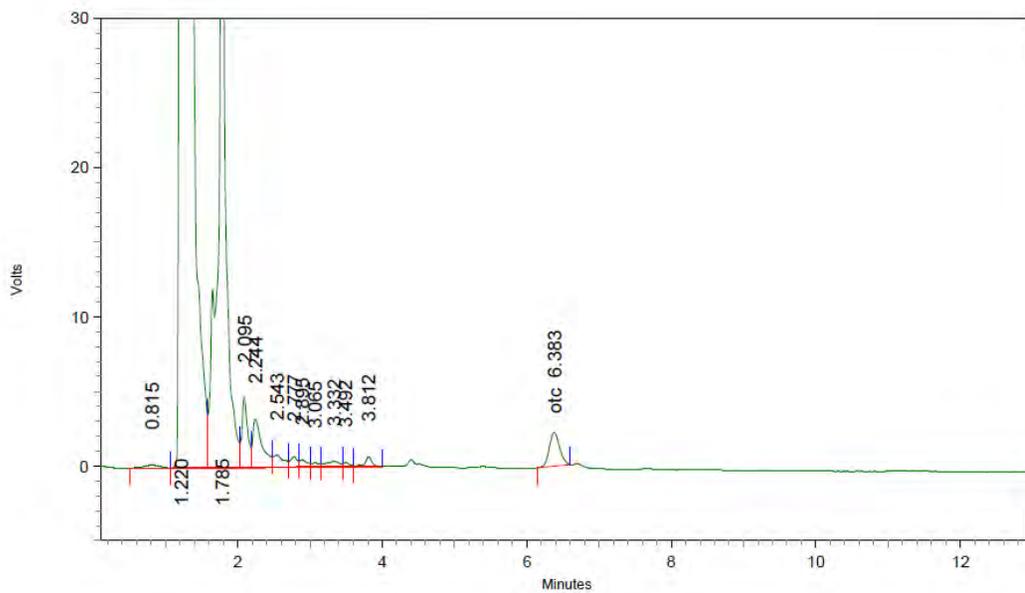


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.500	31110	7501.62



NC 27 30-Diciembre-2015

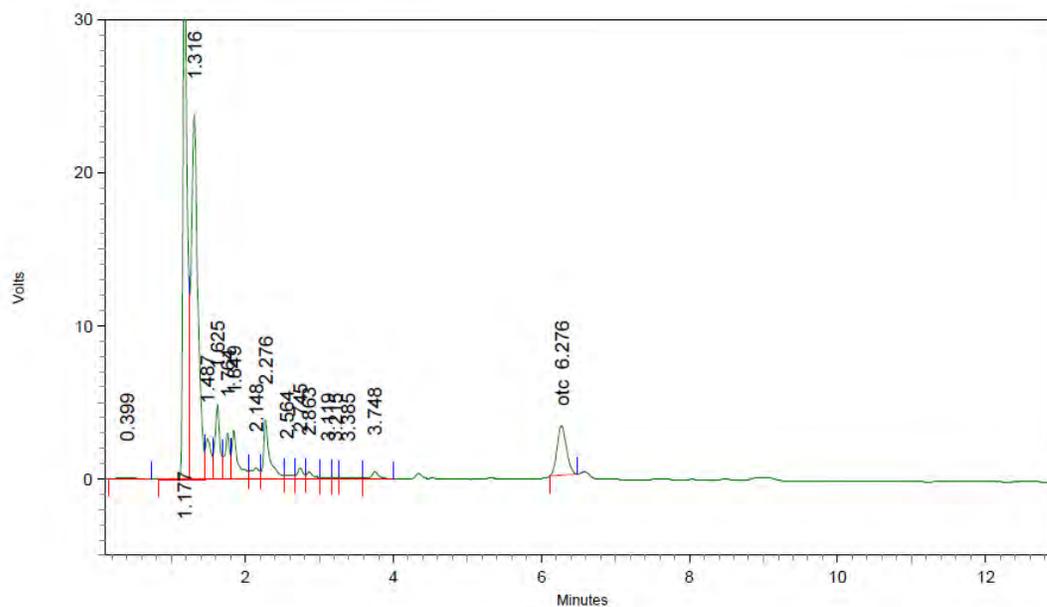


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.383	22360	9163.70



NC 28 30-Diciembre-2015

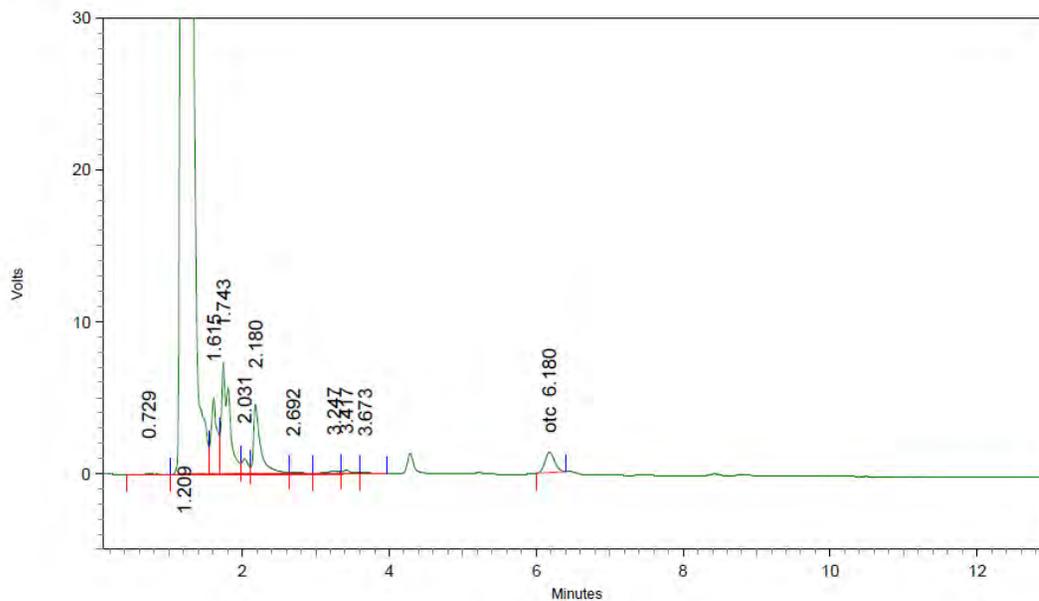


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.276	28620	10623.63



NA 29 30-Diciembre-2015

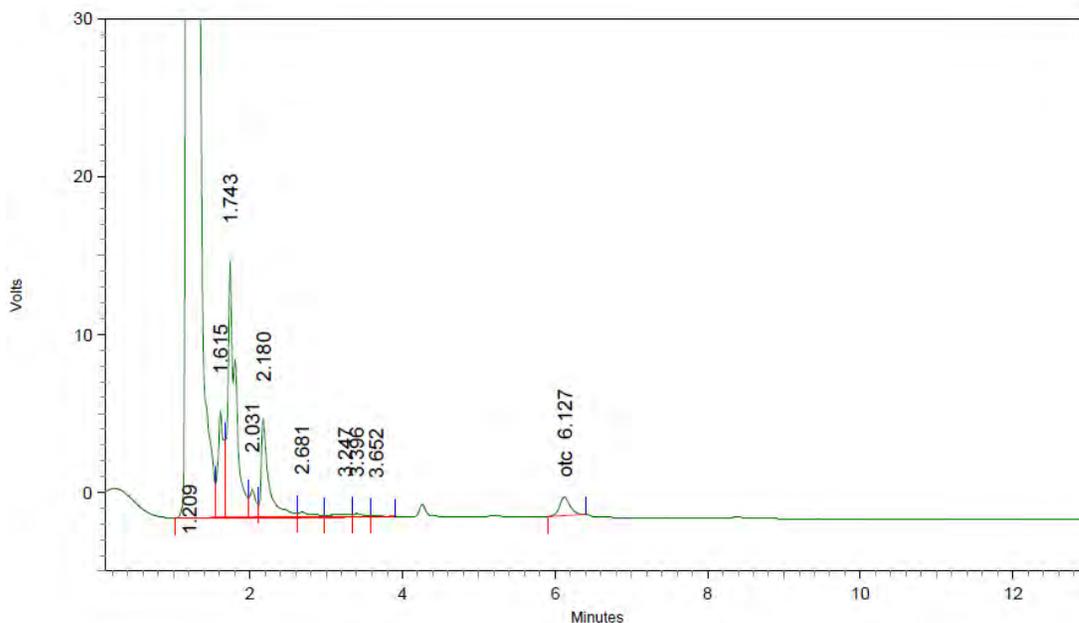


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.180	12358	9929.96



NA 30 30-Diciembre-2015

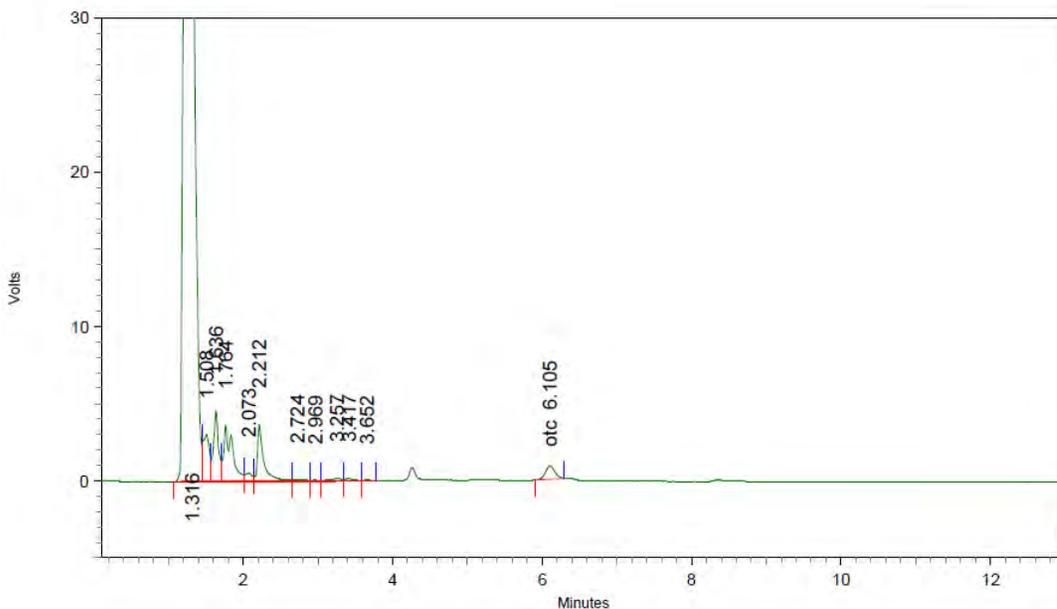


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.127	11108	9410.98



NA 31 30-Diciembre-2015

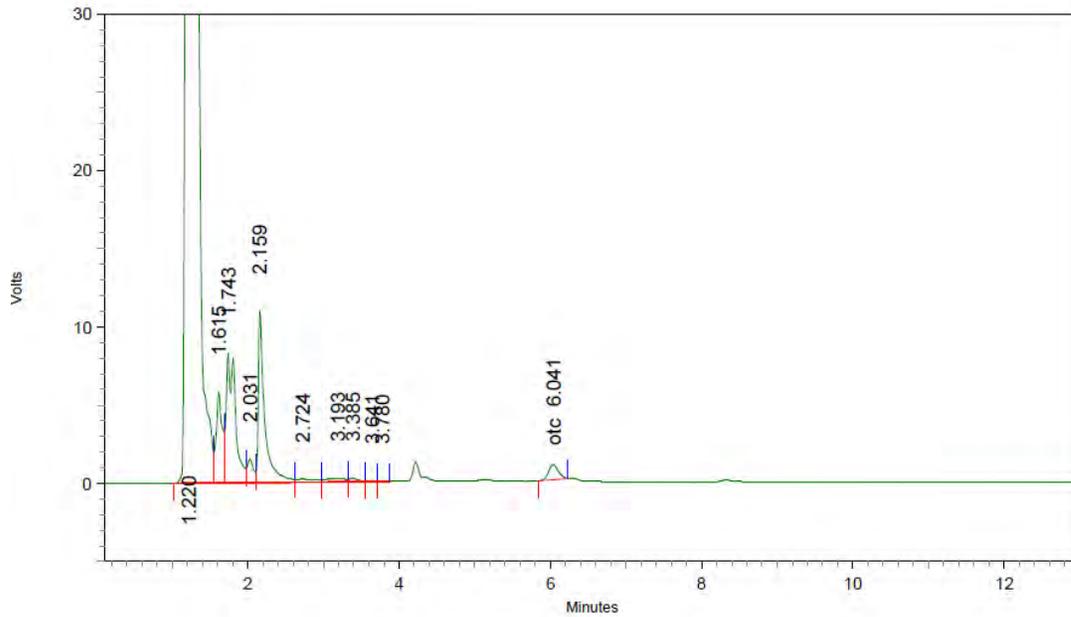


2: 355 mm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.105	7588	10227.45



NA 32 30-Diciembre-2015

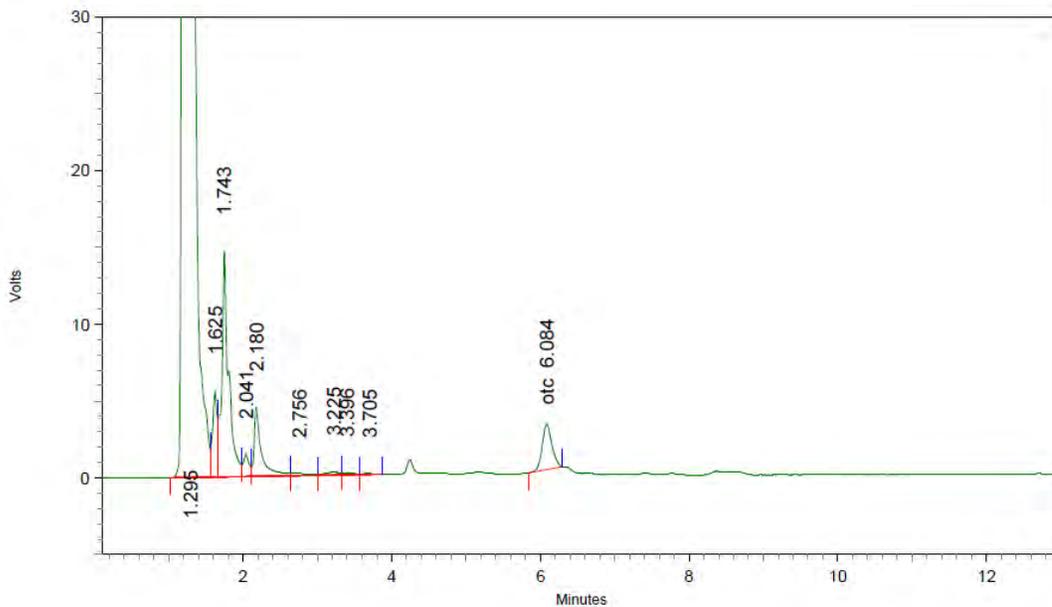


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.041	8500	10230.19



NA 33 30-Diciembre-2015

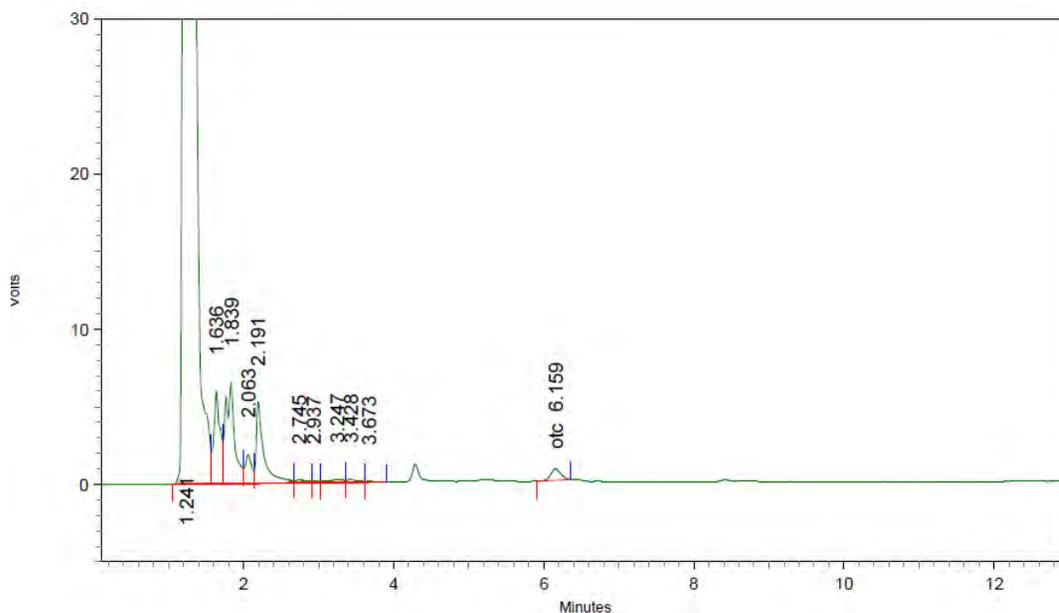


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.084	27011	9664.35



NB 29 30-Diciembre-2015

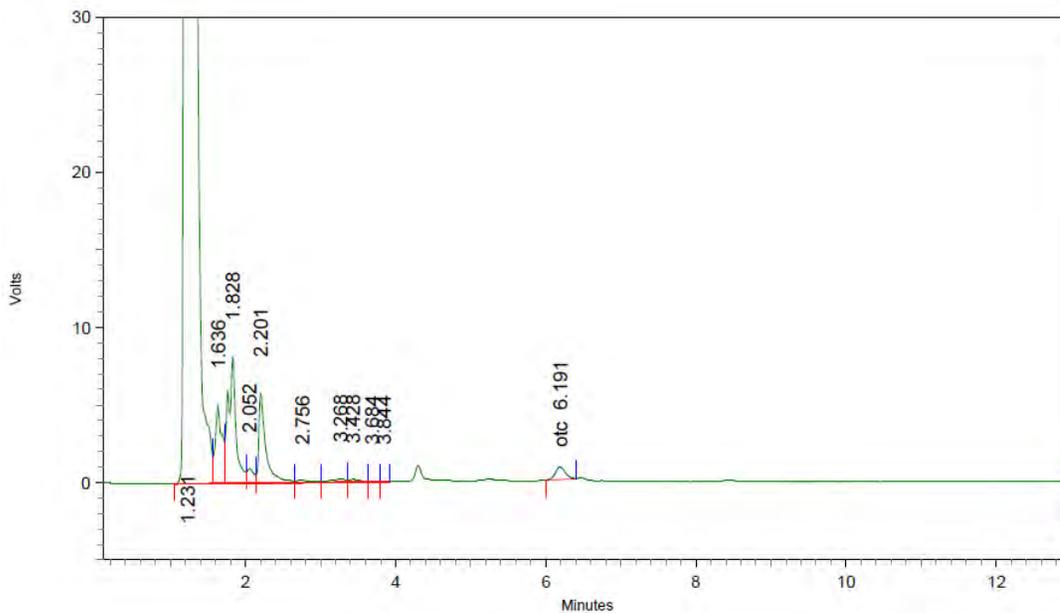


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.159	6735	9385.03



NB 30 30-Diciembre-2015

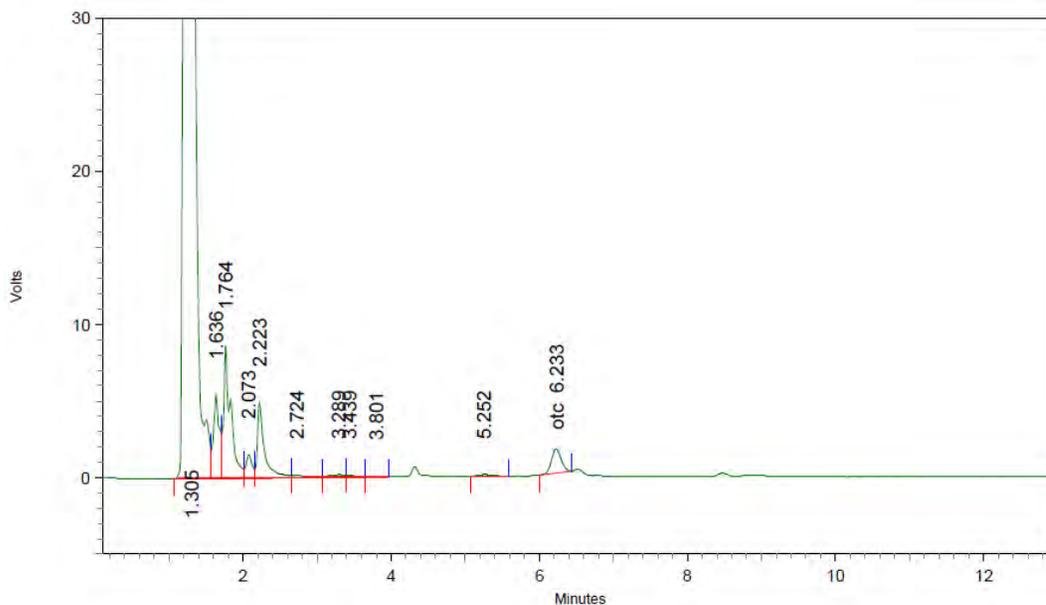


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.191	7468	9628.04



NB 31 30-Diciembre-2015

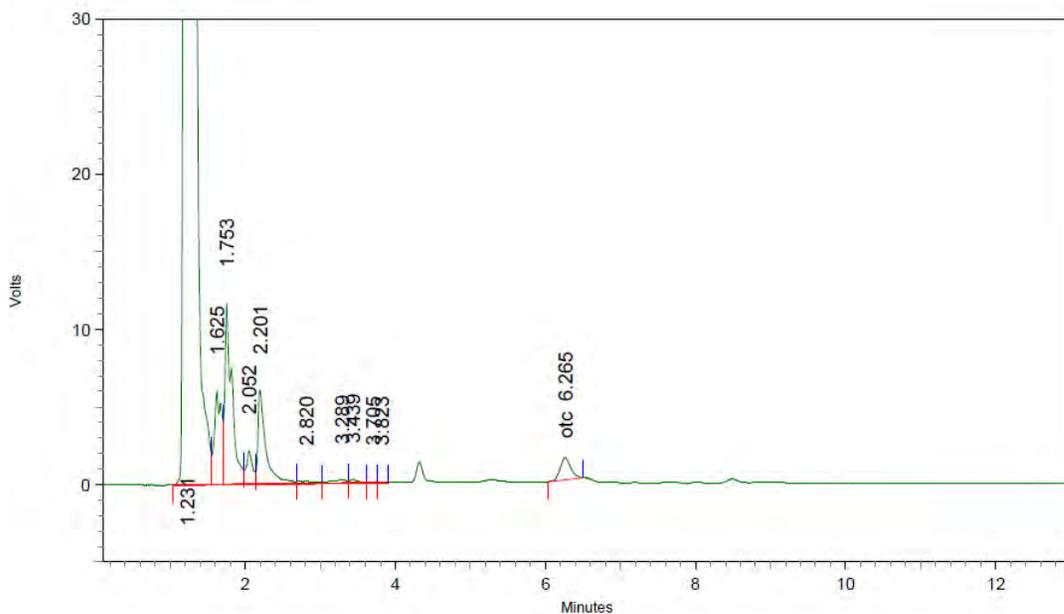


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.233	14363	10510.03



NB 32 30-Diciembre-2015

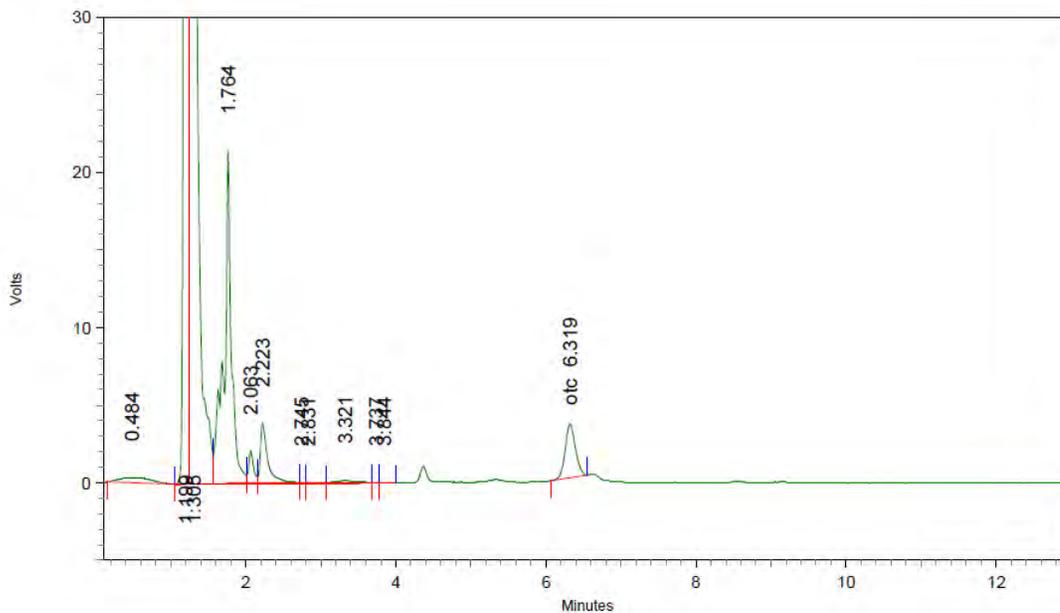


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.265	13828	9122.98



NB 33 30-Diciembre-2015

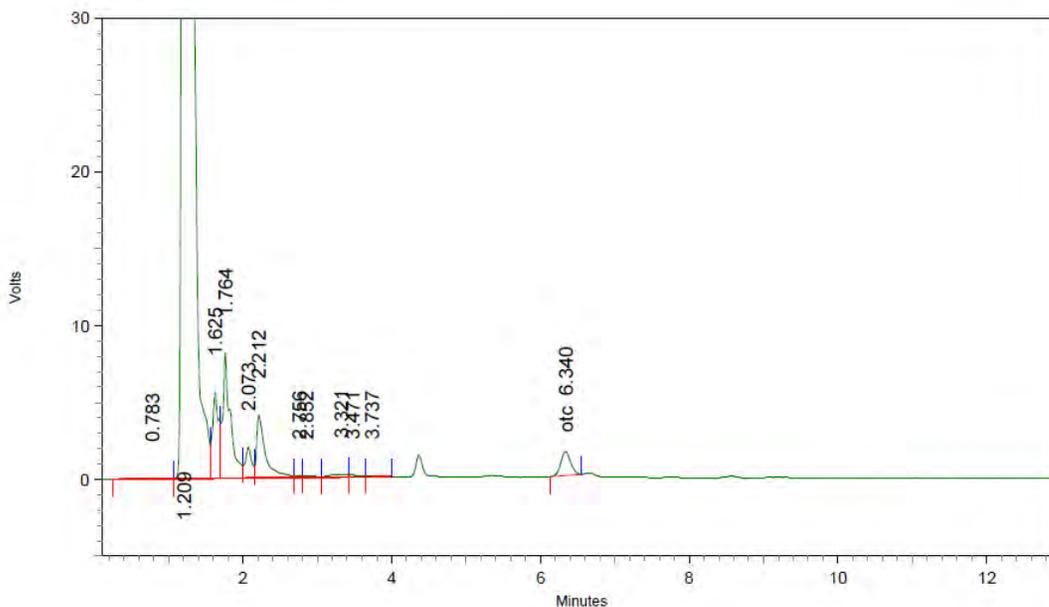


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.319	32936	9857.34



NC 29 30-Diciembre-2015

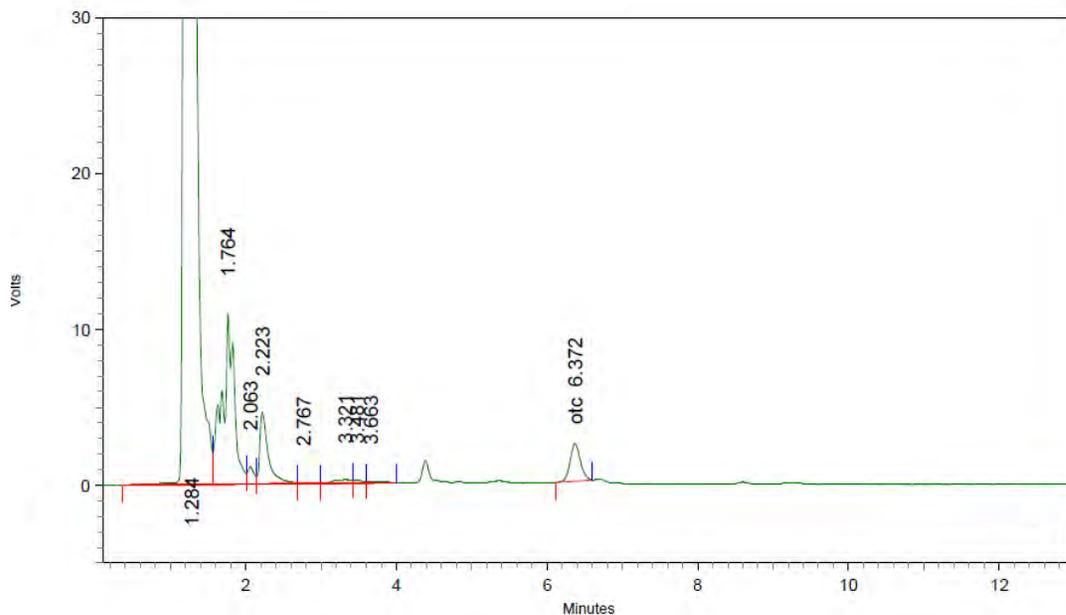


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.340	14215	10309.11



NC 30 30-Diciembre-2015

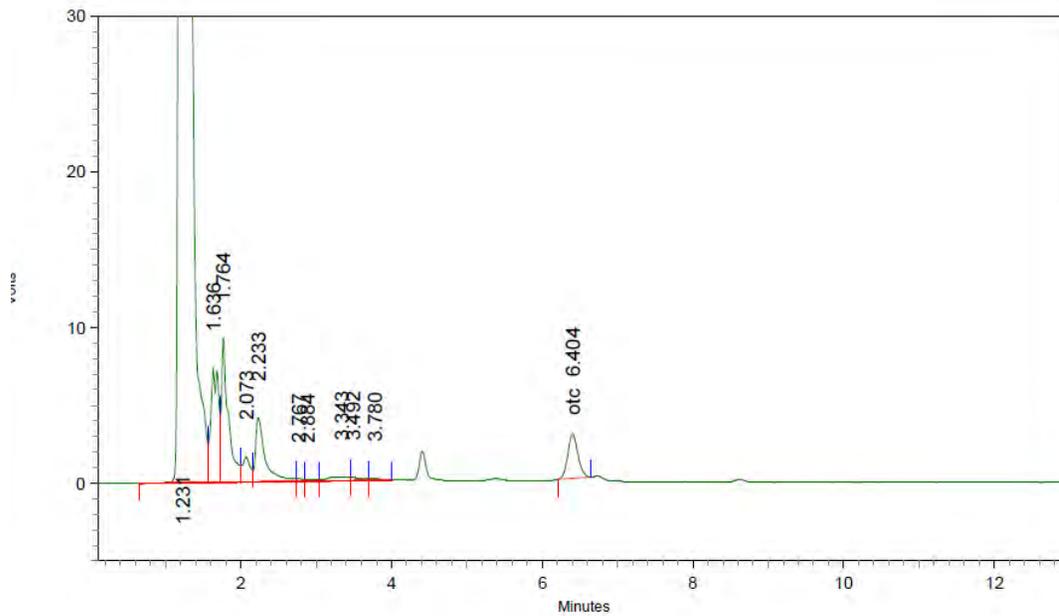


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.372	22822	9900.78



NC 31 30-Diciembre-2015

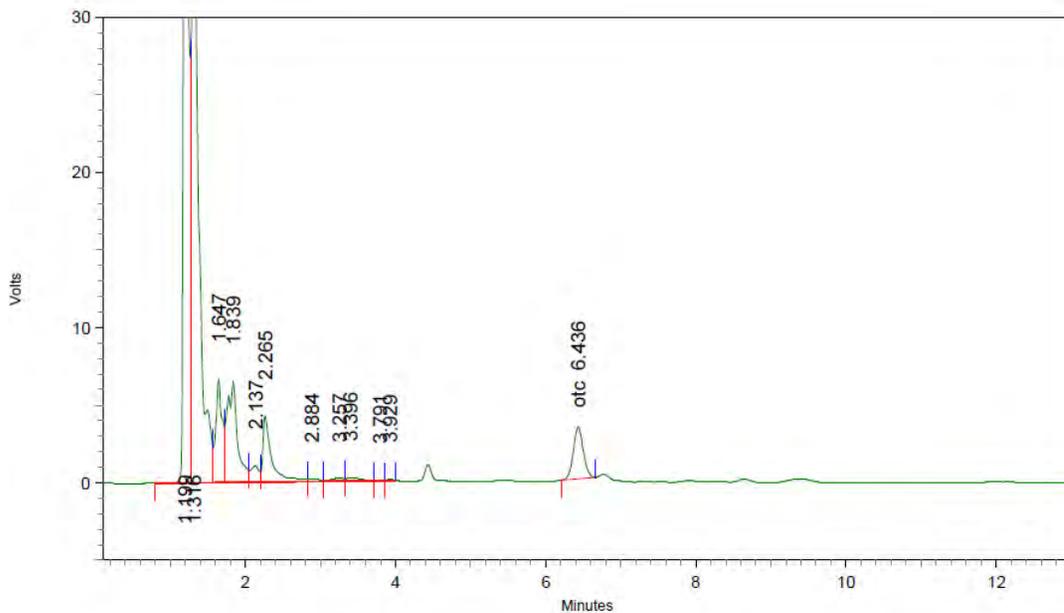


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.404	26618	10211.63



NC 32 30-Diciembre-2015

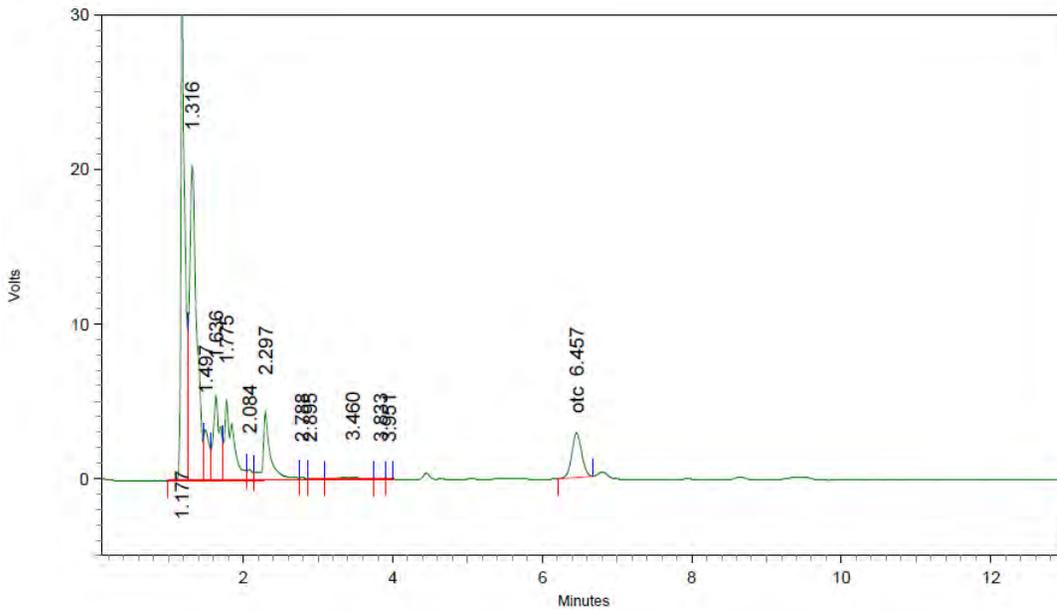


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.436	30804	10624.88



NC 33 30-Diciembre-2015

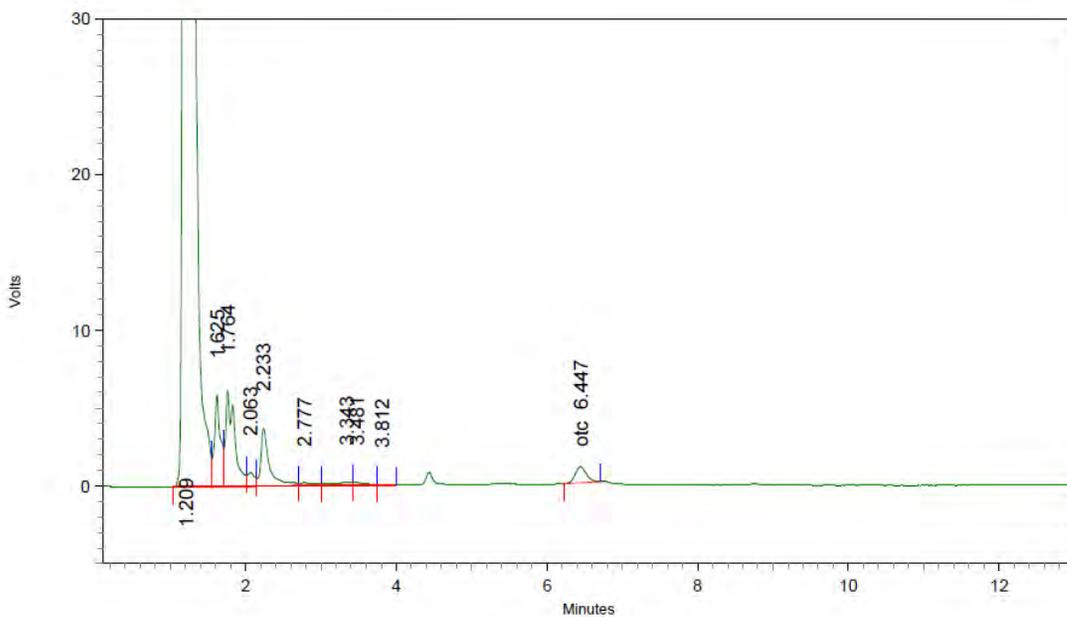


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.457	26304	11130.90



A34 OTC 11-Enero-2016

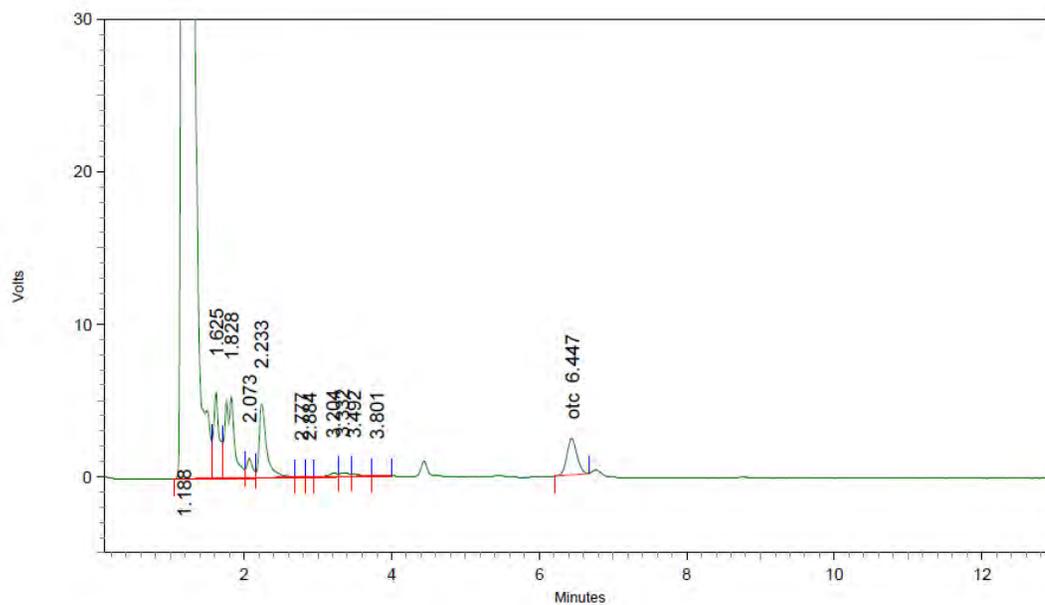


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.447	10644	8552.86



A35 OTC 11-Enero-2016

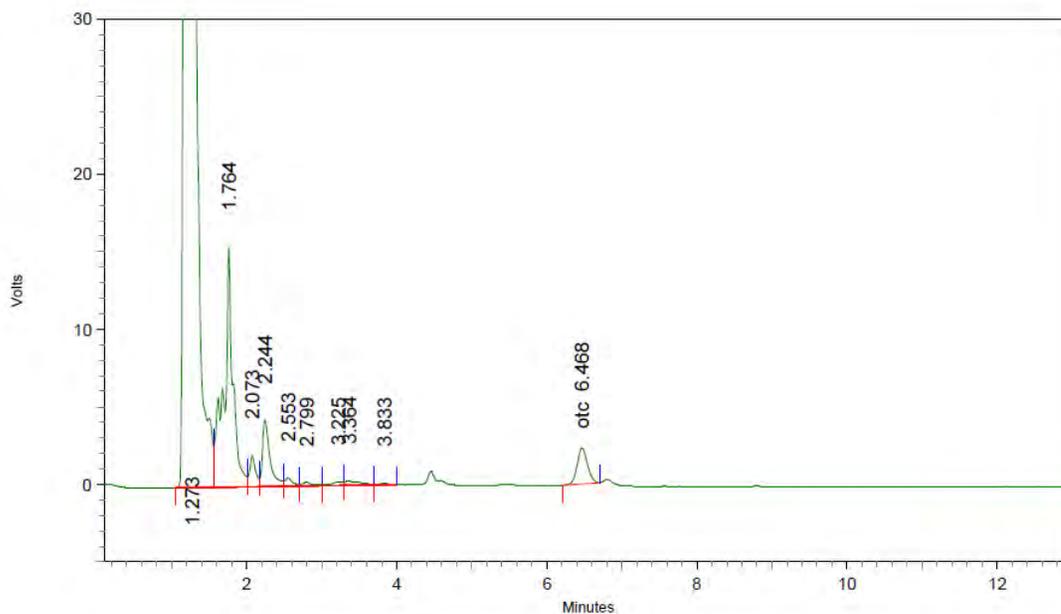


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.447	22652	10047.76



A36 OTC 11-Enero-2016

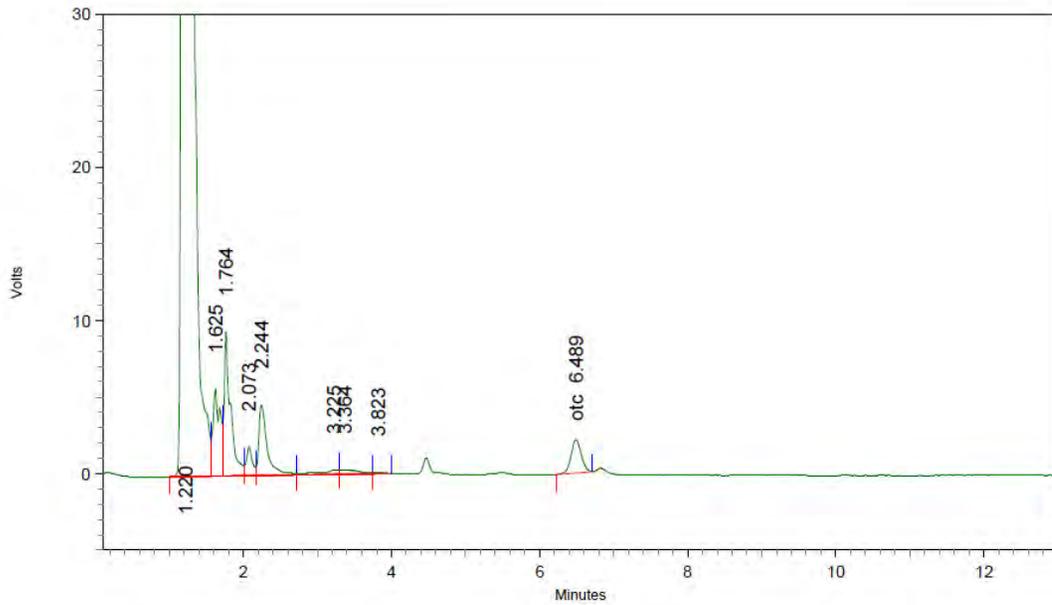


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.468	21961	10336.17



A37 OTC 11-Enero-2016

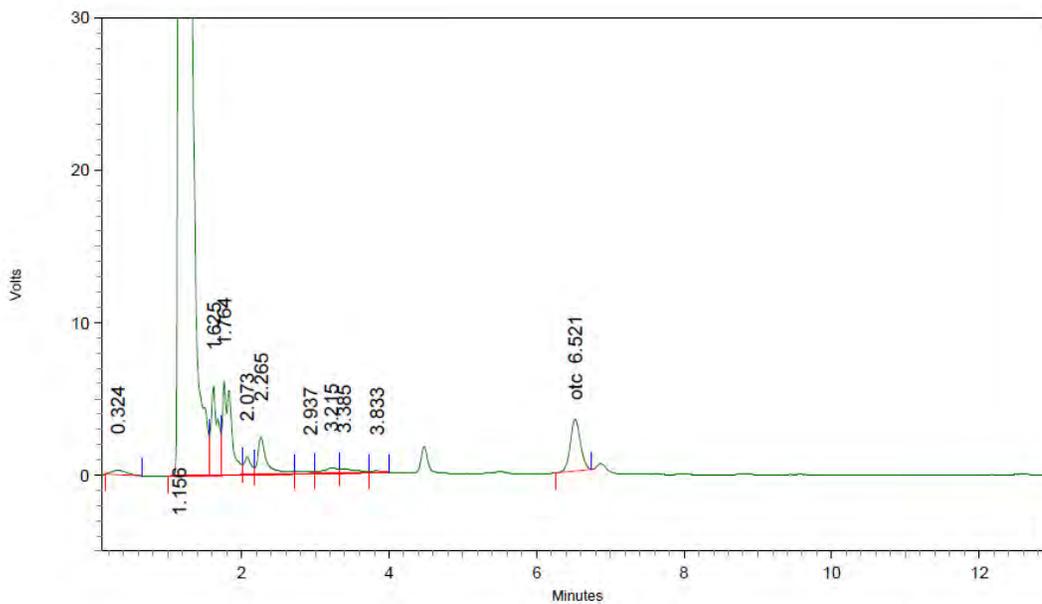


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.489	20781	10349.49



A38 OTC 11-Enero-2016

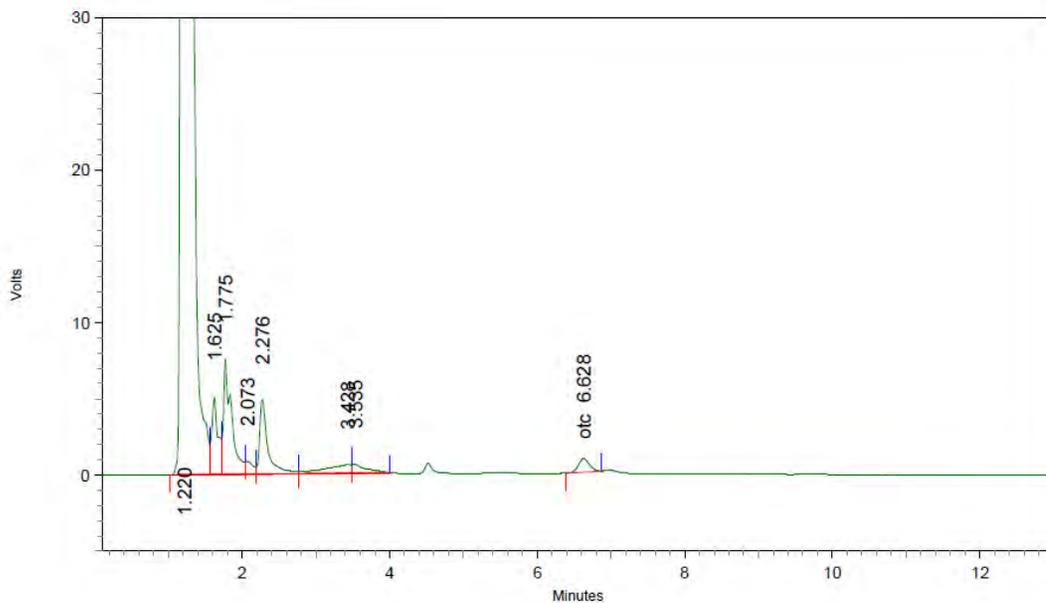


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.521	32422	10487.83



B-34 OTC 18-Enero-2016

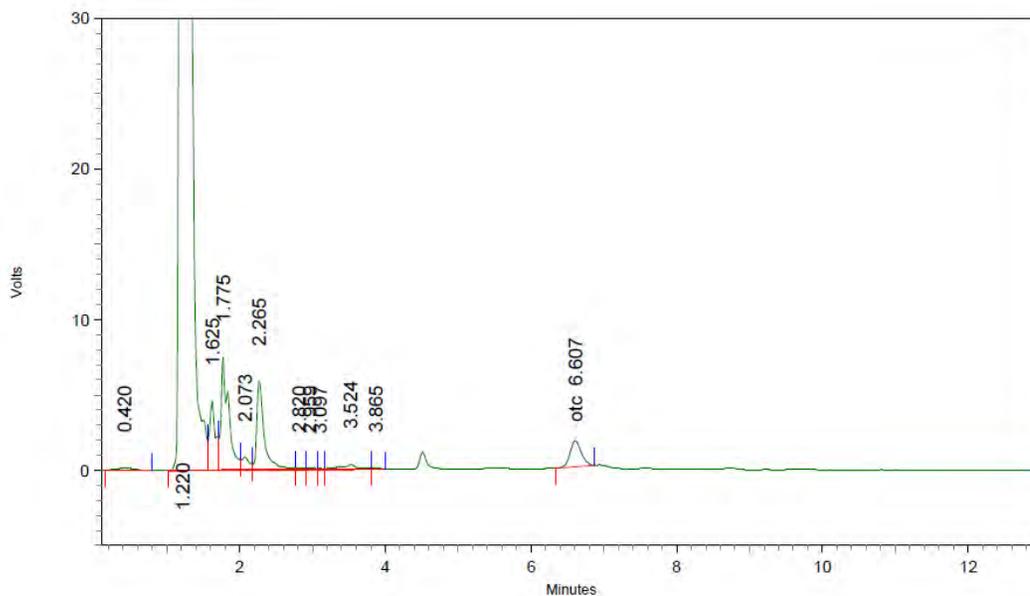


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.628	9215	8742.67



B-35 OTC 18-Enero-2016

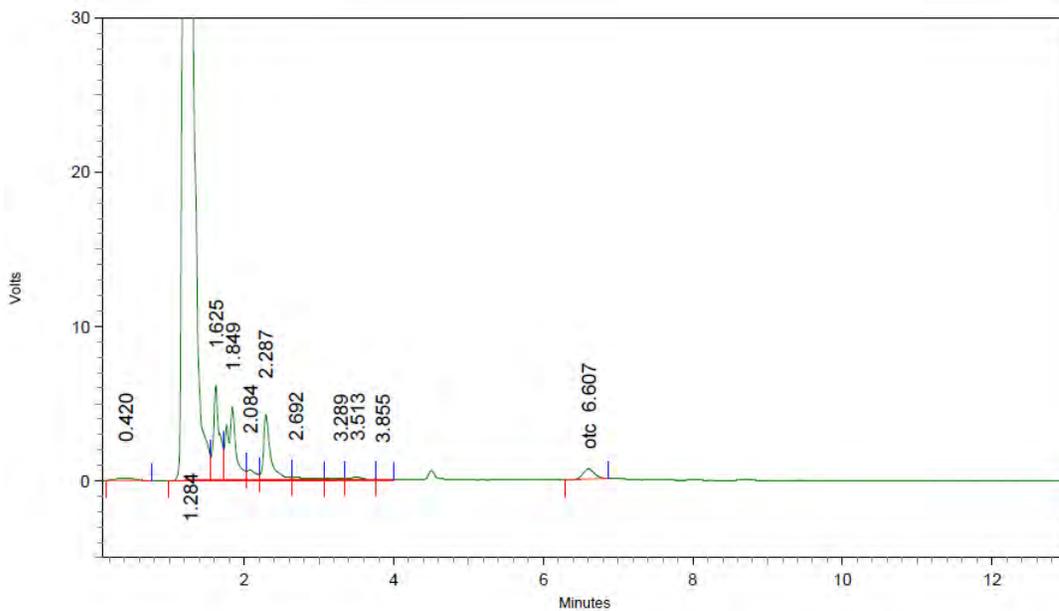


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.607	18289	8494.22



B-36 OTC 18-Enero-2016

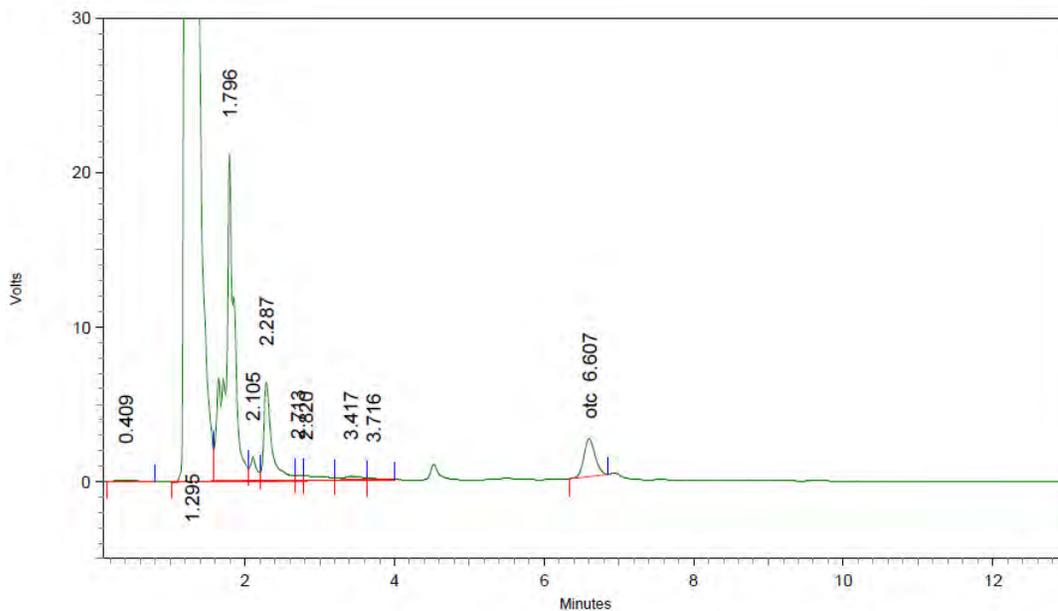


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.607	7002	8780.64



B-37 OTC 18-Enero-2016

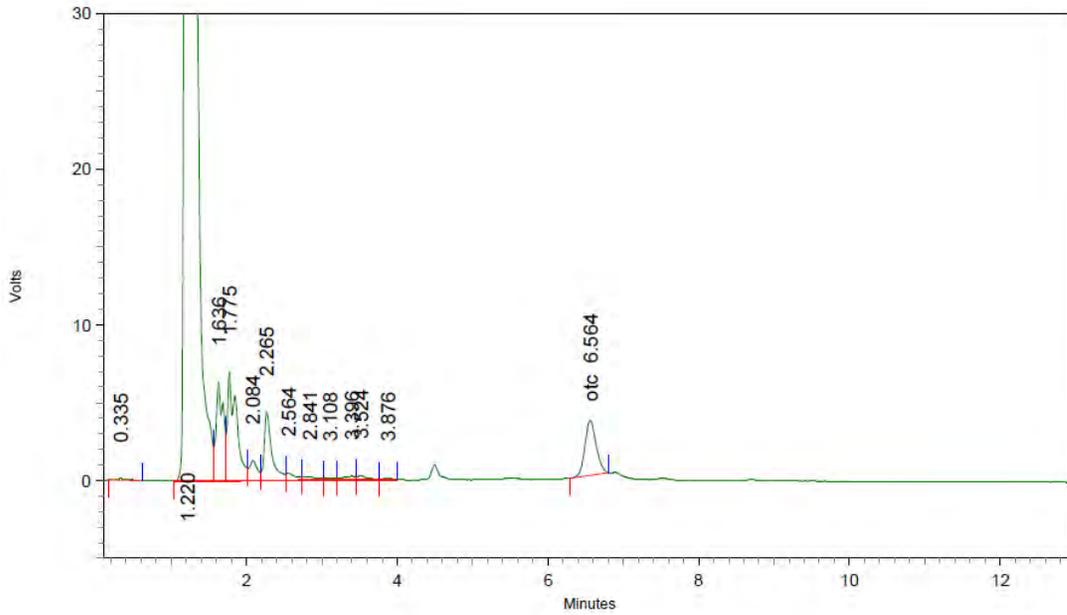


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.607	25557	9051.47



B-38 OTC 18-Enero-2016

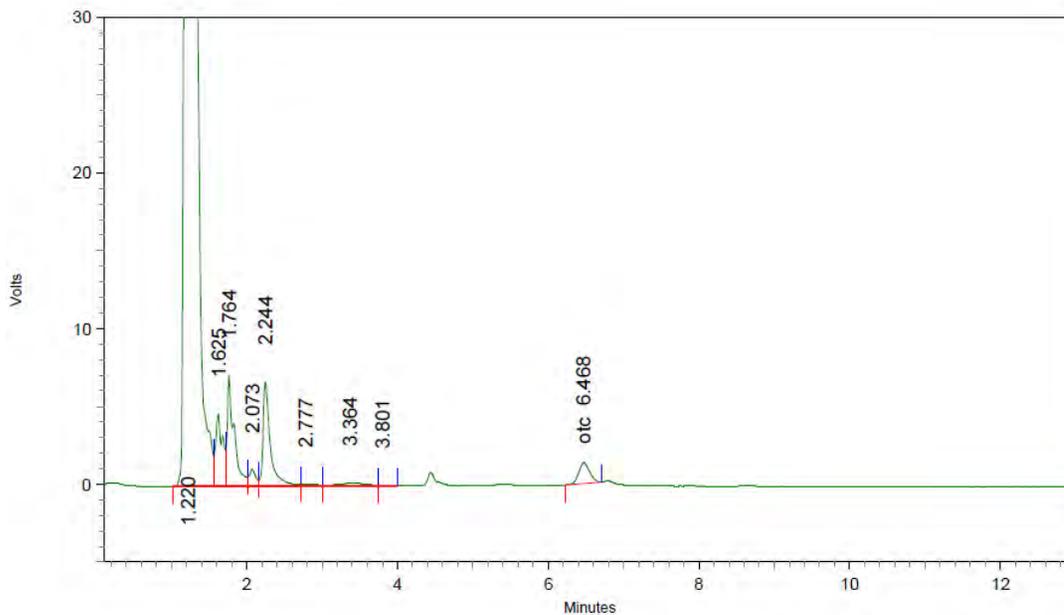


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.564	36601	8925.84



C-34 OTC 18-Enero-2016

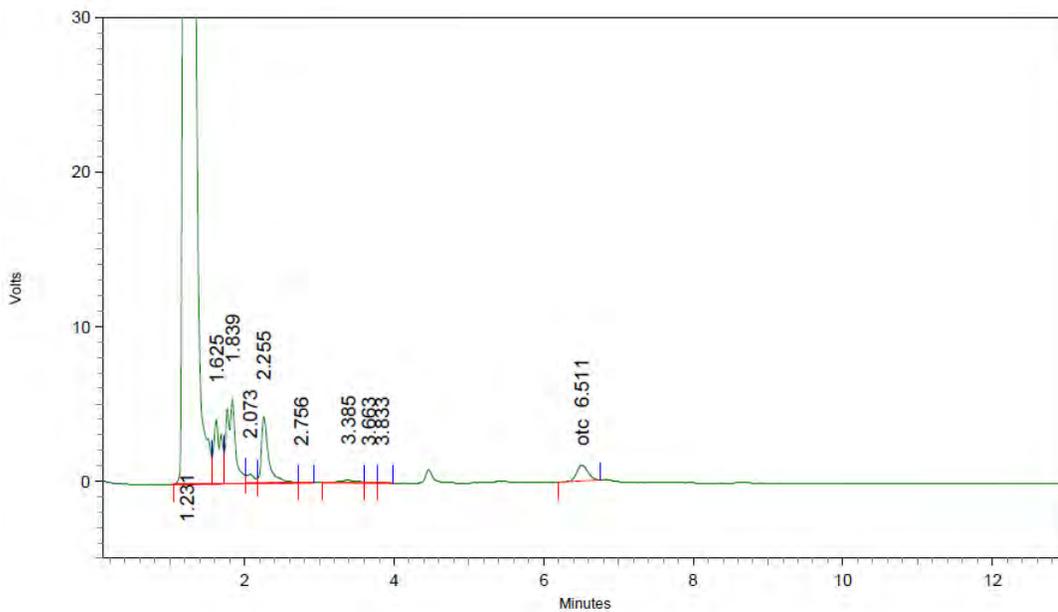


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.468	13293	8900.33



C-35 OTC 18-Enero-2016

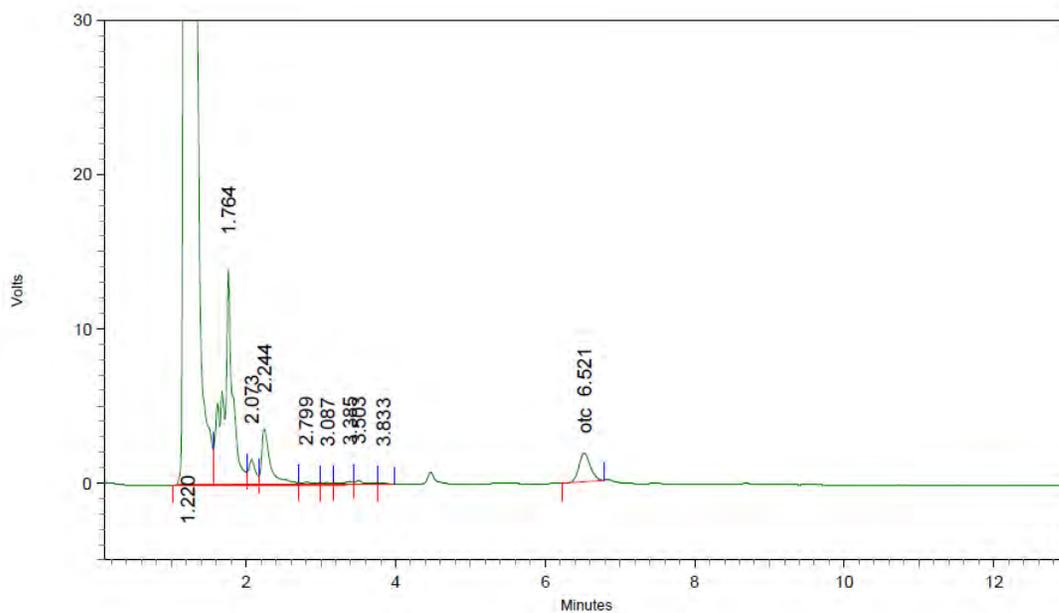


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.511	10852	8309.24



C-36 OTC 18-Enero-2016

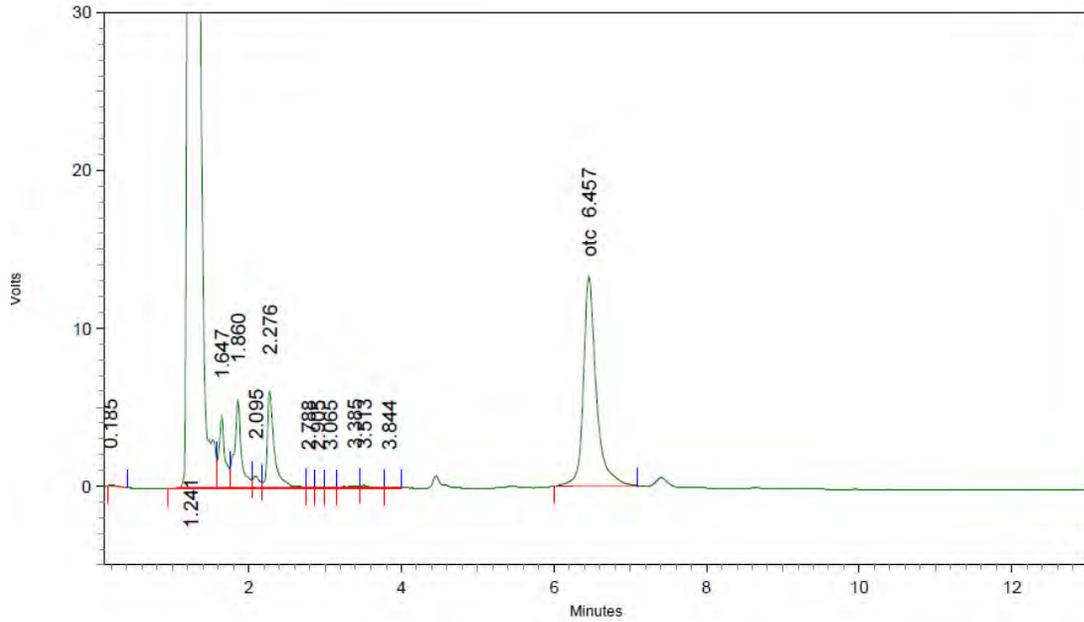


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.521	19508	8367.89



C-37 OTC 18-Enero-2016

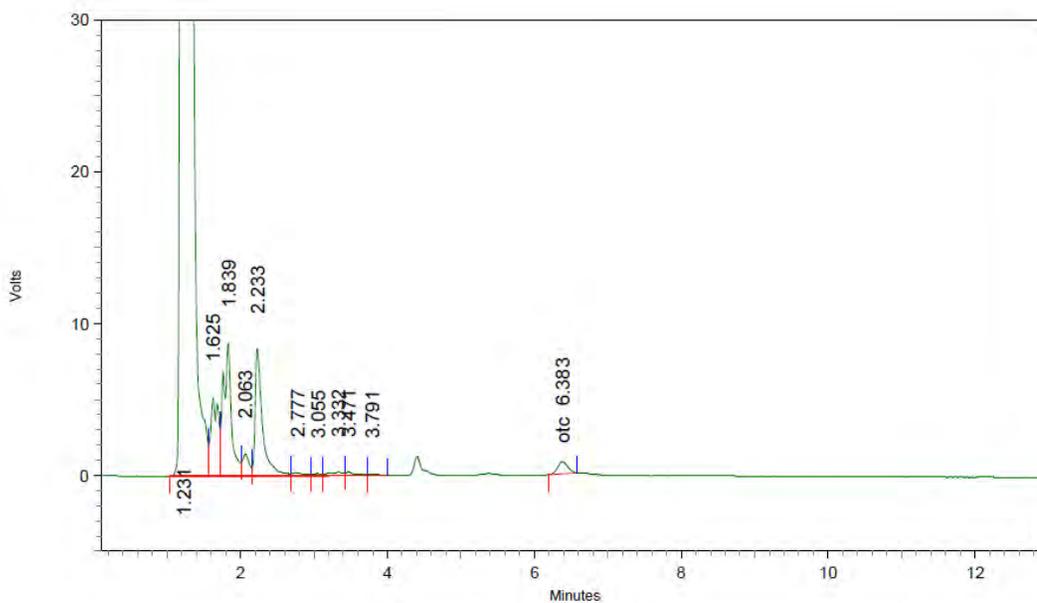


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.457	156075	8524.90



C-38 OTC 18-Enero-2016

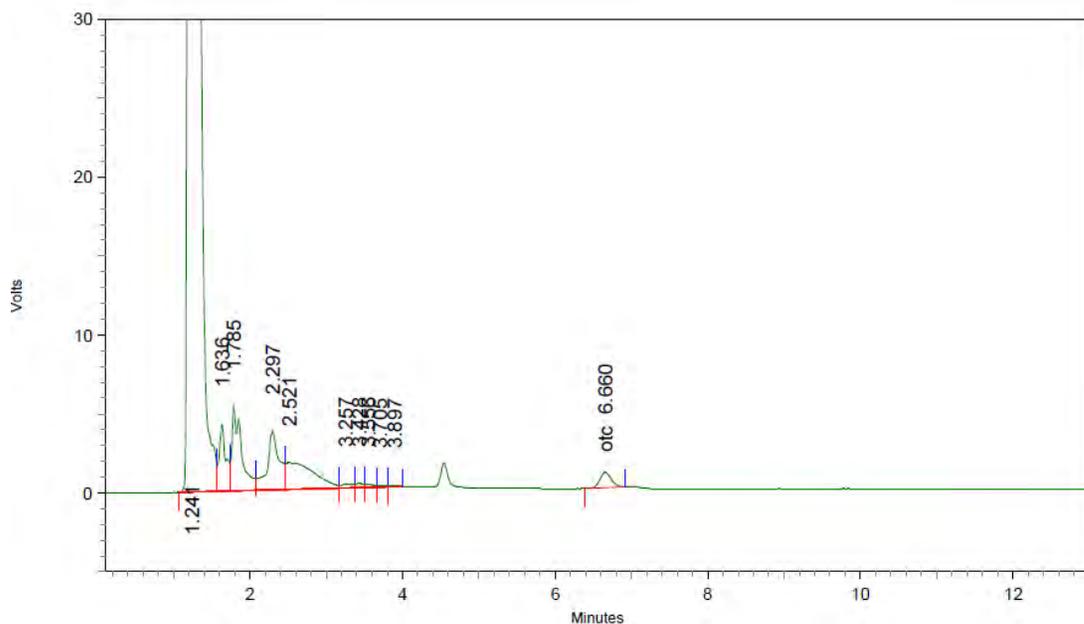


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.383	7721	9364.92



A39 OTC 11-Enero-2016

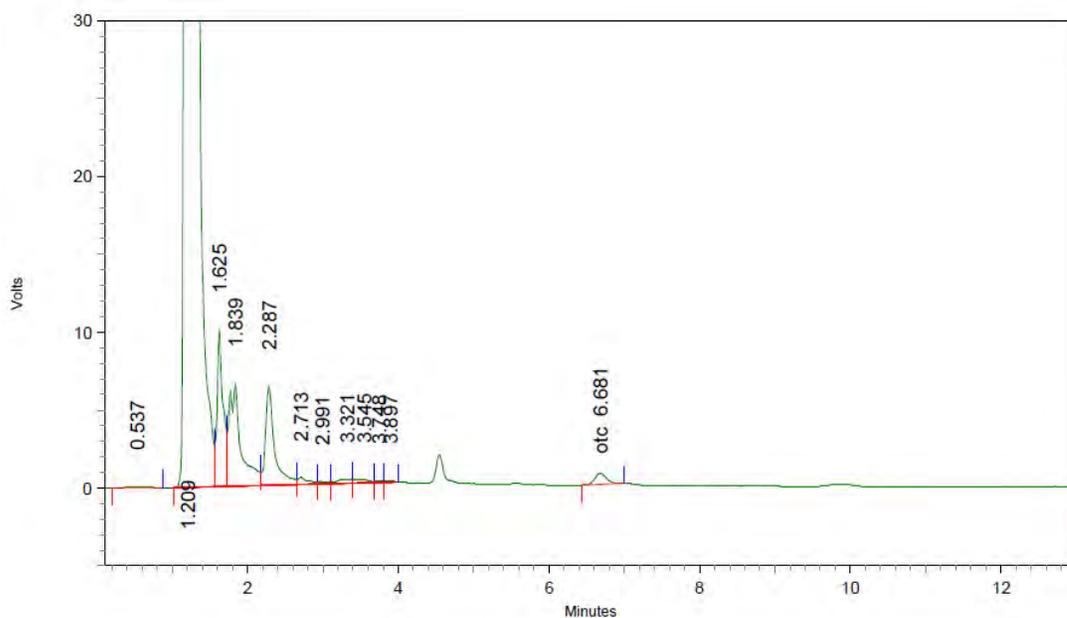


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.660	10158	9131.66



A40 OTC 11-Enero-2016

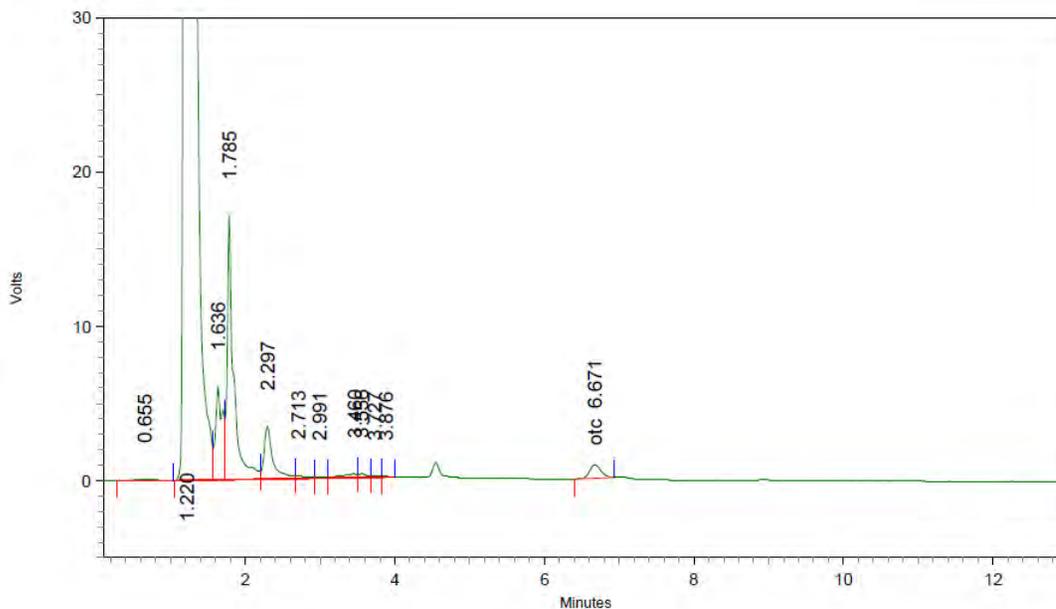


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.681	7833	9014.02



A41 OTC 11-Enero-2016

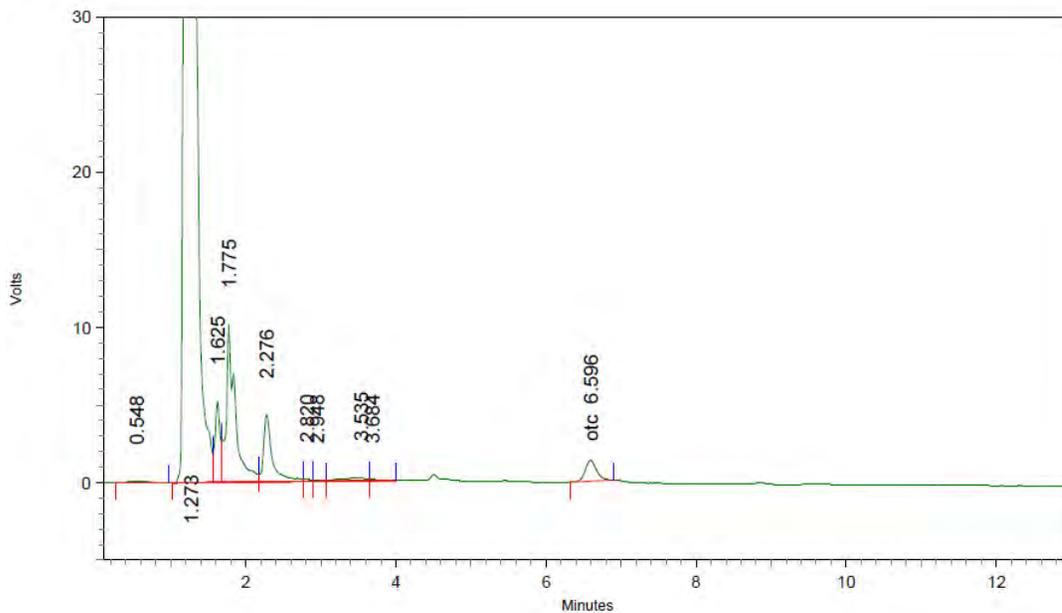


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.671	9271	8928.87



A42 OTC 11-Enero-2016

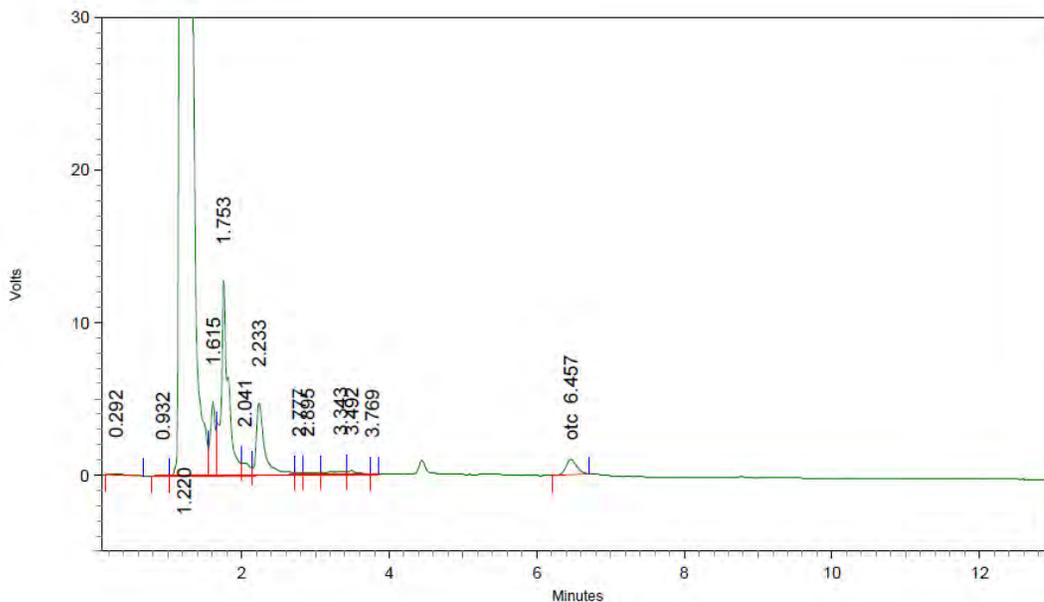


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.596	13846	8954.97



A43 OTC 11-Enero-2016

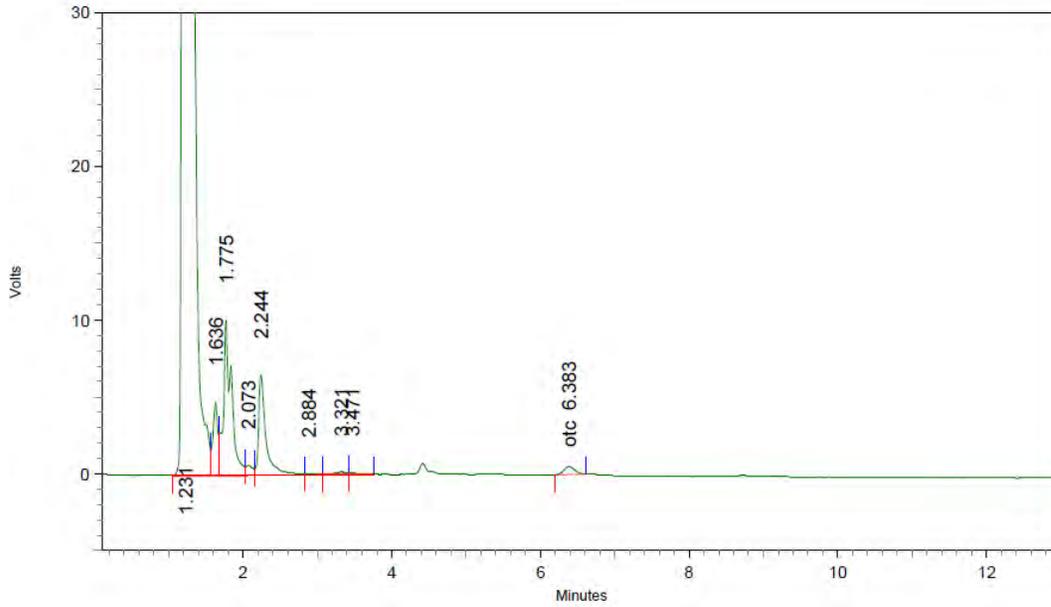


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.457	10270	8591.28



B39 OTC 11-Enero-2016

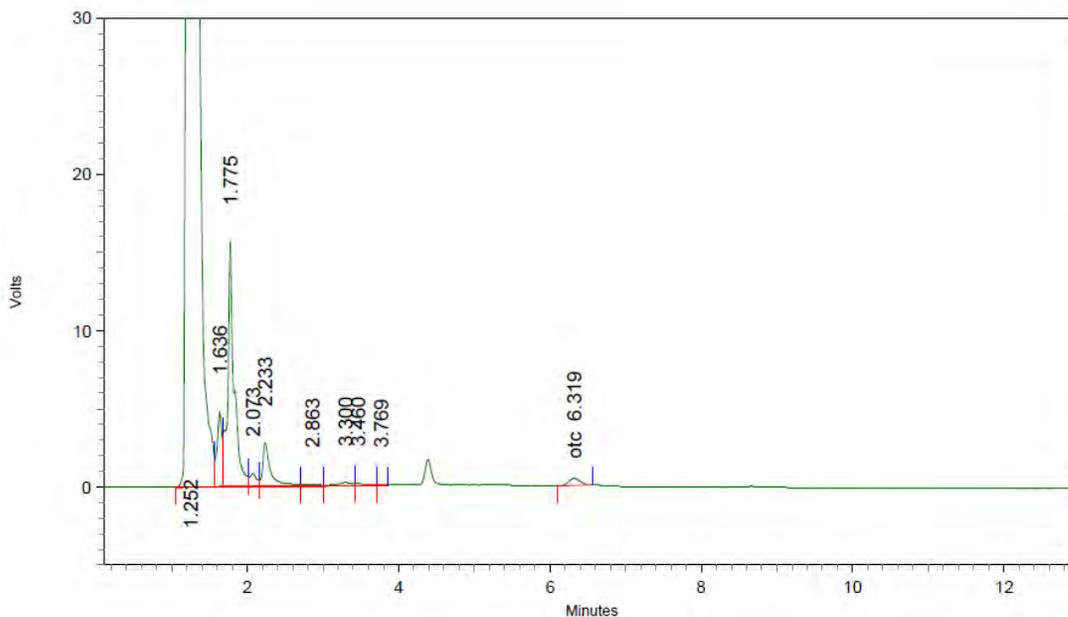


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.383	5041	9062.49



B40 OTC 11-Enero-2016

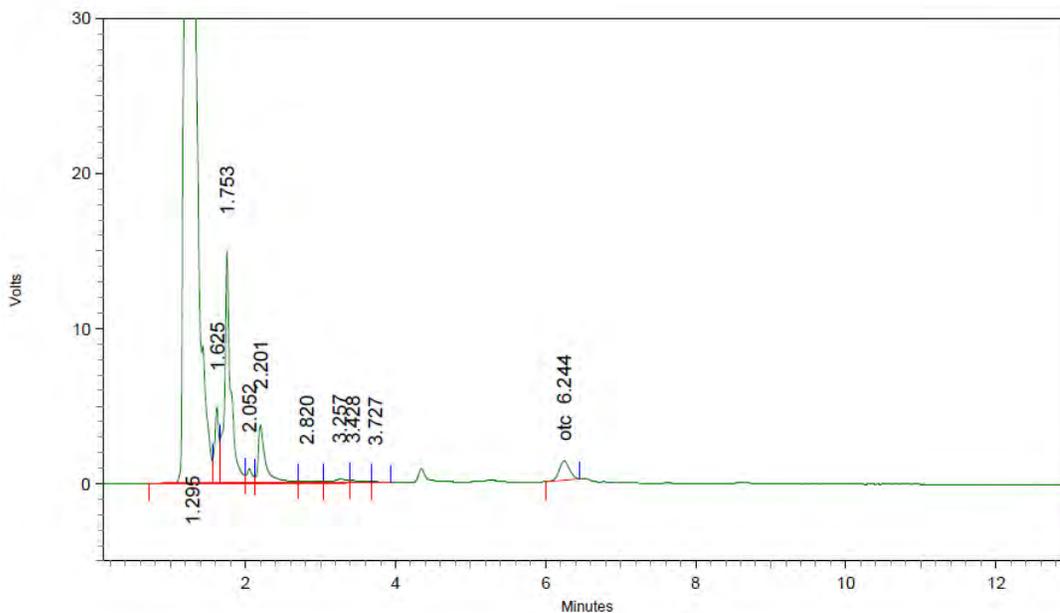


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.319	4851	8269.61



B41 OTC 11-Enero-2016

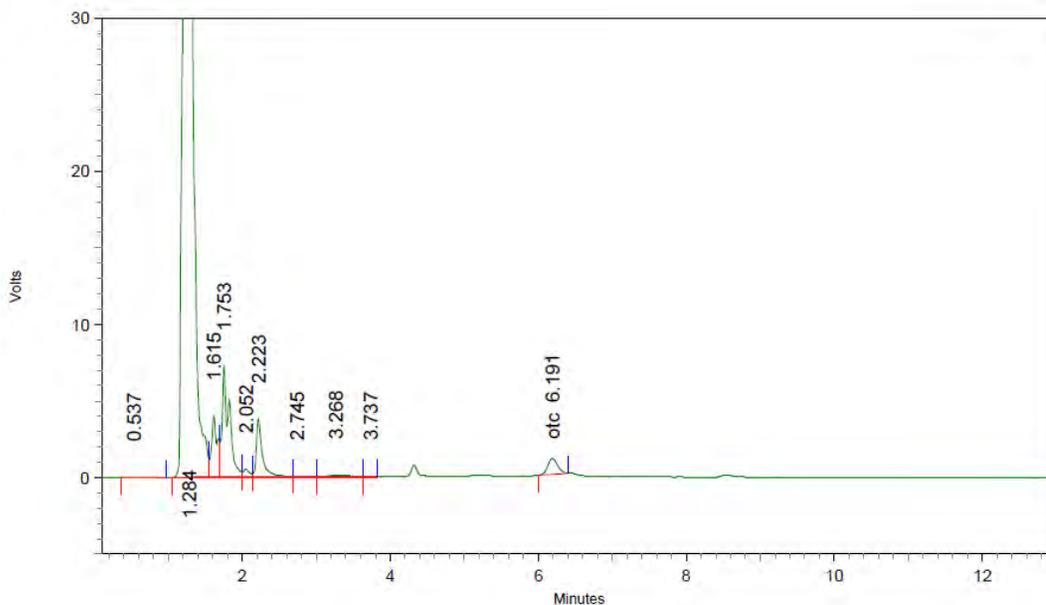


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.244	11822	9436.69



B42 OTC 11-Enero-2016

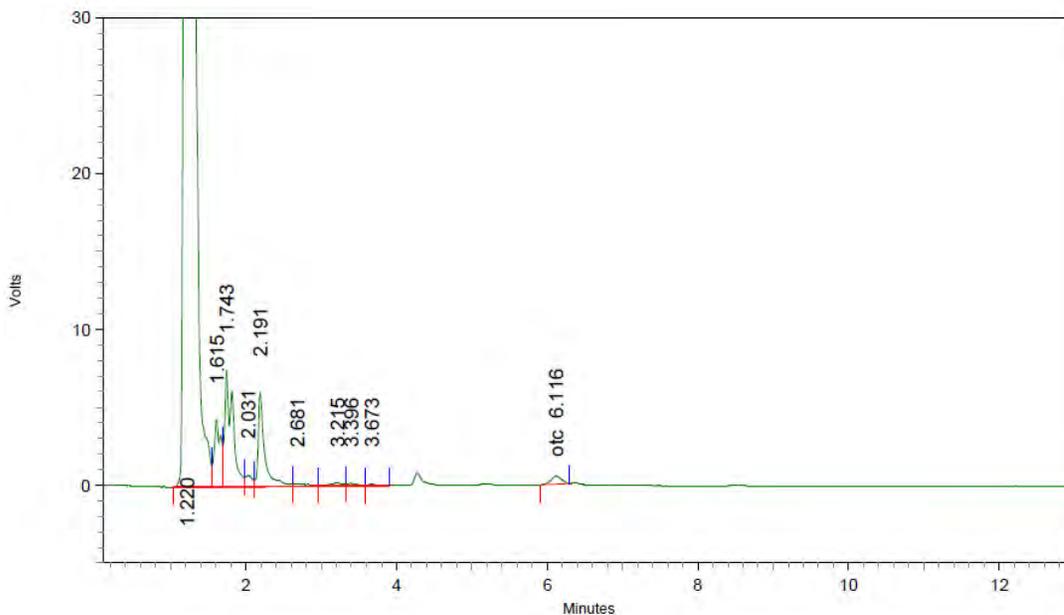


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.191	9630	9513.12



B43 OTC 11-Enero-2016

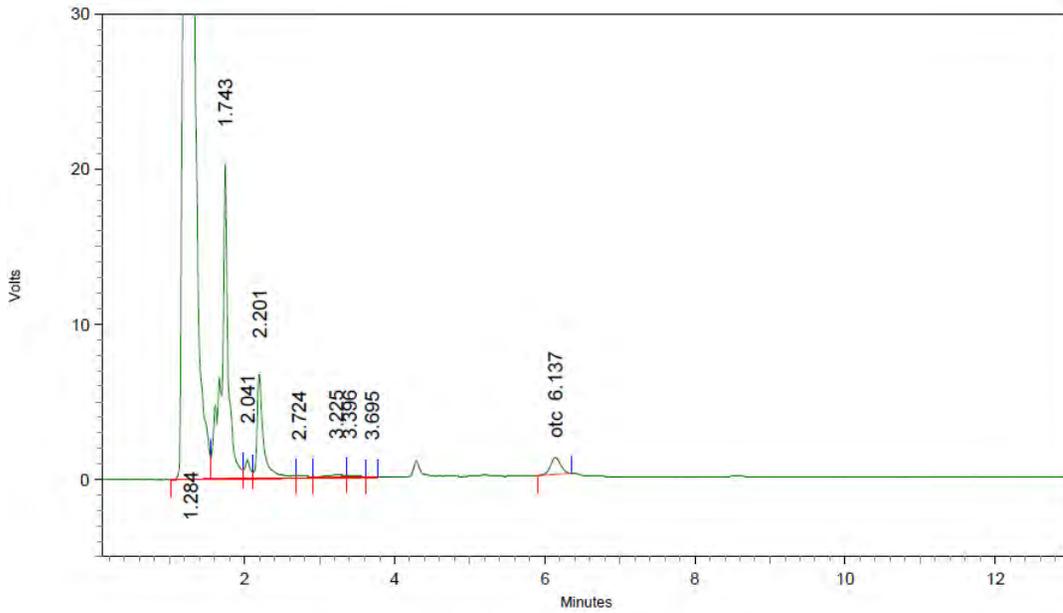


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.116	5032	8662.32



C39 OTC 11-Enero-2016

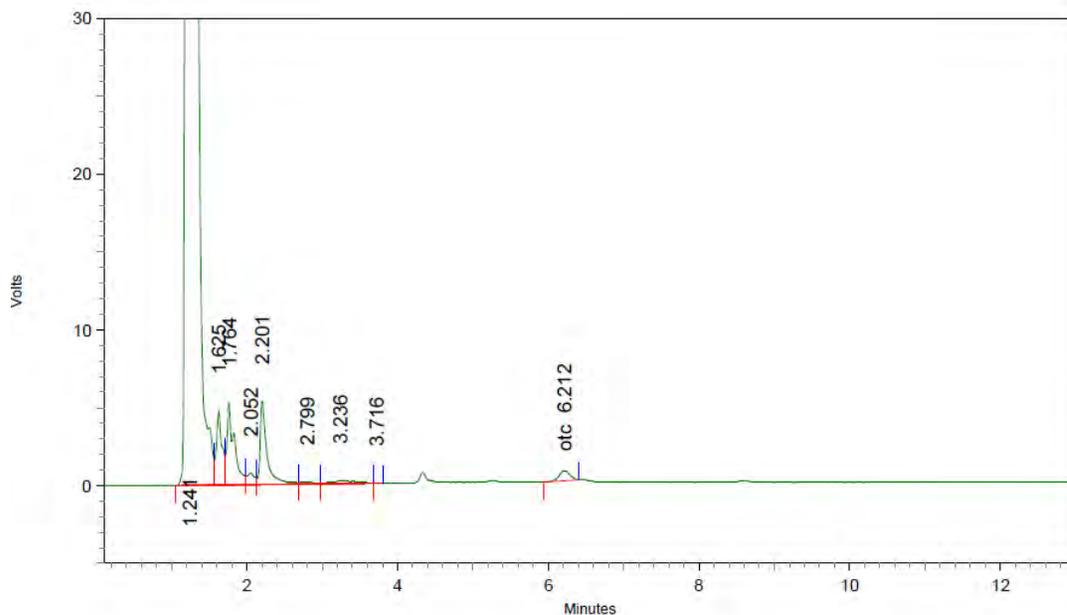


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.137	10313	8800.27



C40 OTC 11-Enero-2016

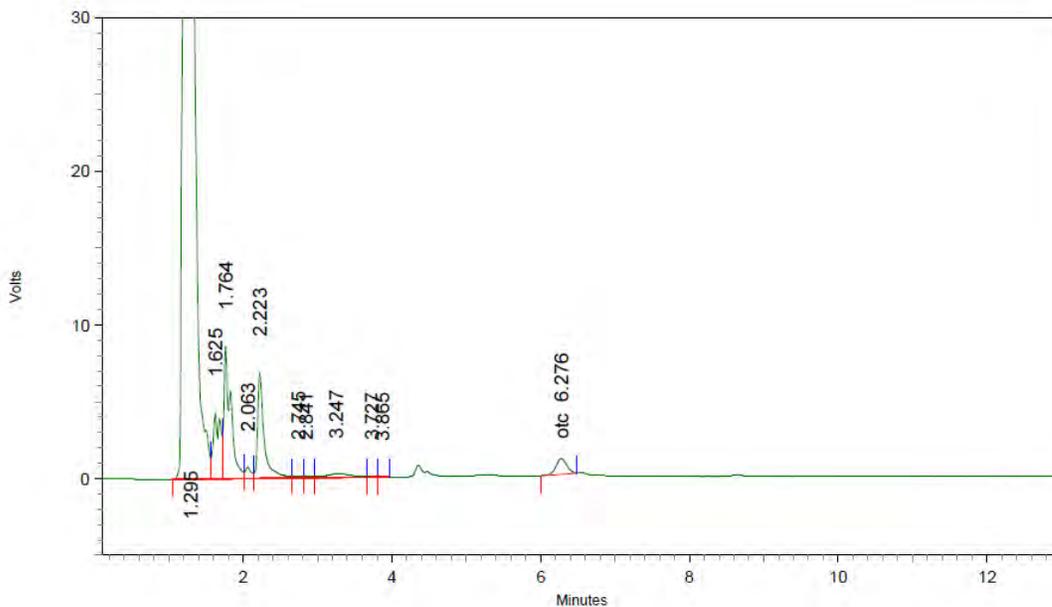


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.212	6327	8734.11



C41 OTC 11-Enero-2016

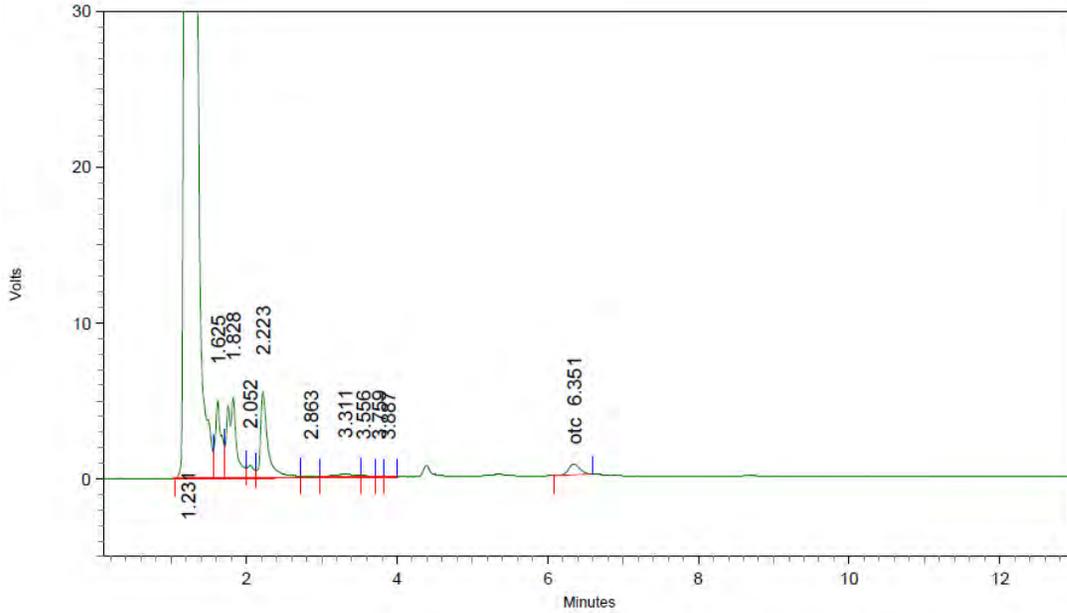


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.276	10178	8818.45



C42 OTC 11-Enero-2016

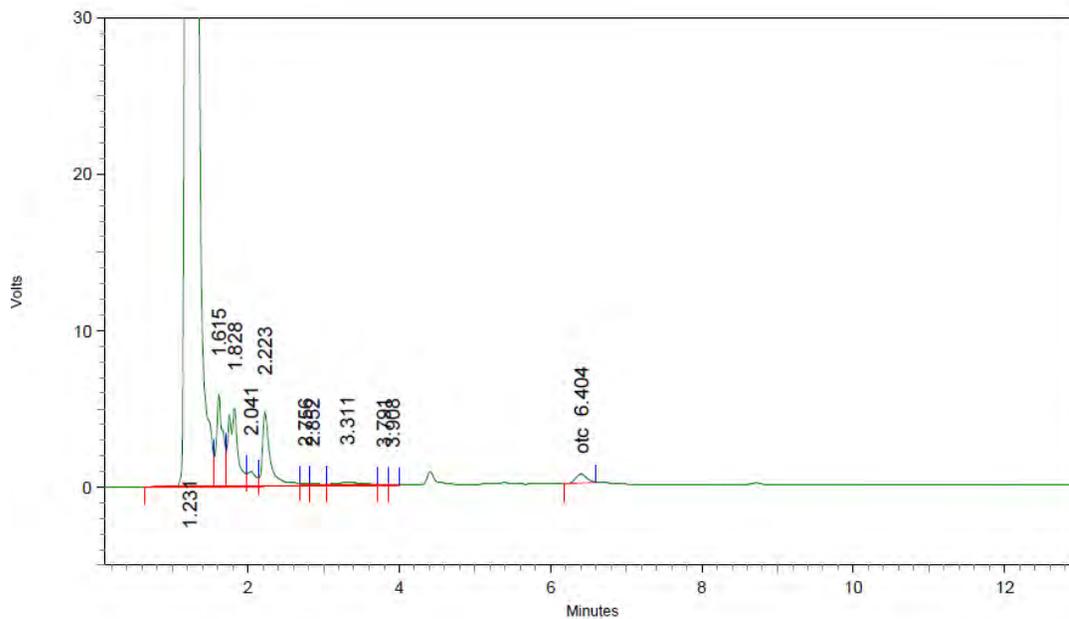


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.351	7365	8364.08



C43 OTC 11-Enero-2016



2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.404	5741	8961.76



Anexo 8.3. Resultados de OTC en piel-músculo de Coho para el cálculo de la curva de depleci3n de Magnadur en condiciones controladas.

Fecha análisis	Nº Mx	Días Post inyecci3n	área	Conc obtenida ng/g
23/03/2016	D-1	32	39.607	310,9
23/03/2016	D-2	32	33.976	271,7
23/03/2016	D-3	32	114.833	900,8
23/03/2016	D-4	32	22.547	169,9
23/03/2016	D-5	32	63.740	487,5
23/03/2016	E-1	32	99.619	782,7
23/03/2016	E-2	32	24.879	196,3
23/03/2016	E-3	32	160.770	1242,8
23/03/2016	E-4	32	55.093	433,4
23/03/2016	E-5	32	18.641	141,7
23/03/2016	F-1	32	179.640	1416,2
23/03/2016	F-2	32	89.743	692,7
23/03/2016	F-3	32	124.670	966,9
23/03/2016	F-4	32	83.047	654,6
23/03/2016	F-5	32	72.101	552,8
30/03/2016	D-6	39	30.981	234,8
30/03/2016	D-7	39	45.617	359,2
30/03/2016	D-8	39	171.737	1325,2
30/03/2016	D-9	39	40.292	304,4
30/03/2016	D-10	39	121.736	929,8
30/03/2016	E-6	39	114.563	883,2
30/03/2016	E-7	39	108.956	873,3
30/03/2016	E-8	39	10.593	79,6
30/03/2016	E-9	39	46.745	356,9
30/03/2016	E-10	39	43.986	335,7
07/04/2016	F-6	39	51.231	399,7
07/04/2016	F-7	39	64.220	495,0
07/04/2016	F-8	39	73.512	557,3
07/04/2016	F-9	39	28.331	223,9
07/04/2016	F-10	39	31.963	253,4

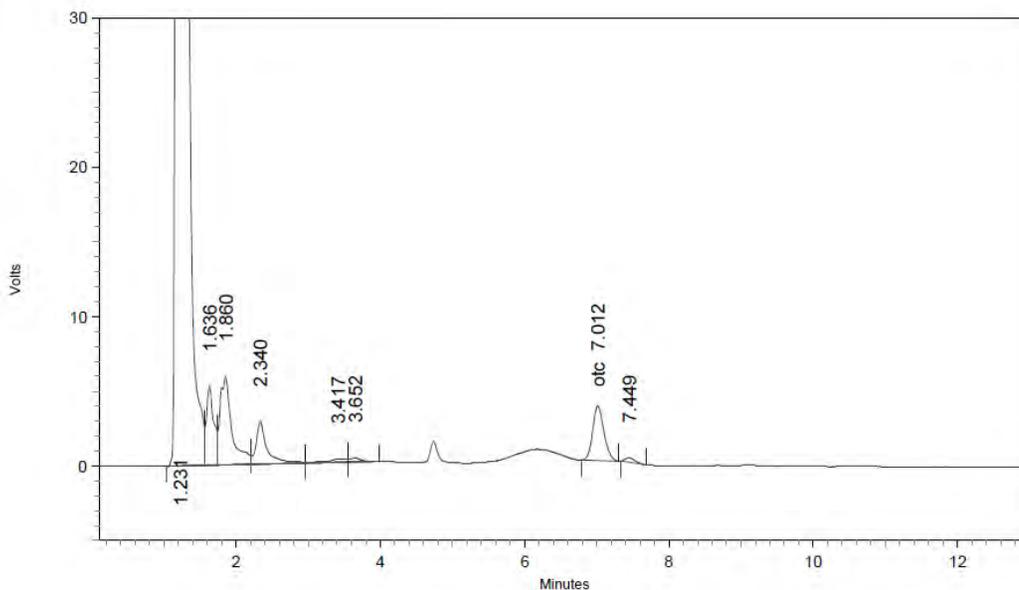


21/04/2016	D11	46	7.481	55,5
21/04/2016	D12	46	24.892	194,5
21/04/2016	D13	46	52.567	413,5
21/04/2016	D14	46	41.329	323,9
21/04/2016	D15	46	17.679	135,5
21/04/2016	E-11	46	32.118	248,2
21/04/2016	E-12	46	22.705	174,8
21/04/2016	E-13	46	30.117	237,2
21/04/2016	E-14	46	31.744	250,6
21/04/2016	E-15	46	40.121	310,1
21/04/2016	F-11	46	55.494	441,8
21/04/2016	F-12	46	33.088	257,3
21/04/2016	F-13	46	22.181	171,0
21/04/2016	F-14	46	43.584	347,8
21/04/2016	F-15	46	70.058	530,0
26/04/2016	D16	53	34.948	274,0
26/04/2016	D17	53	23.522	185,1
26/04/2016	D18	53	18.136	141,3
26/04/2016	D19	53	26.127	198,0
26/04/2016	D20	53	39.047	301,2
26/04/2016	E-16	53	19.444	153,2
26/04/2016	E-17	53	29.814	234,8
26/04/2016	E-18	53	18.315	137,3
26/04/2016	E-19	53	17.922	136,1
26/04/2016	E-20	53	14.770	116,2
28/04/2016	F-16	53	43.167	329,4
28/04/2016	F-17	53	38.338	296,2
28/04/2016	F-18	53	24.606	187,4
28/04/2016	F-19	53	63.588	492,9
28/04/2016	F-20	53	65.021	506,0



Anexo 8.4. Cromatogramas de curva de depleci3n Magnadur coho, condiciones controladas

D-1 OTC 23-marzo-2016

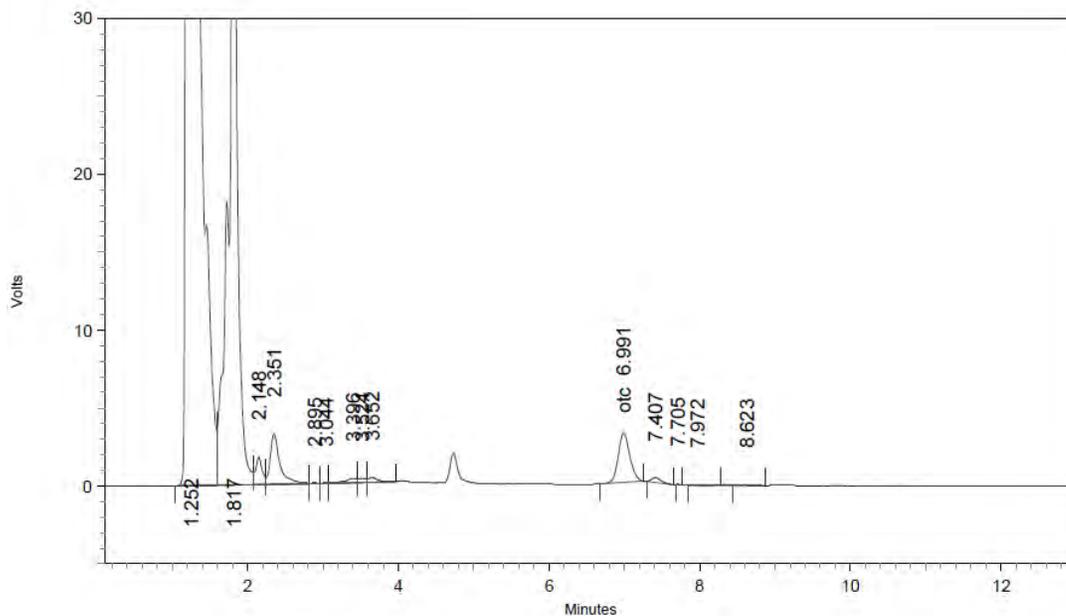


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.012	39607	9450.05



D-2 OTC 23-marzo-2016

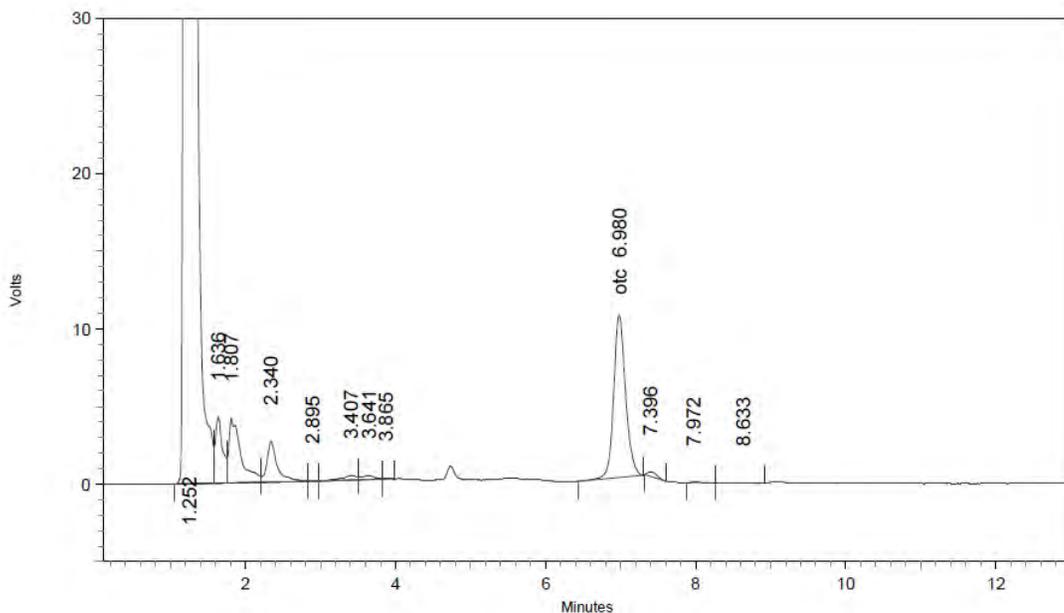


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.991	33976	9502.61



D-3 OTC 23-marzo-2016

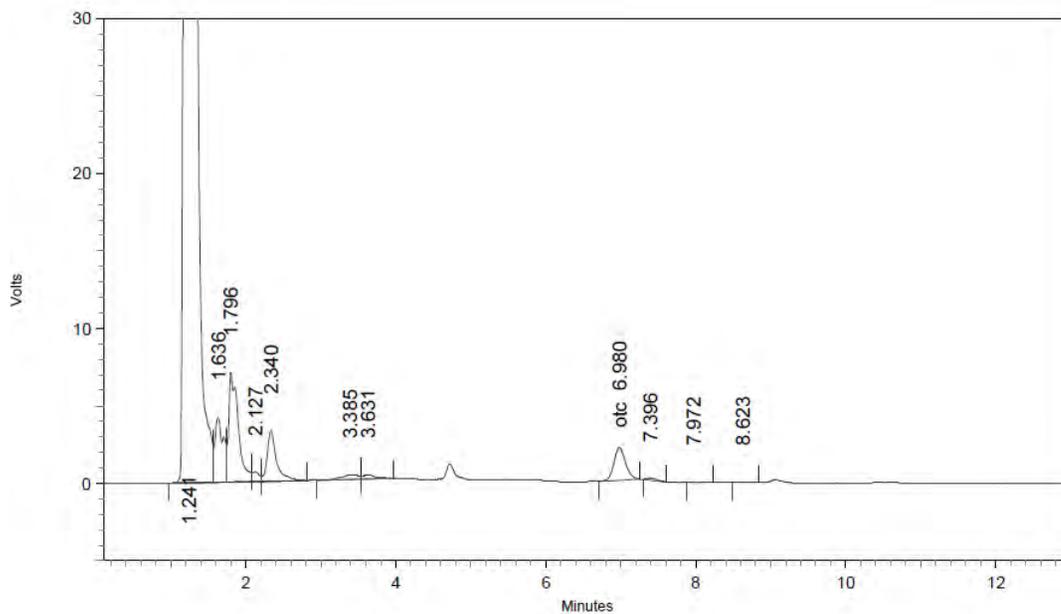


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.980	114833	9375.16



D-4 OTC 23-marzo-2016

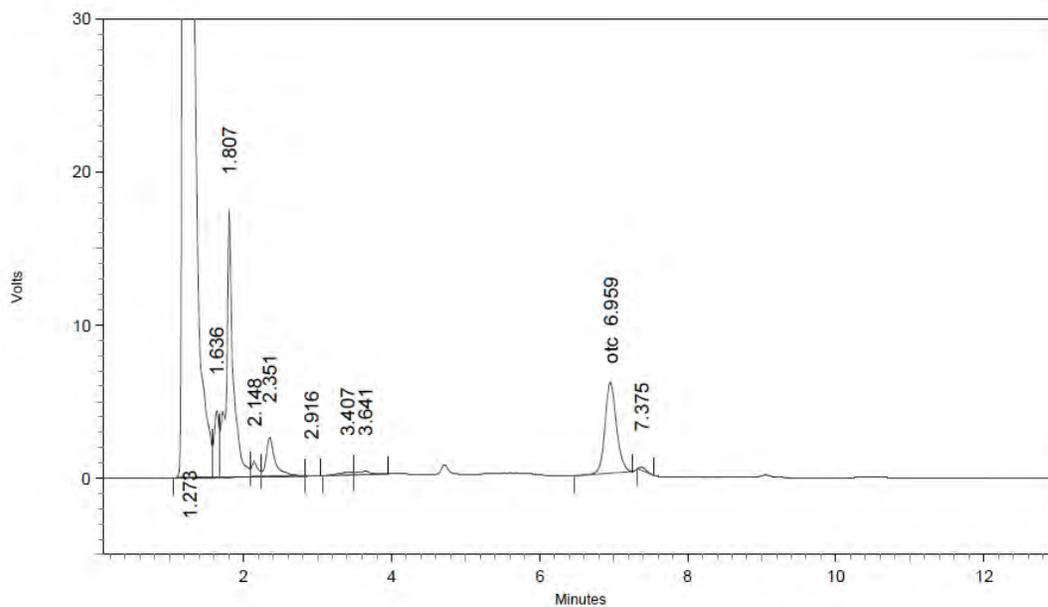


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.980	22547	9514.01



D-5 OTC 23-marzo-2016

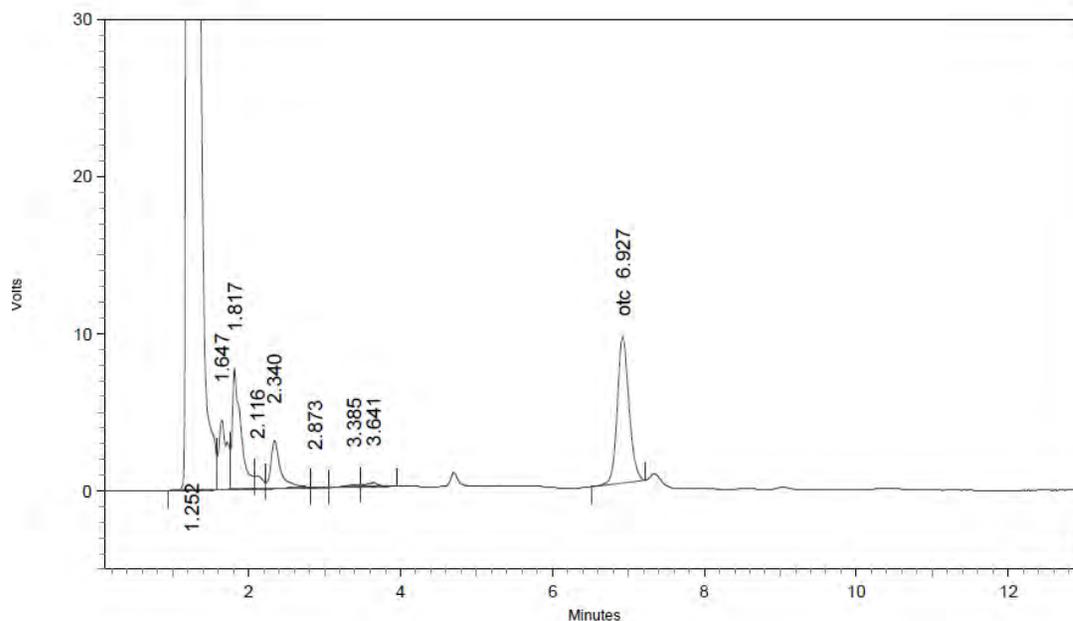


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.959	63740	9799.32



E-1 OTC 23-marzo-2016

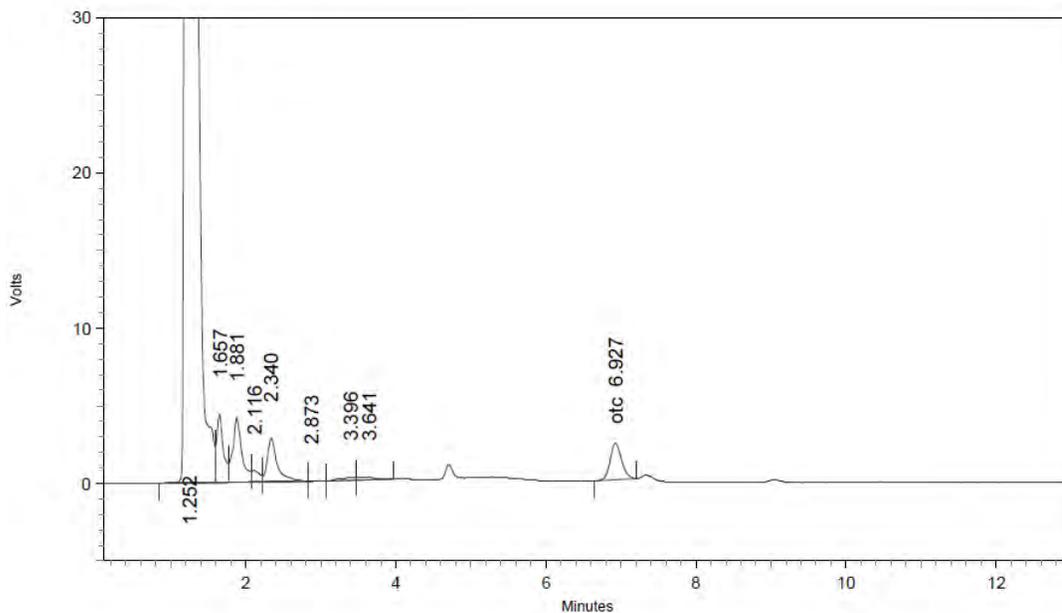


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.927	99619	9457.90



E-2 OTC 23-marzo-2016

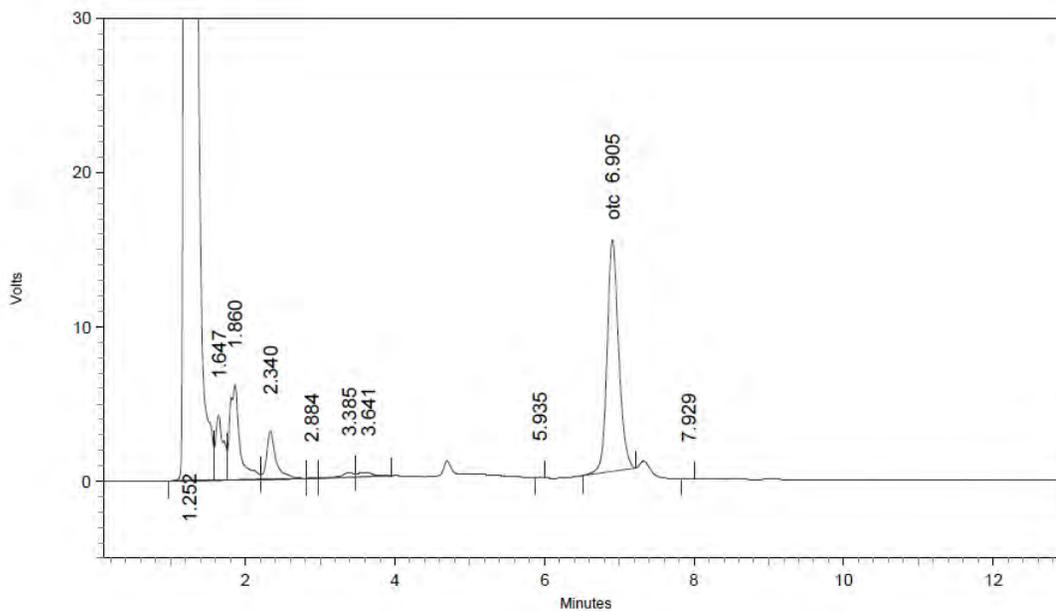


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.927	24879	9551.12



E-3 OTC 23-marzo-2016

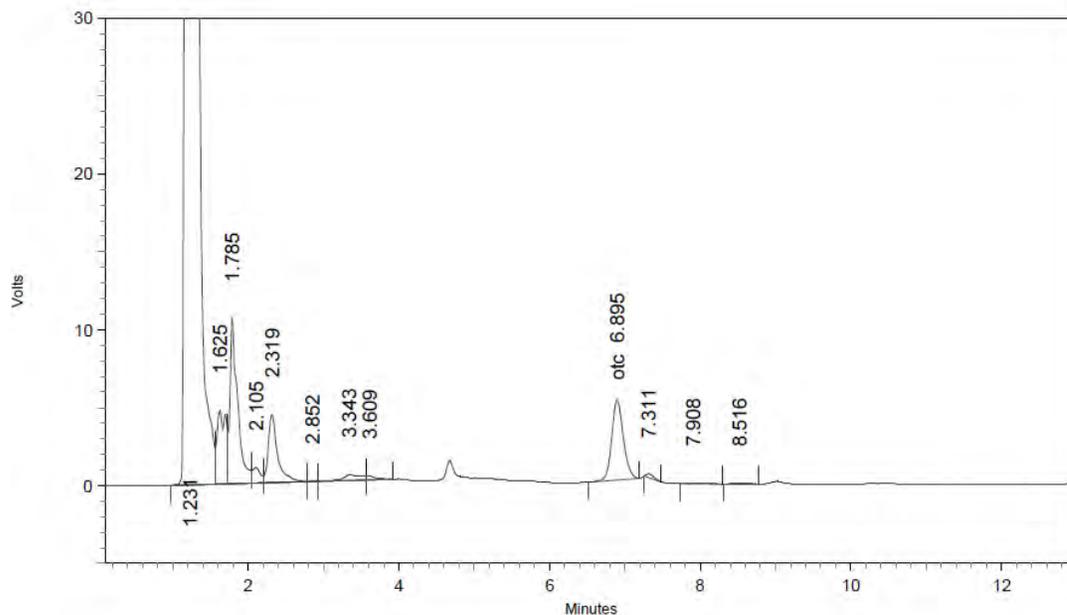


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.905	160770	9566.79



E-4 OTC 23-marzo-2016

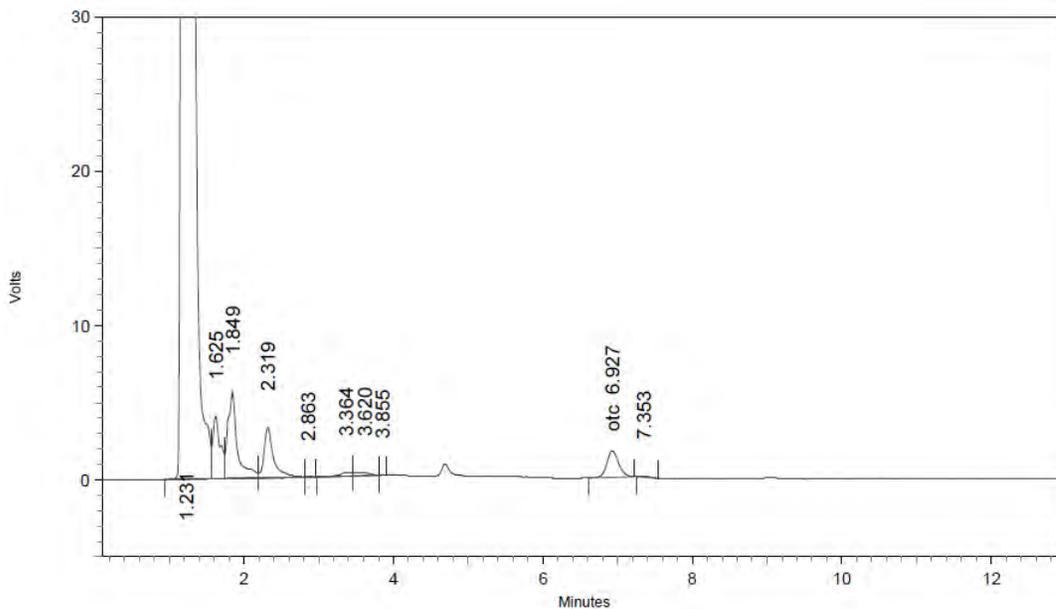


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.895	55093	9386.43



E-5 OTC 23-marzo-2016

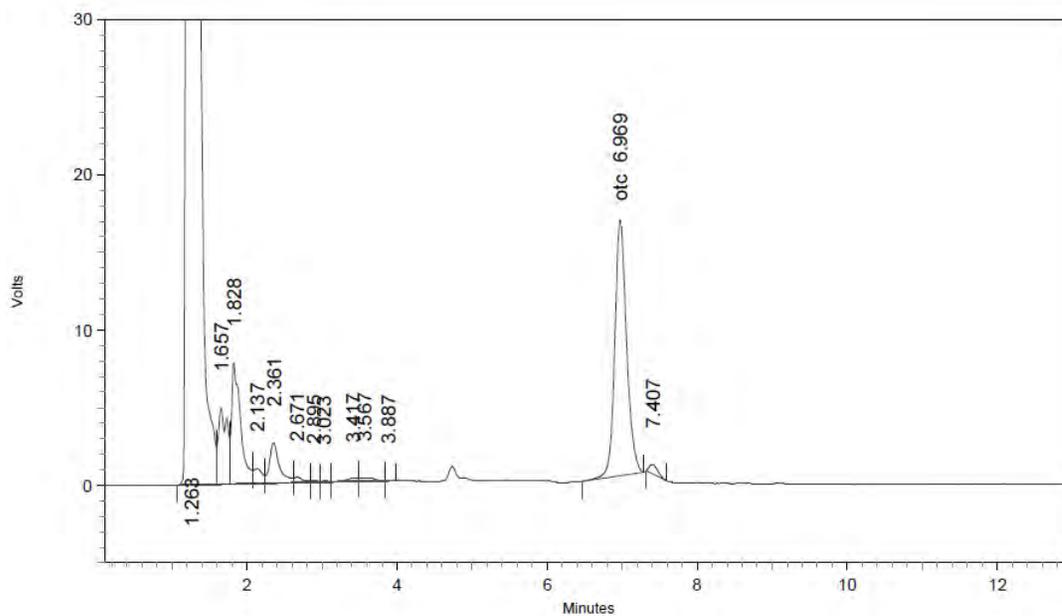


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.927	18641	9137.46



F-1 OTC 23-marzo-2016

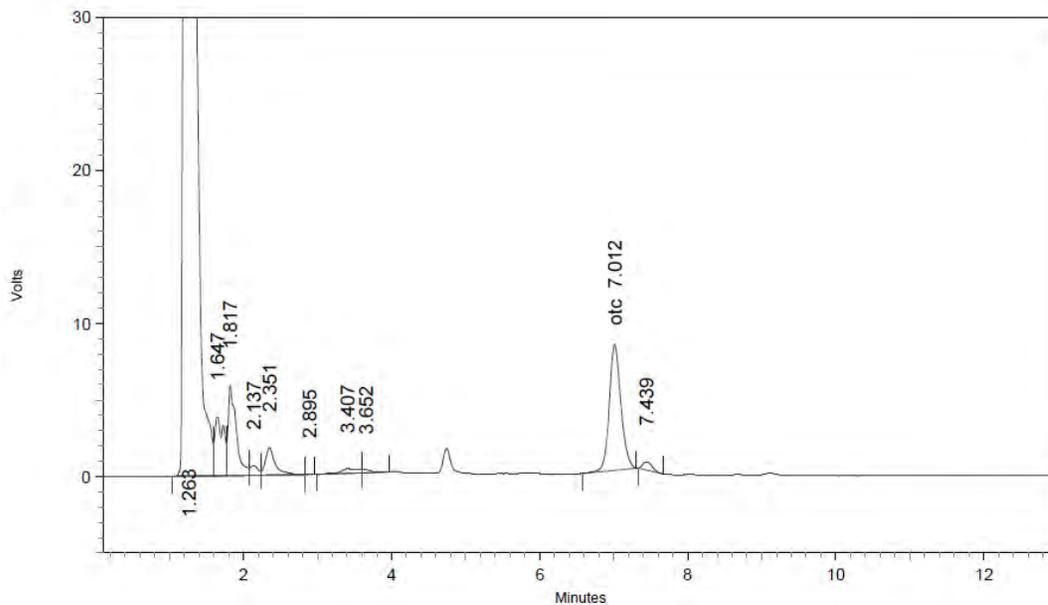


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	6.969	179640	9541.36



F-2 OTC 23-marzo-2016

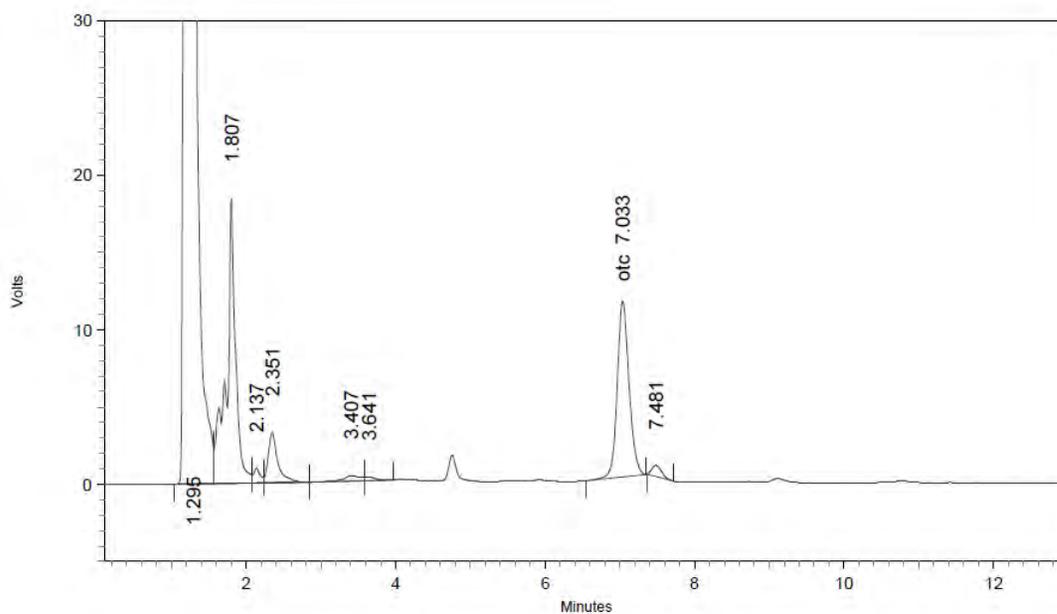


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.012	89743	9433.61



F-3 OTC 23-marzo-2016

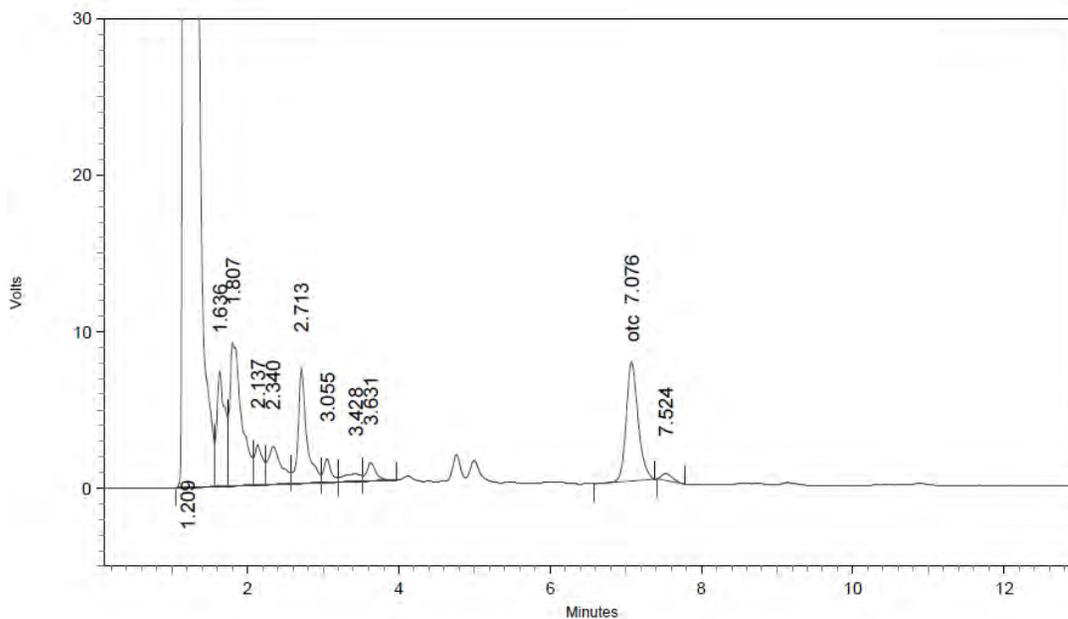


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.033	124670	9678.35



F-4 OTC 23-marzo-2016

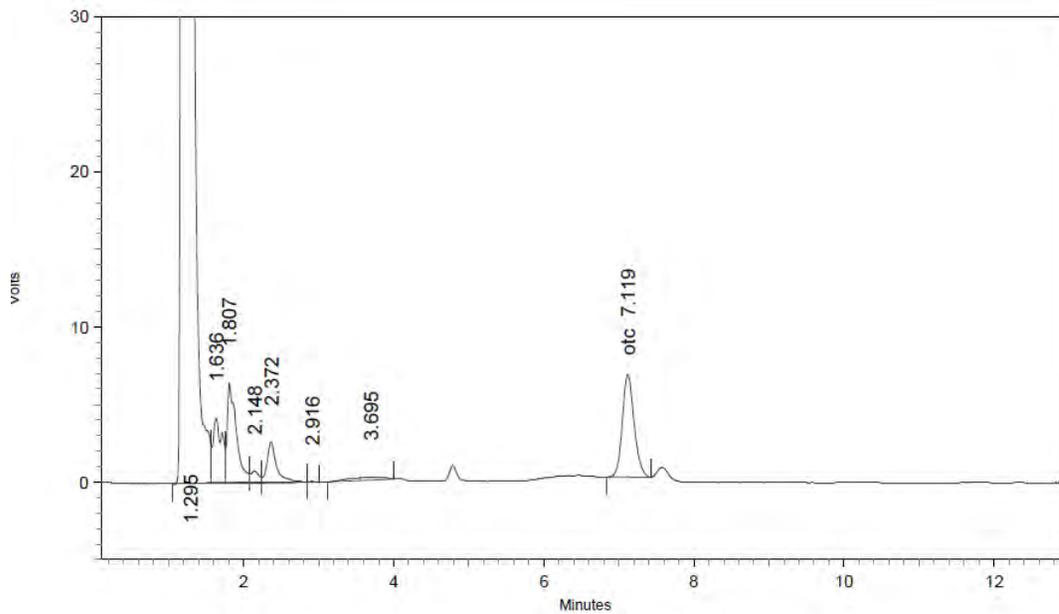


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.076	83047	9602.27



F-5 OTC 23-marzo-2016

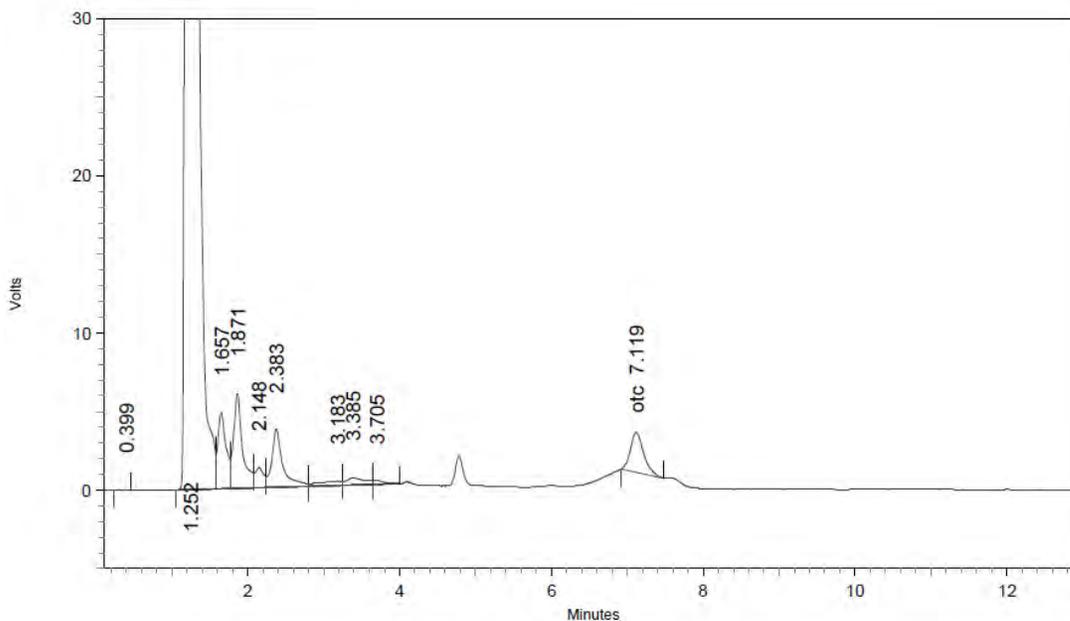


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.119	72101	9588.18



D-6 OTC 30-Marzo-2016

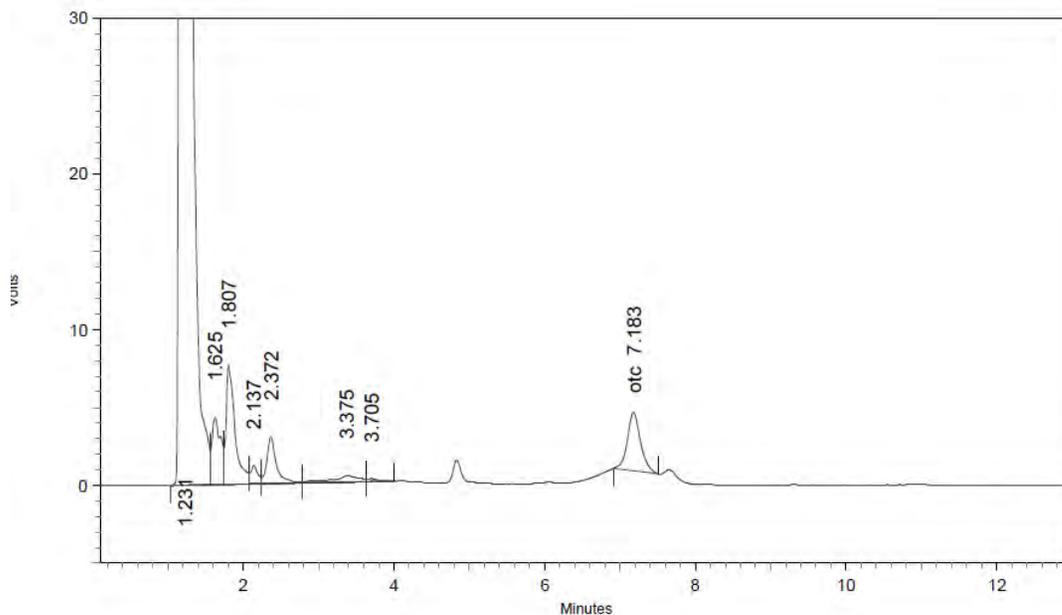


2: 355 mm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.119	30981	7963.22



D-7 OTC 30-Marzo-2016

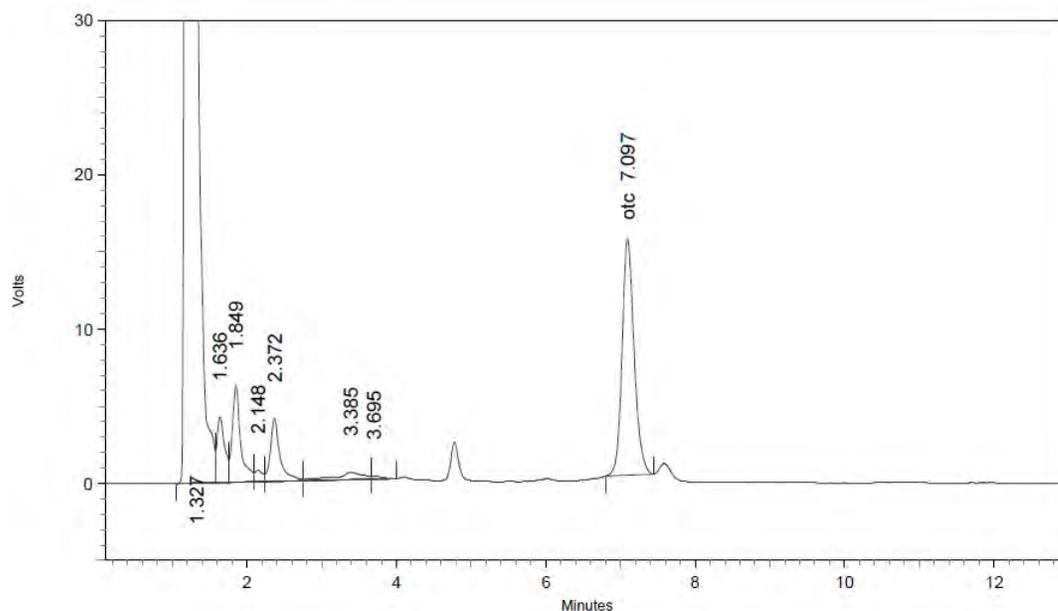


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.183	45617	8226.86



D-8 OTC 30-Marzo-2016

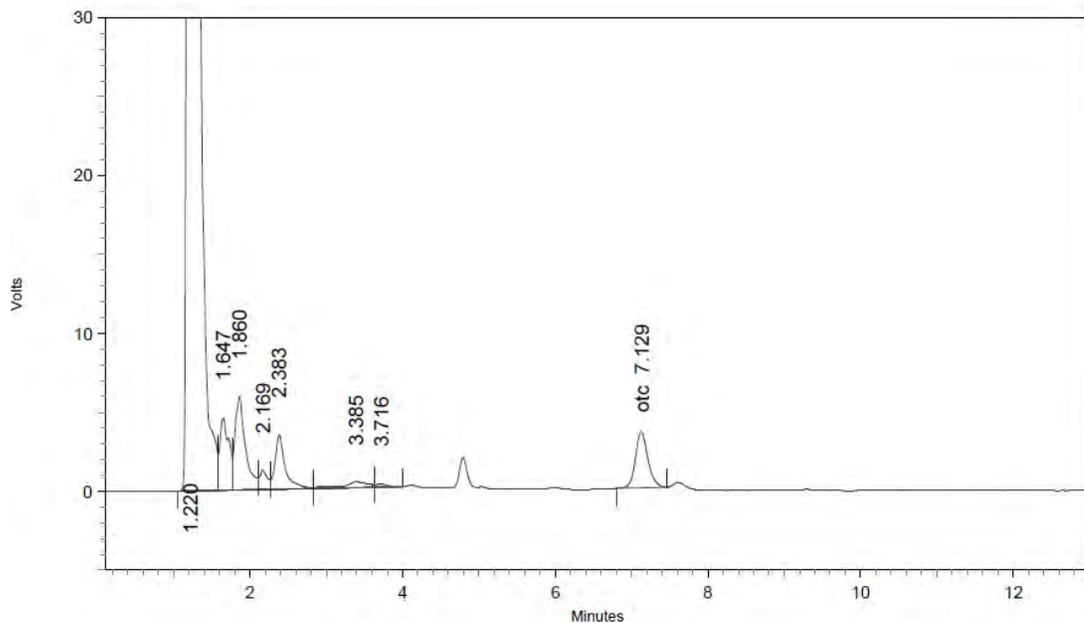


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.097	171737	9140.53



D-9 OTC 30-Marzo-2016

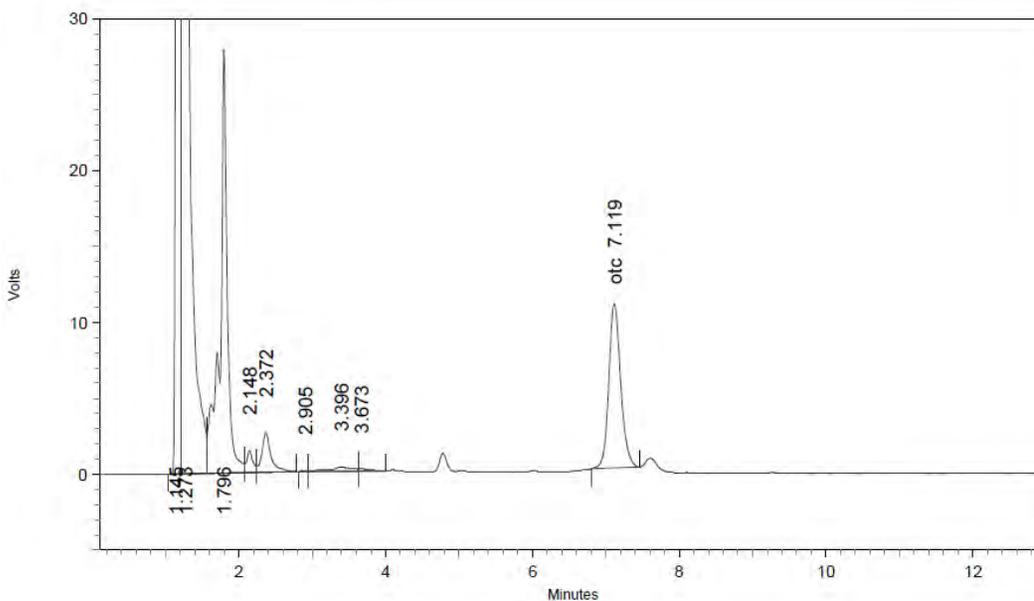


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.129	40292	8950.92



D-10 OTC 30-Marzo-2016

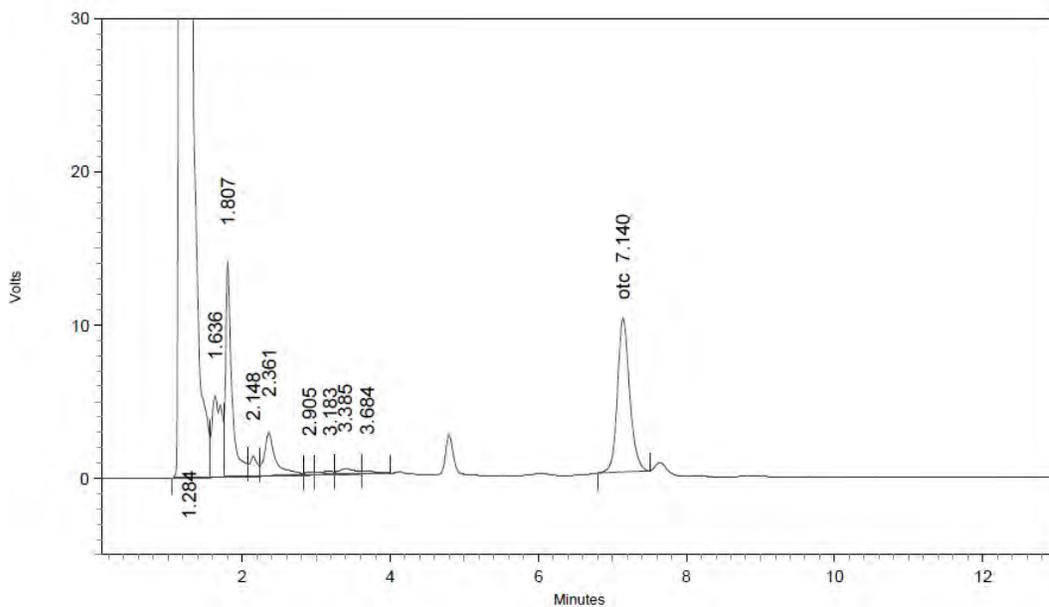


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.119	121736	9170.38



E-6 OTC 30-Marzo-2016

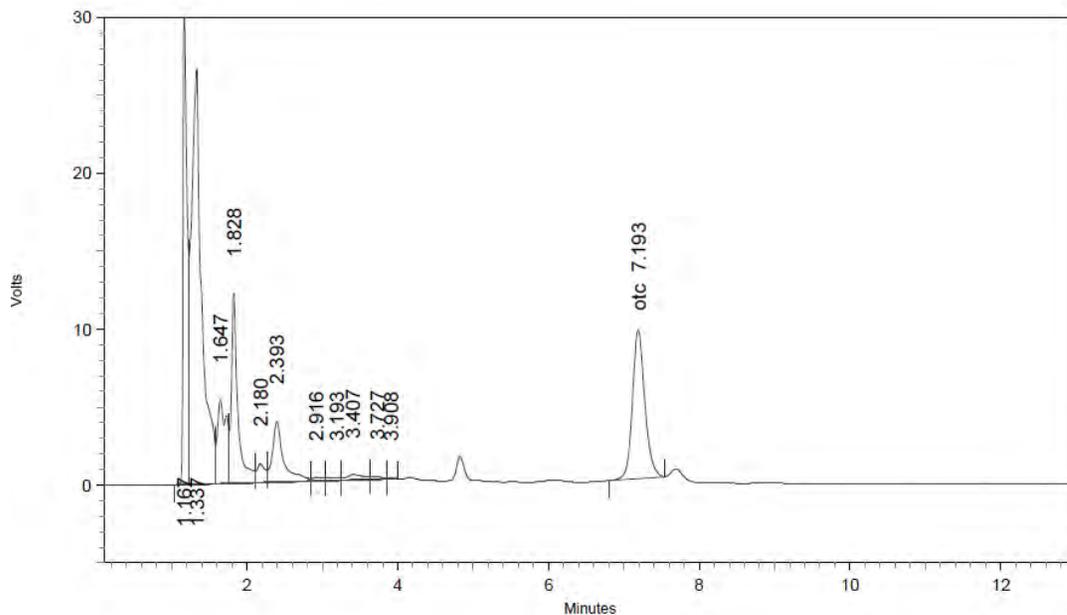


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.140	114563	9196.05



E-7 OTC 30-Marzo-2016

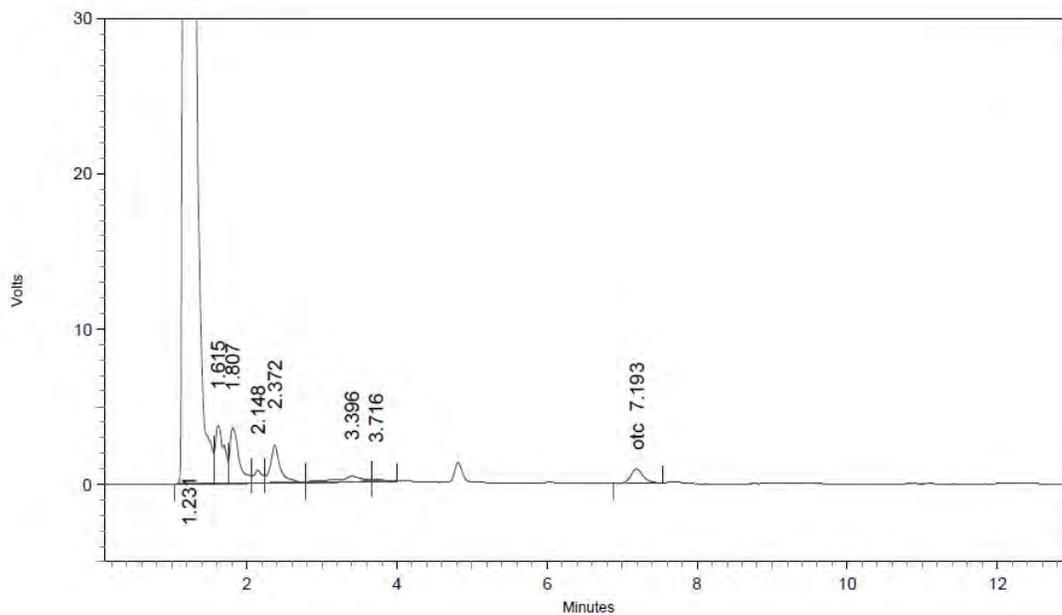


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.193	108956	9184.39



E-8 OTC 30-Marzo-2016

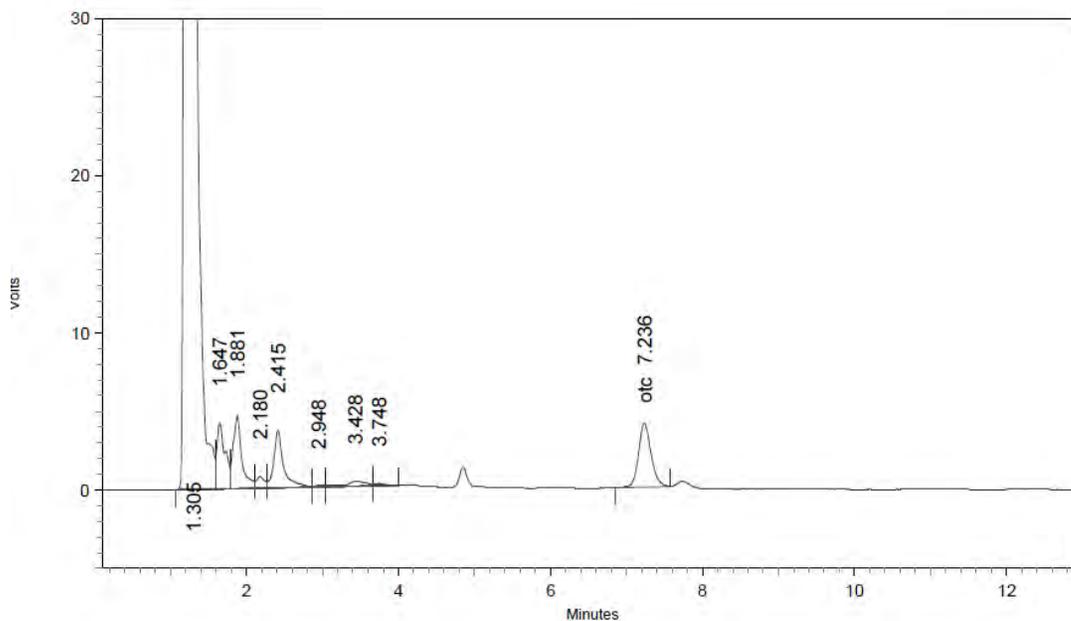


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.193	10593	8944.33



E-9 OTC 30-Marzo-2016

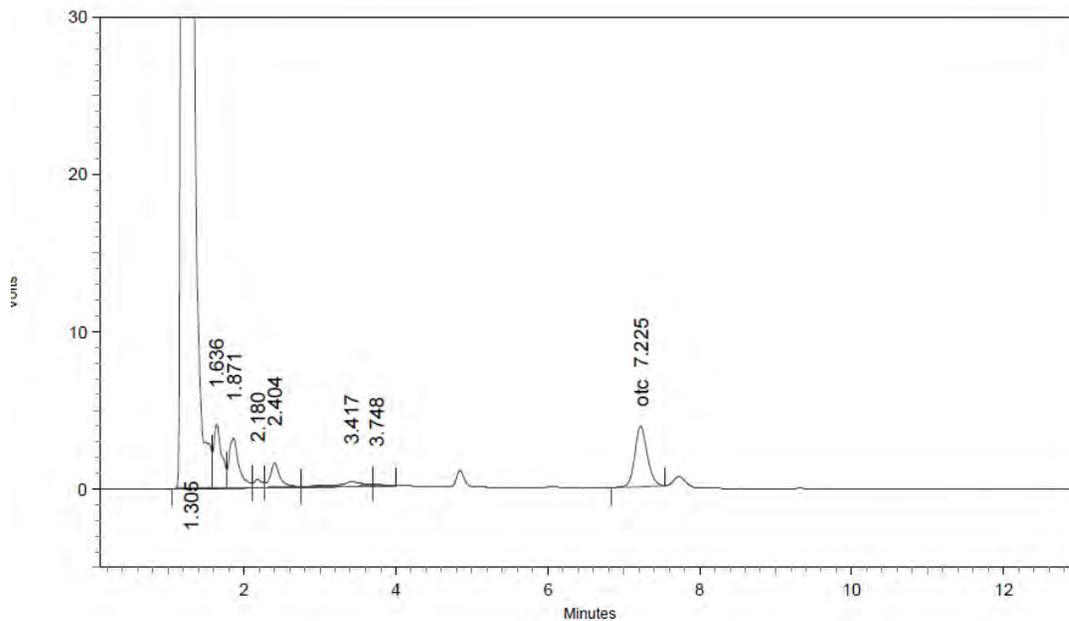


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.236	46745	9138.27



E-10 OTC 30-Marzo-2016

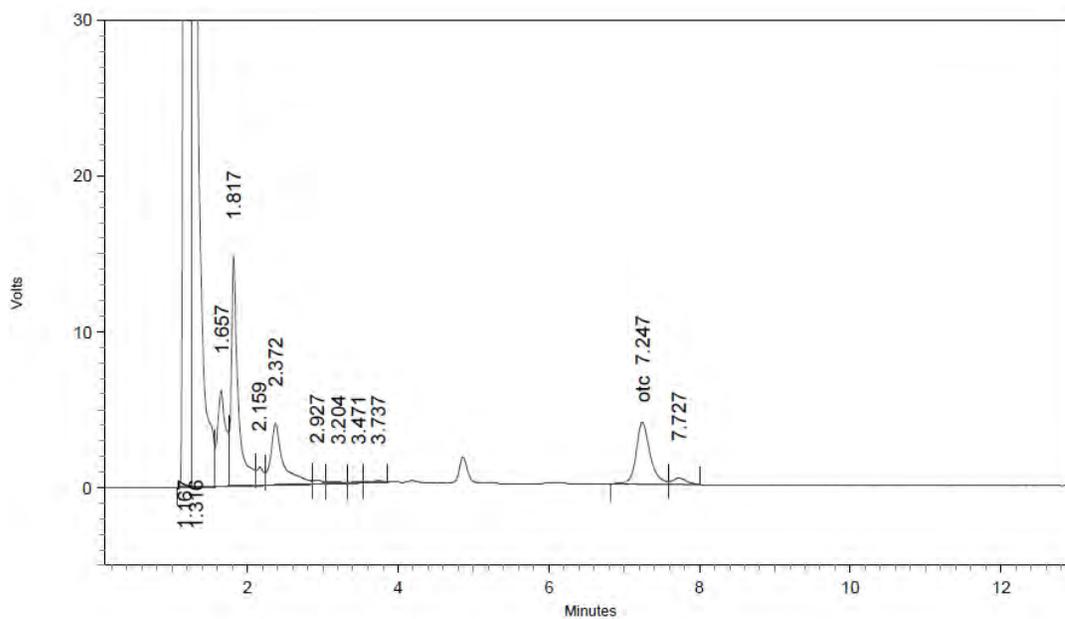


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.225	43986	9162.16



F 6 OTC 7-Abril-2016

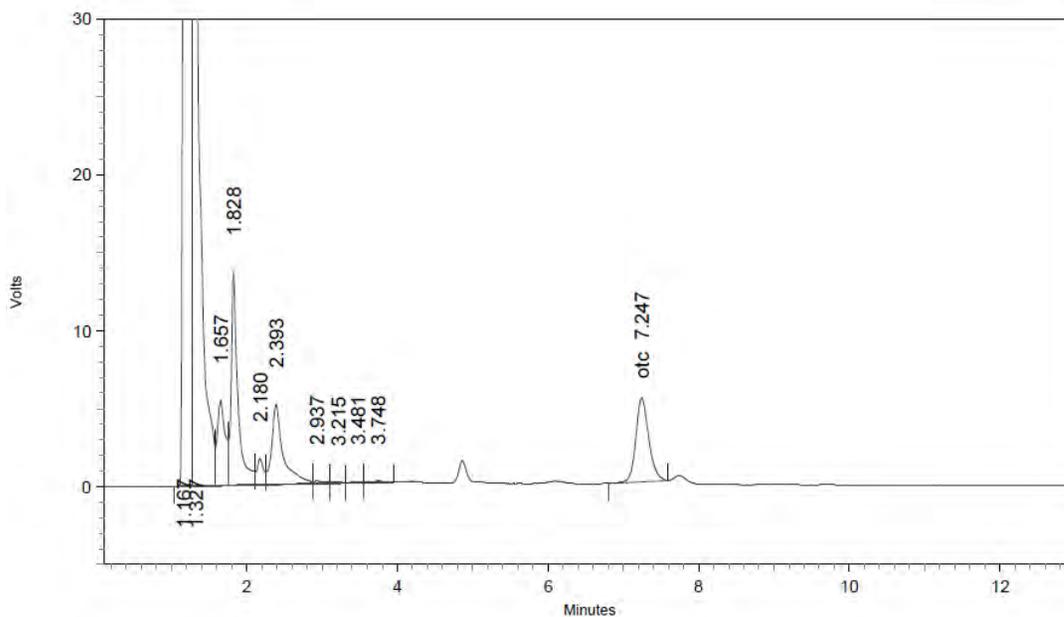


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.247	51231	7953.54



F7 OTC 7-Abril-2016

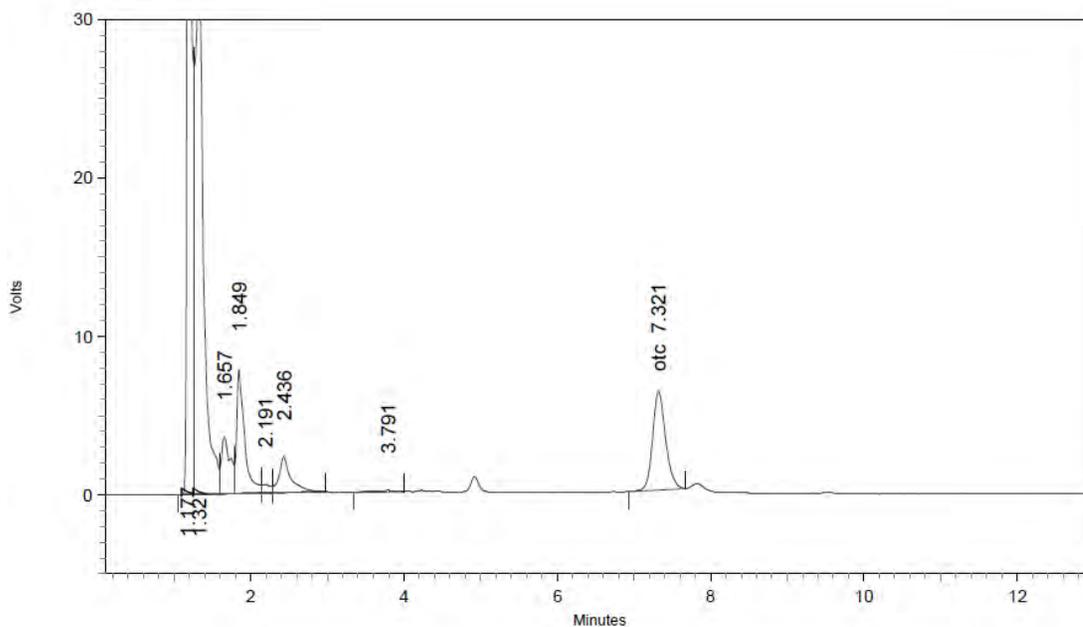


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.247	64220	8593.29



F8 OTC 7-Abril-2016

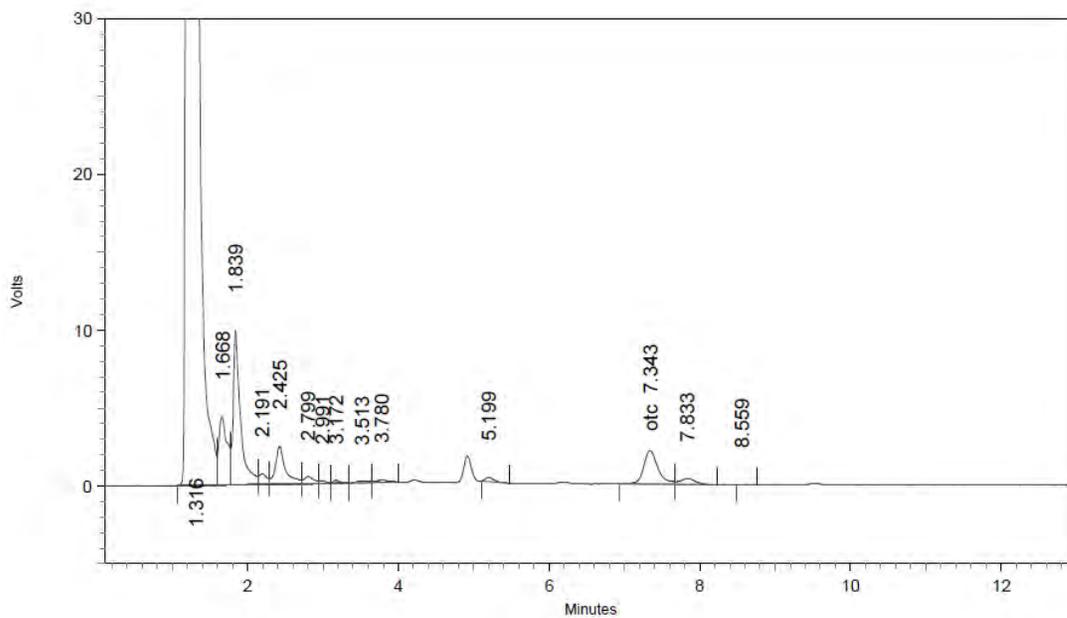


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.321	73512	8916.98



F9 OTC 7-Abril-2016

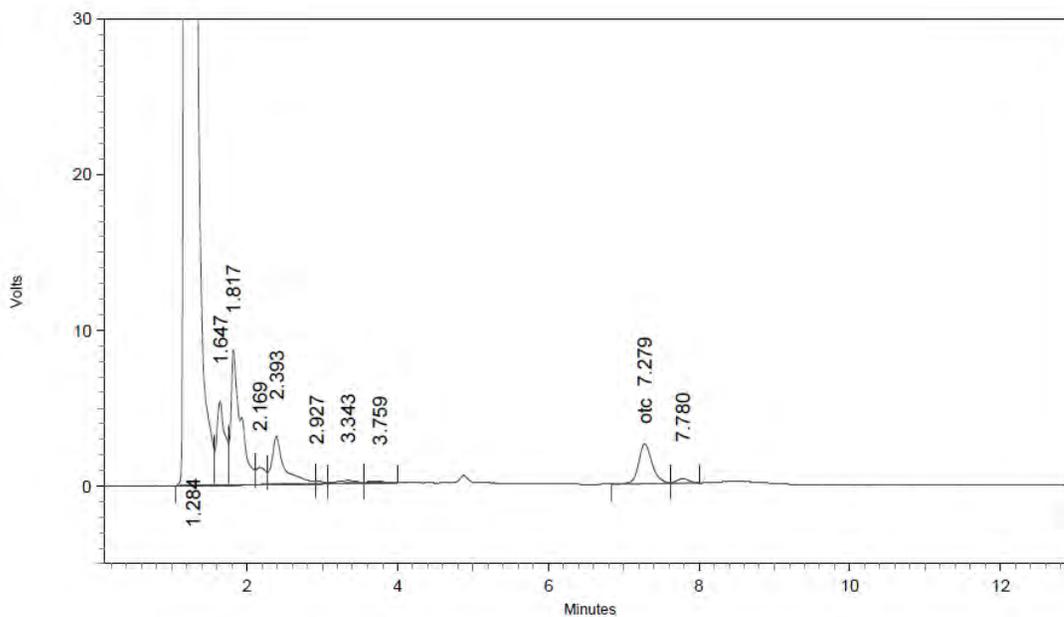


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.343	28331	7943.39



F10 OTC 7-Abril-2016

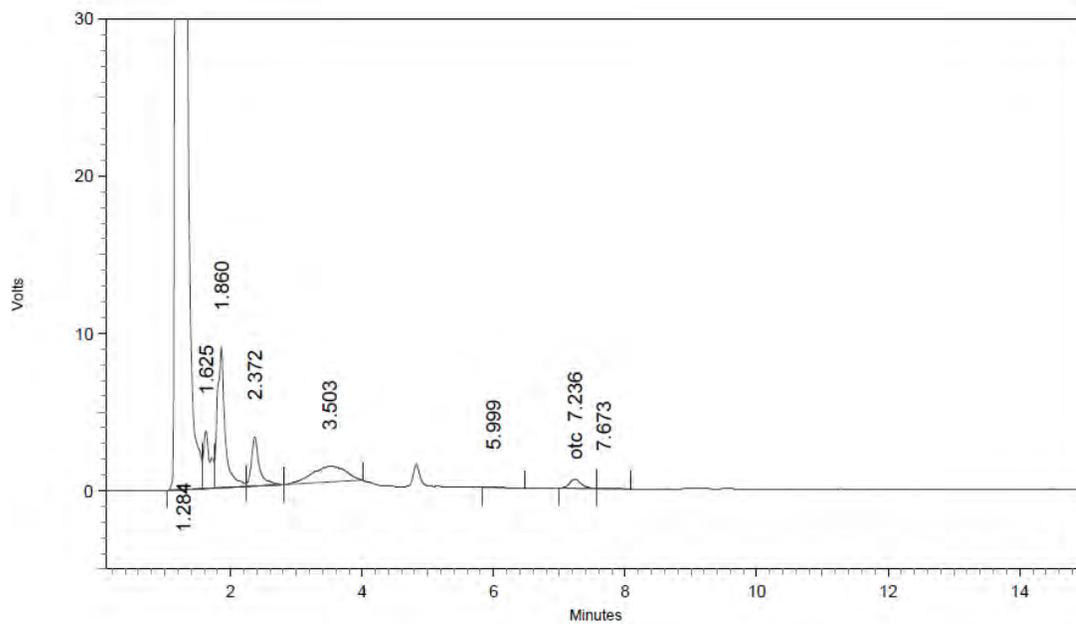


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.279	31963	8321.65



D-11 OTC 21-Abril-2016

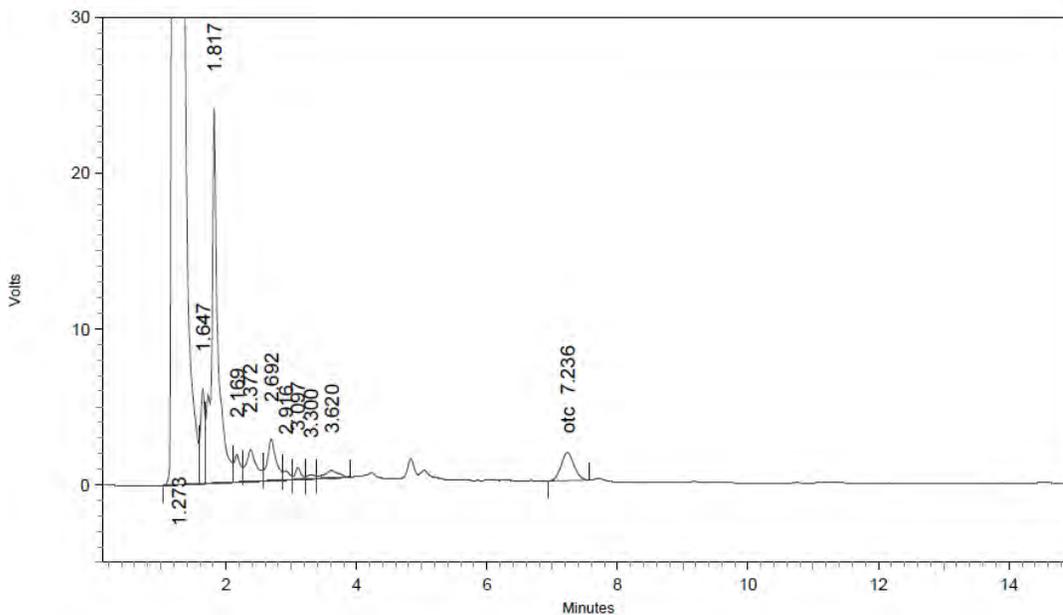


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.236	7481	7933.40



D-12 OTC 21-Abril-2016

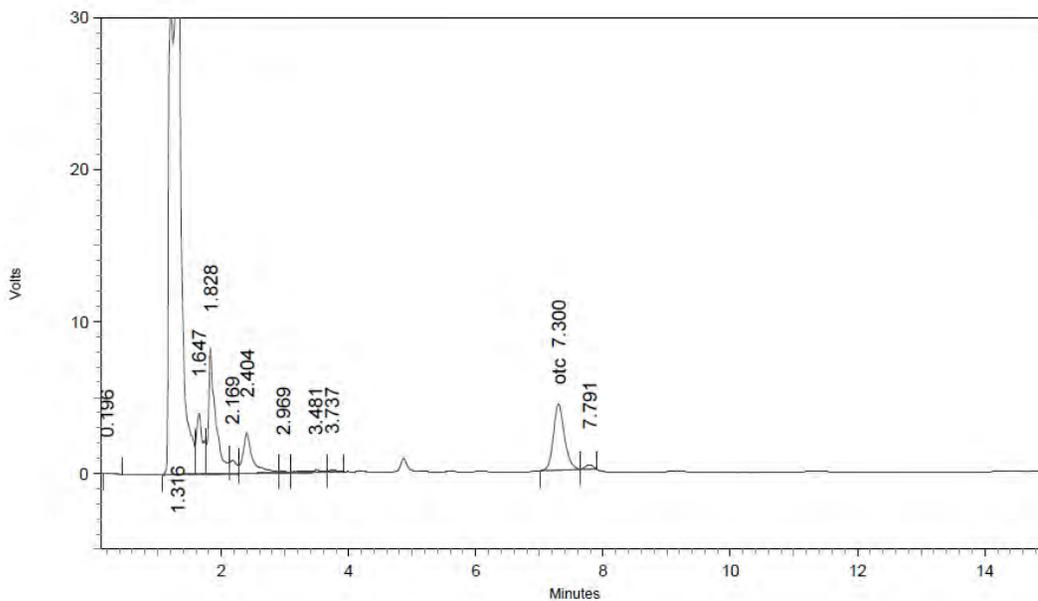


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.236	24892	6110.12



D-13 OTC 21-Abril-2016

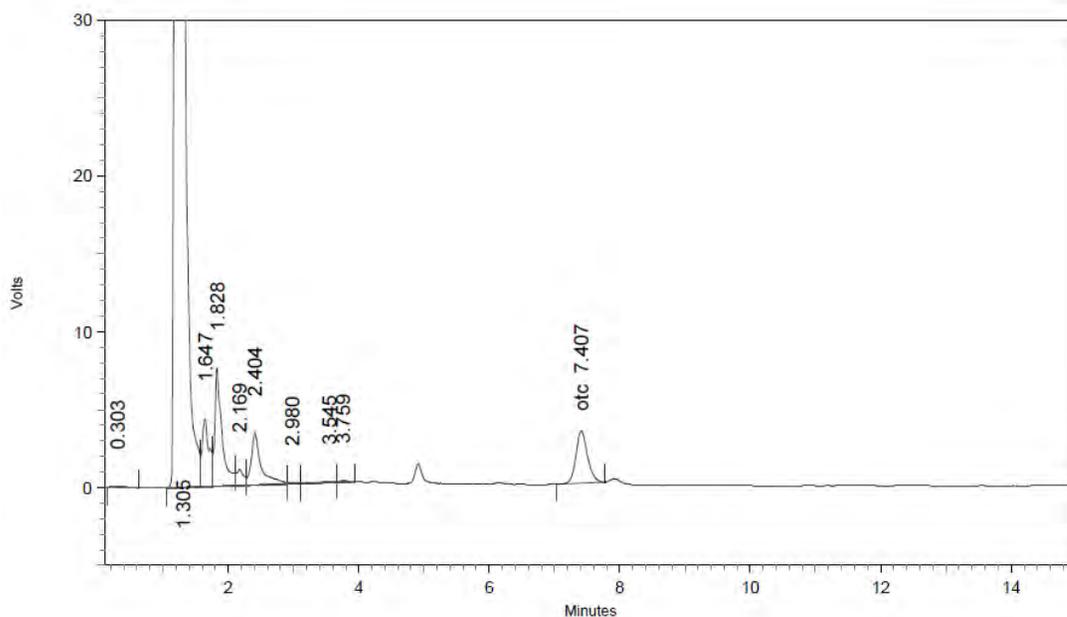


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.300	52567	8585.43



D-14 OTC 21-Abril-2016

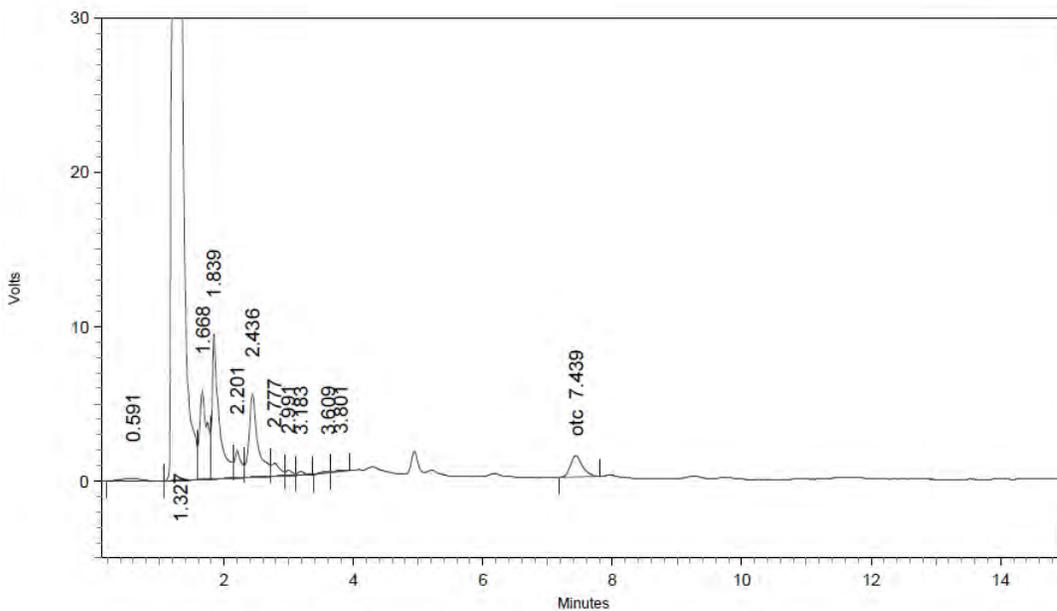


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.407	41329	8380.53



D-15 OTC 21-Abril-2016

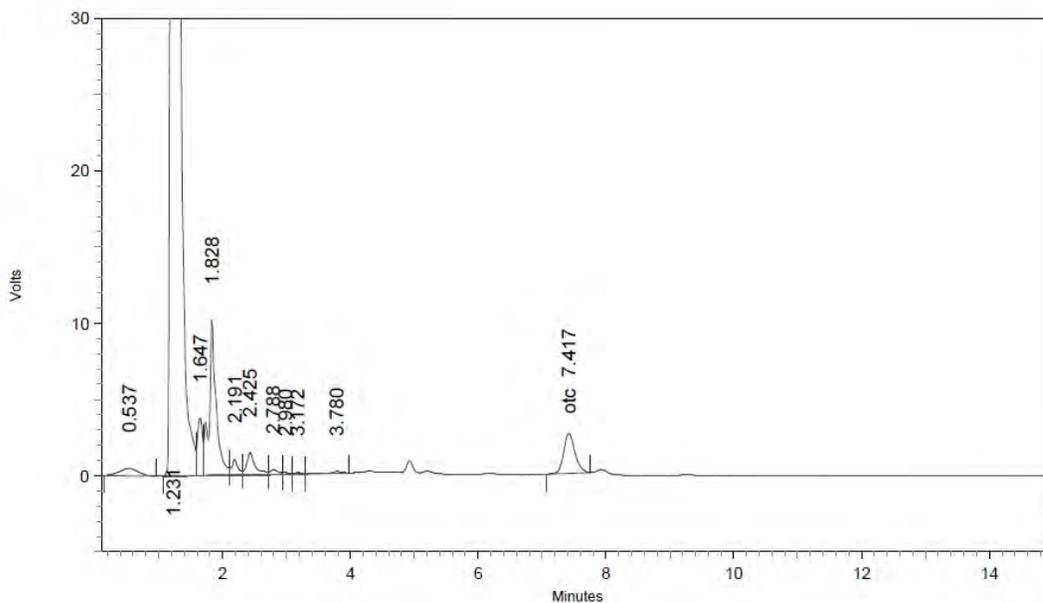


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.439	17679	7721.43



E-11 OTC 21-Abril-2016

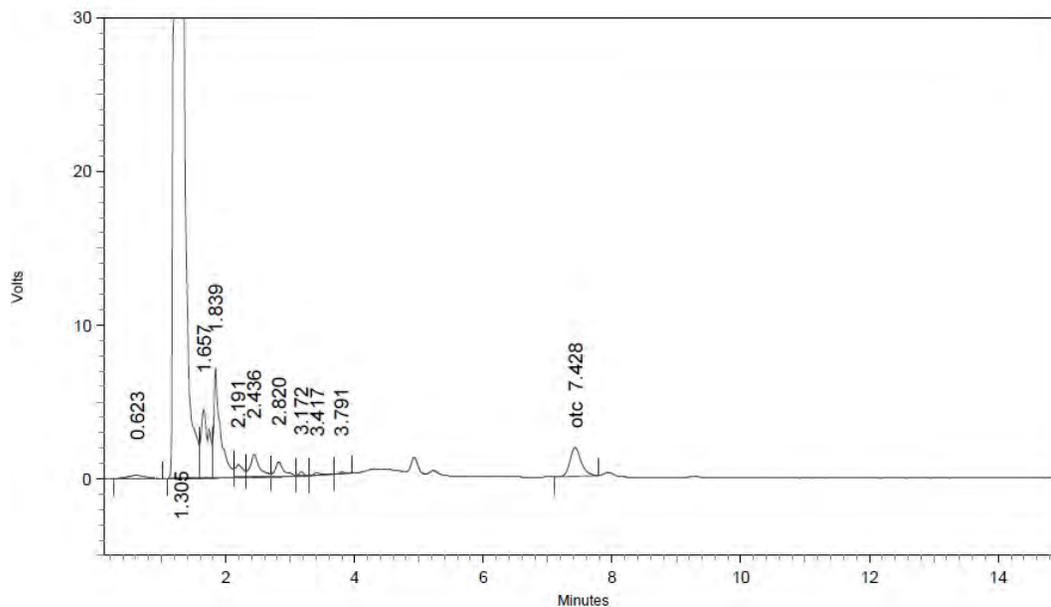


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.417	32118	8577.43



E-12 OTC 21-Abril-2016

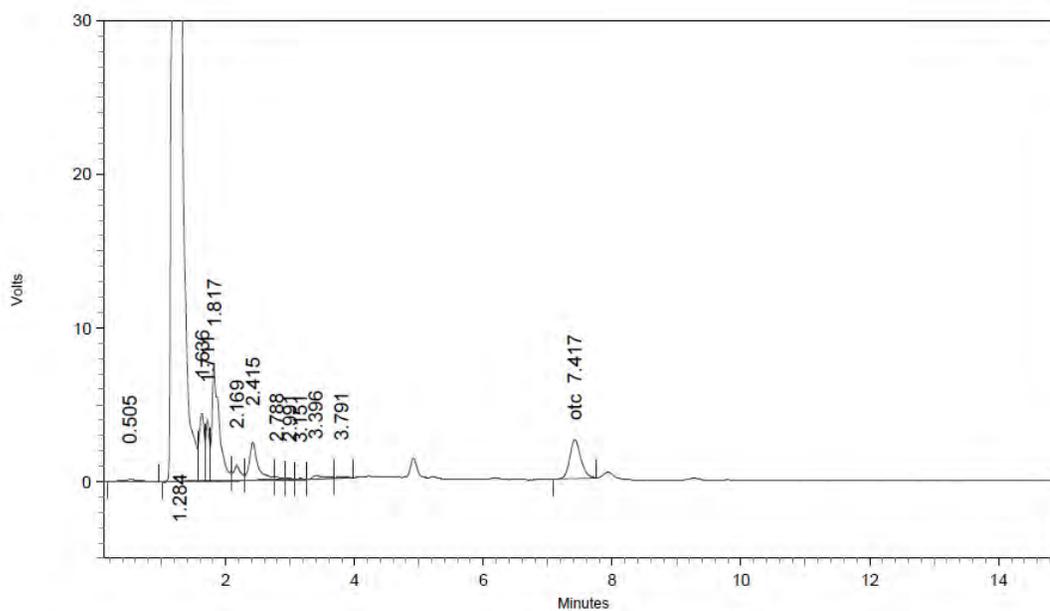


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.428	22705	8924.26



E-13 OTC 21-Abril-2016

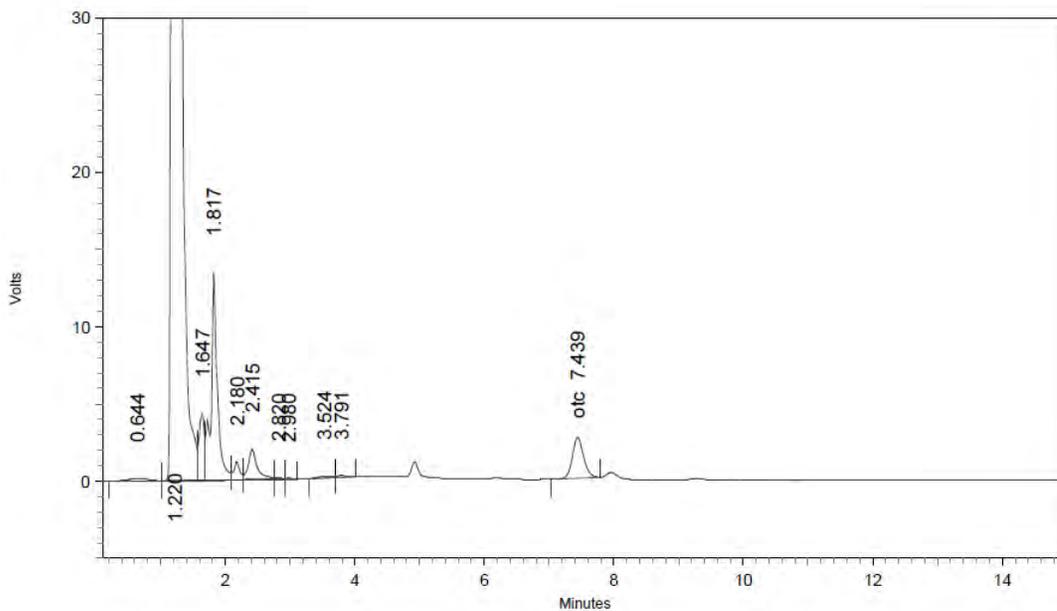


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.417	30117	8815.79



E-14 OTC 21-Abril-2016

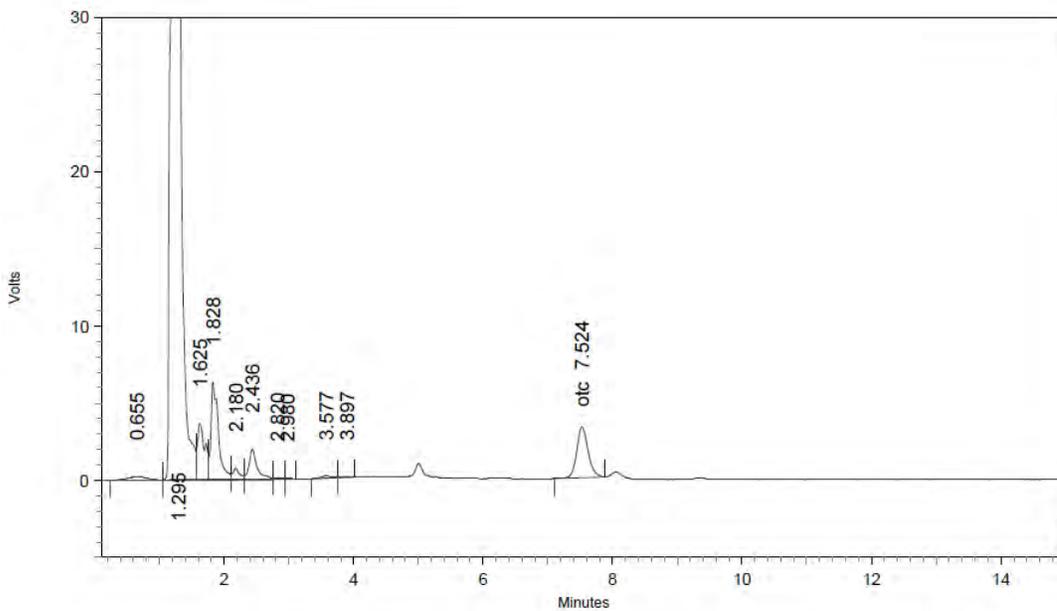


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.439	31744	8614.01



E-15 OTC 21-Abril-2016

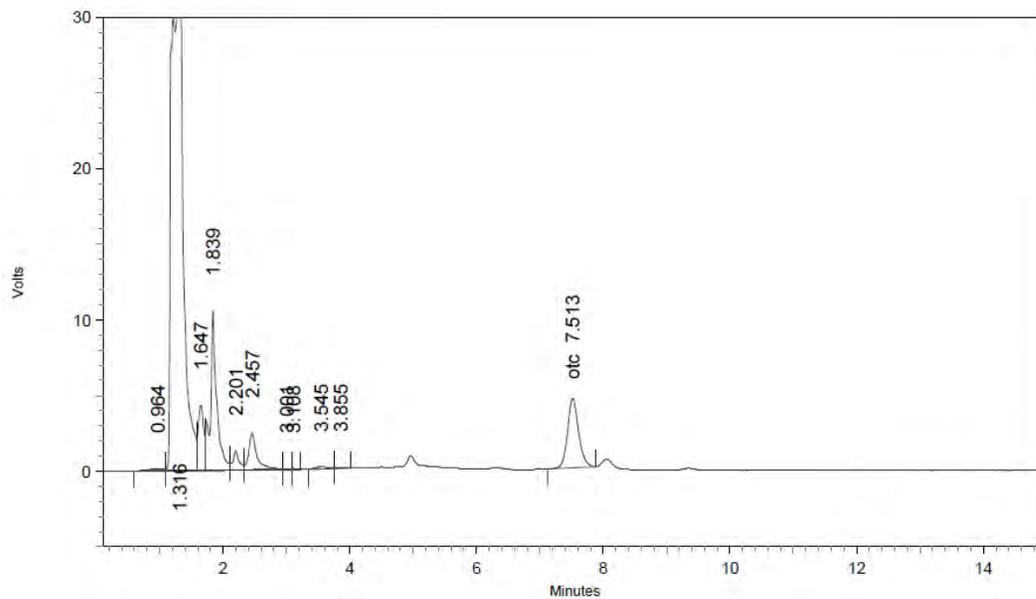


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.524	40121	8882.14



F-11 OTC 21-Abril-2016

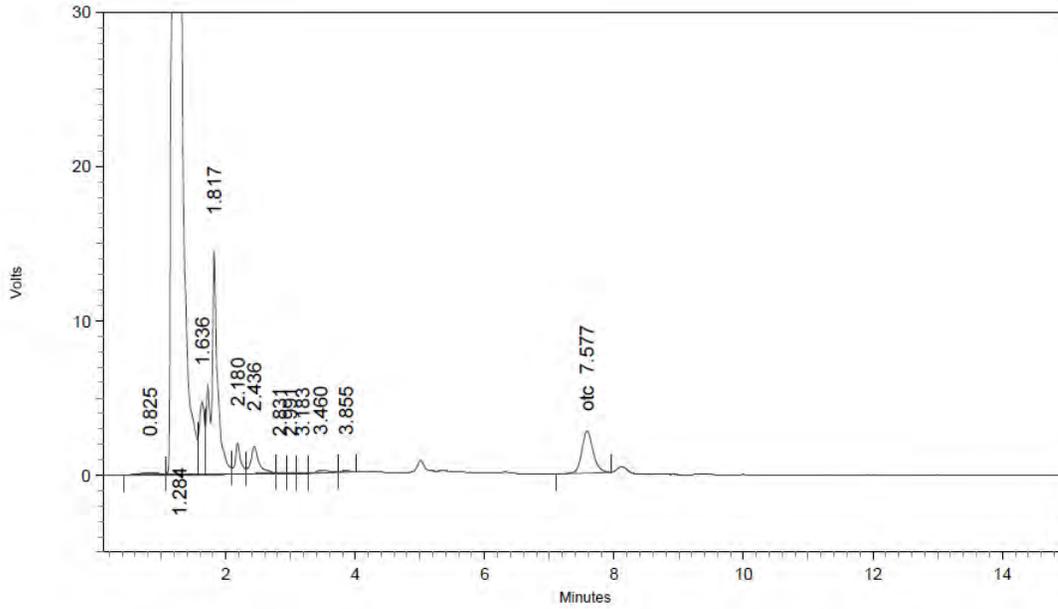


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.513	55494	8817.27



F-12 OTC 21-Abril-2016

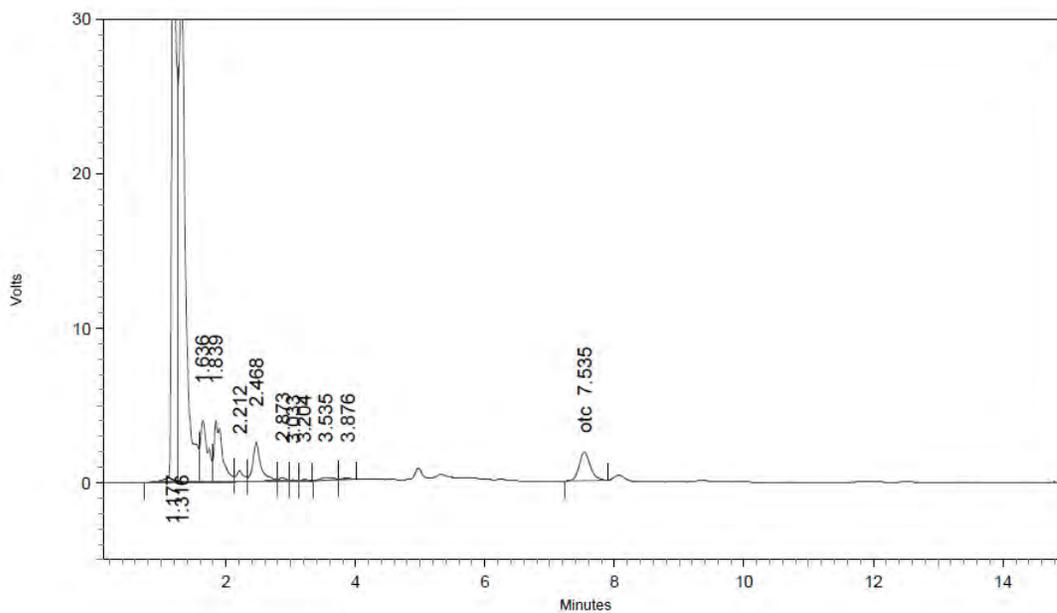


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.577	33088	9087.86



F-13 OTC 21-Abril-2016

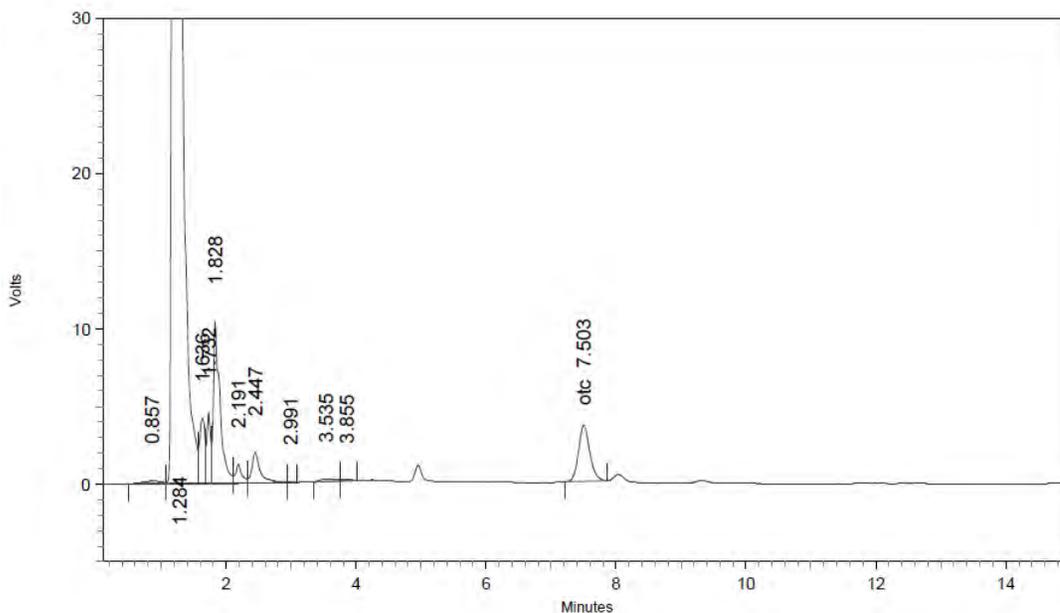


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.535	22181	9169.23



F-14 OTC 21-Abril-2016

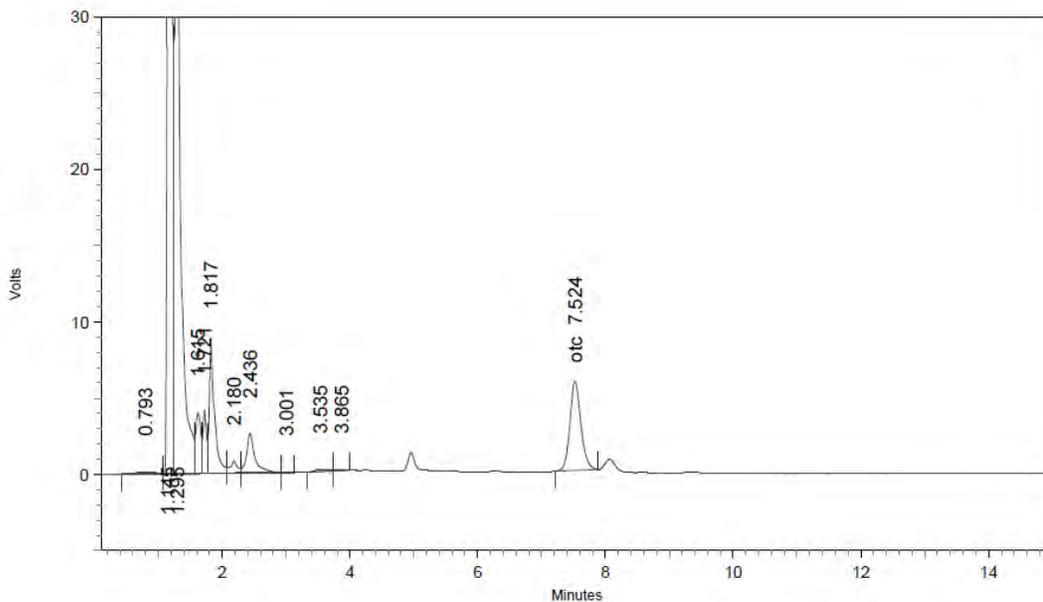


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.503	43584	8977.93



F-15 OTC 21-Abril-2016

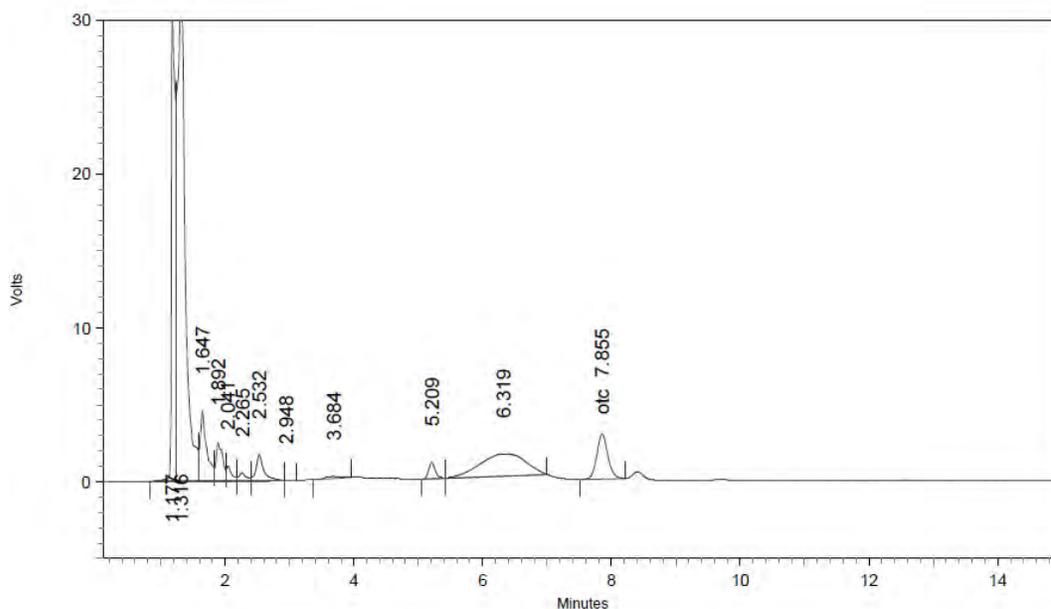


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.524	70058	9092.35



D-16 OTC 26-Abril-2016

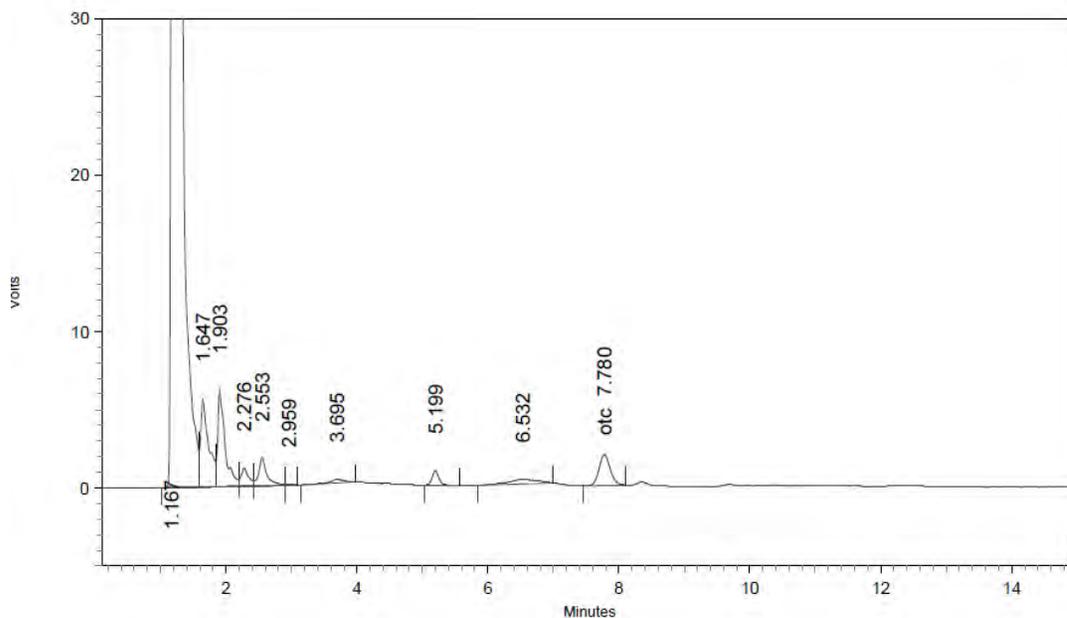


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.855	34948	10067.79



D-17 OTC 26-Abril-2016

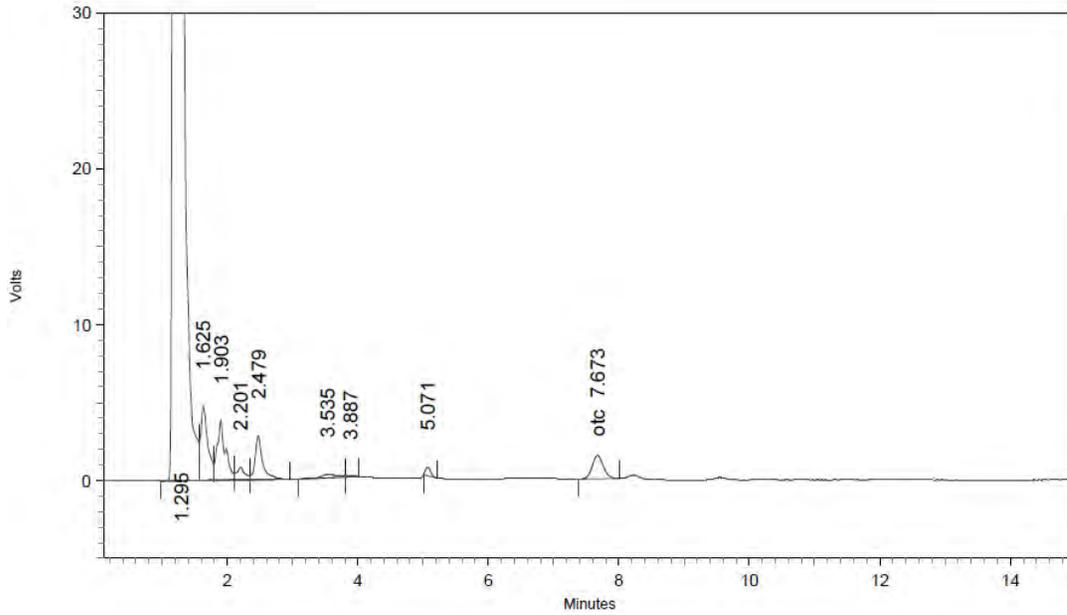


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.780	23522	9837.14



D-18 OTC 26-Abril-2016

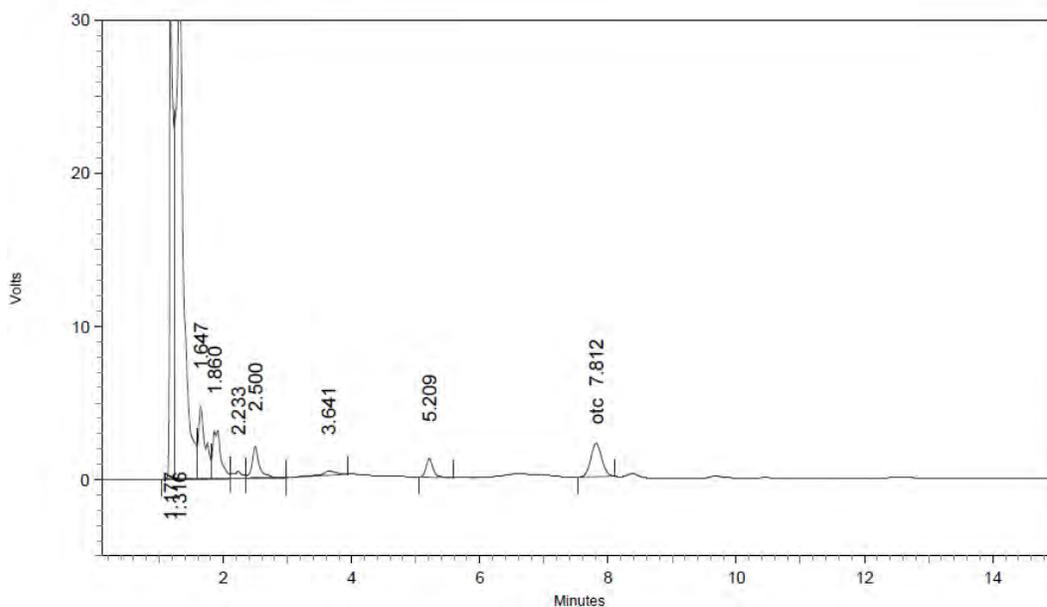


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.673	18136	9061.95



D-19 OTC 26-Abril-2016

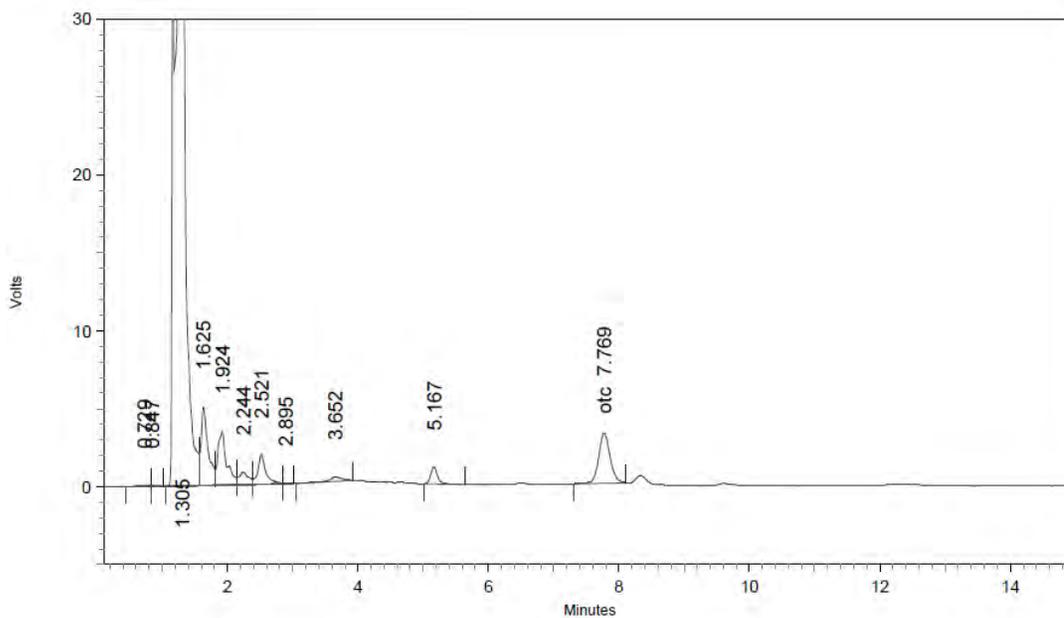


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.812	26127	9445.55



D-20 OTC 26-Abril-2016

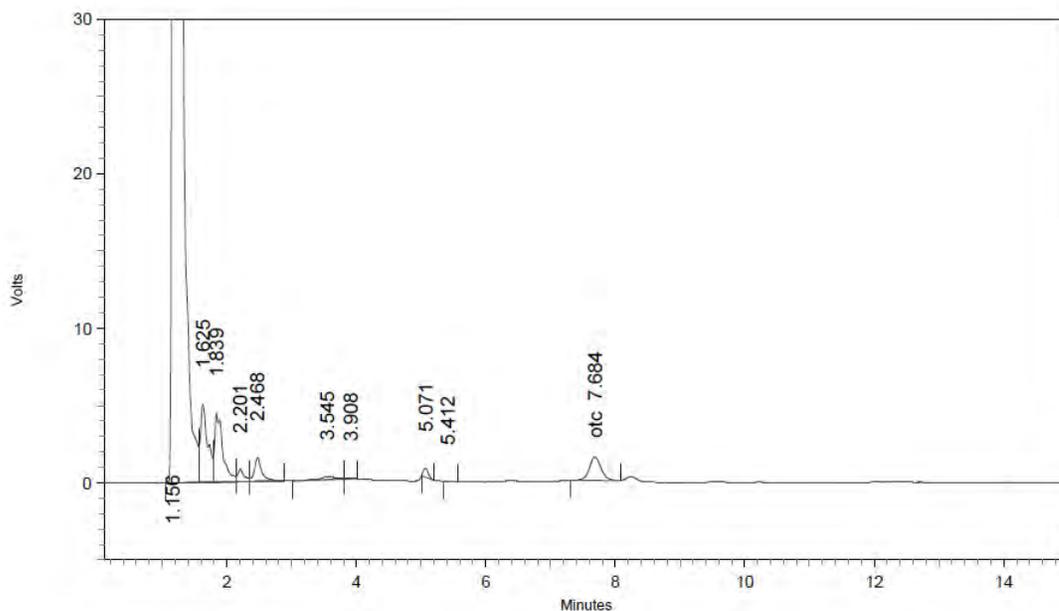


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.769	39047	9614.63



E-16 OTC 26-Abril-2016

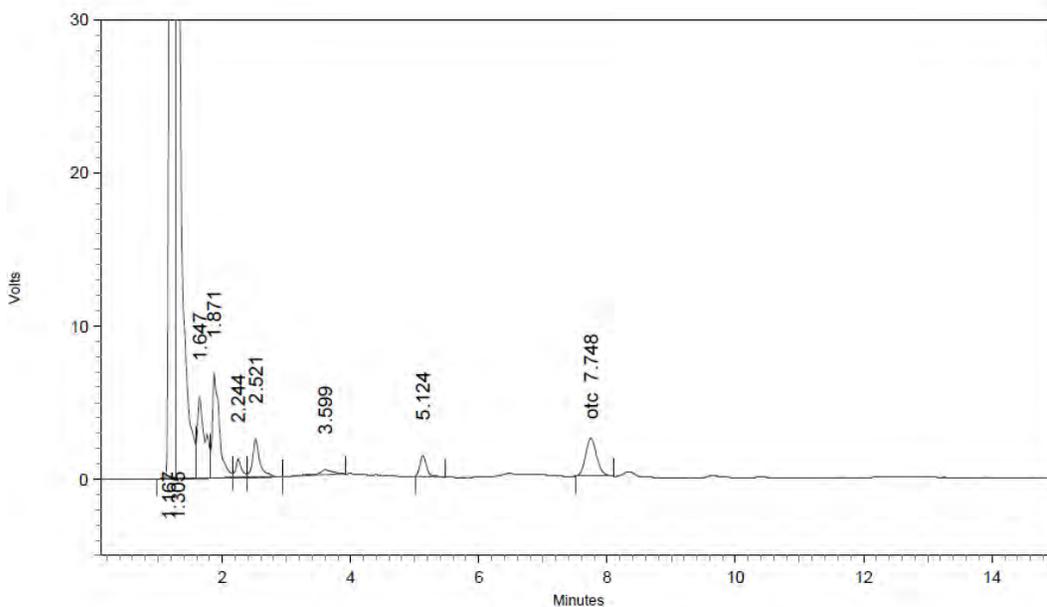


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.684	19444	8624.66



E-17 OTC 26-Abril-2016

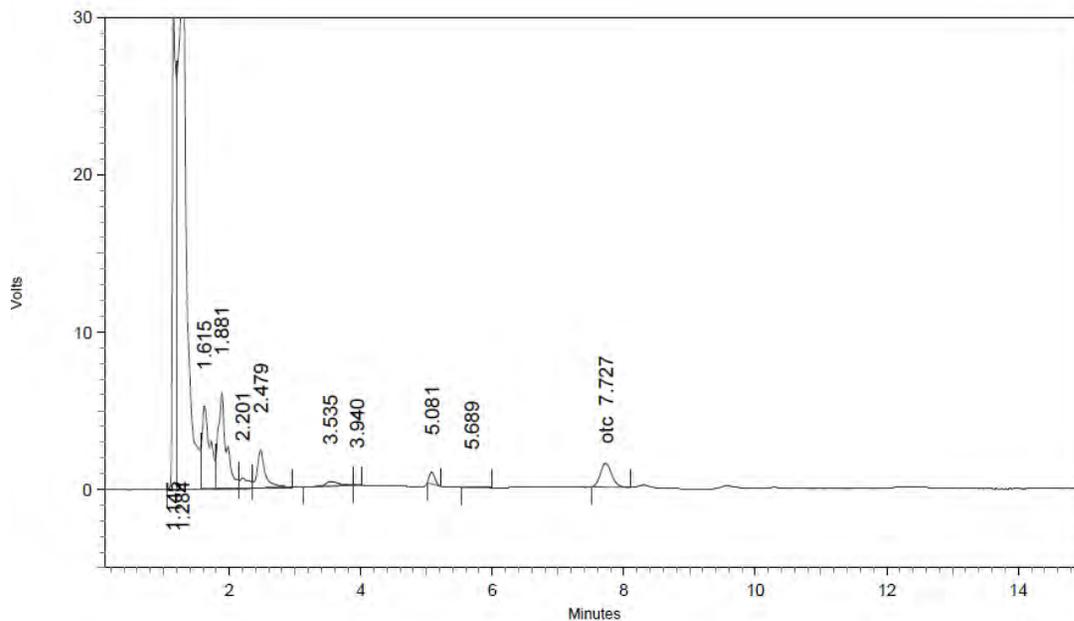


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.748	29814	9441.82



E-18 OTC 26-Abril-2016

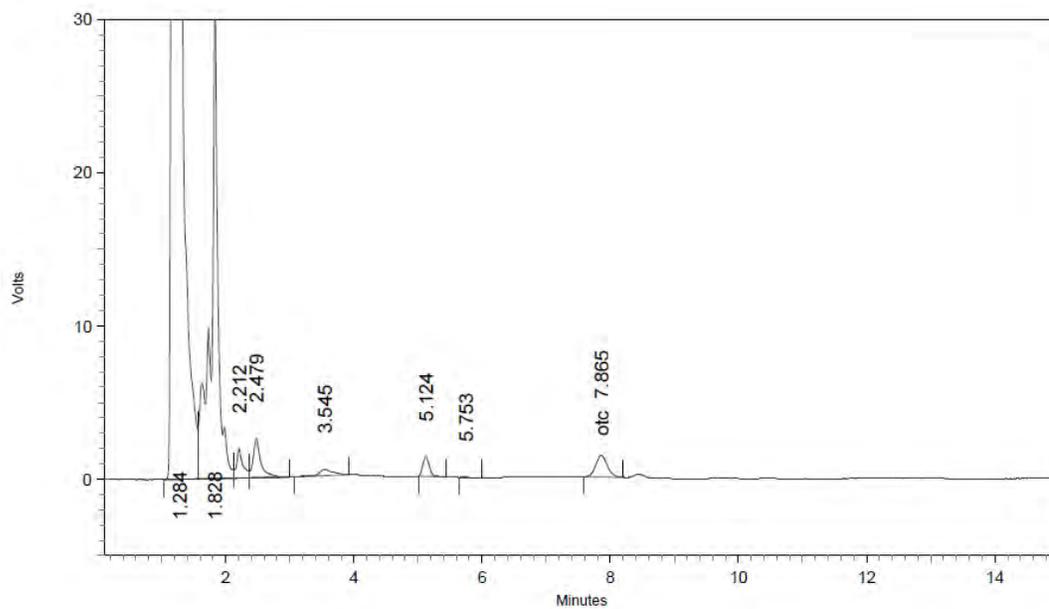


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.727	18315	9425.24



E-19 OTC 26-Abril-2016

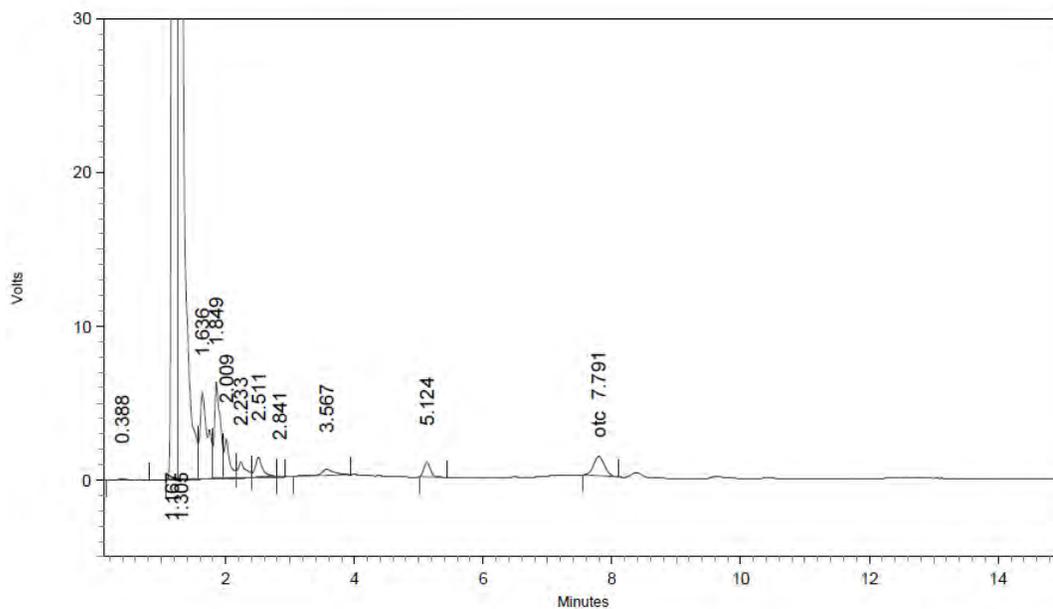


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.865	17922	8548.45



E-20 OTC 26-Abril-2016

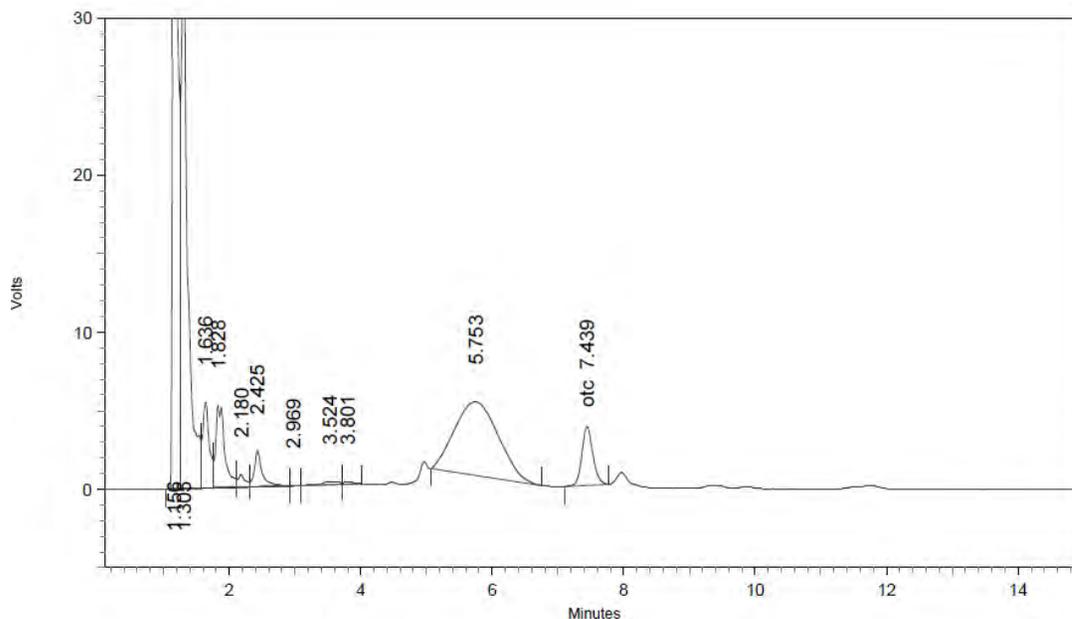


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.791	14770	9596.07



F-16 OTC 28-Abril-2016

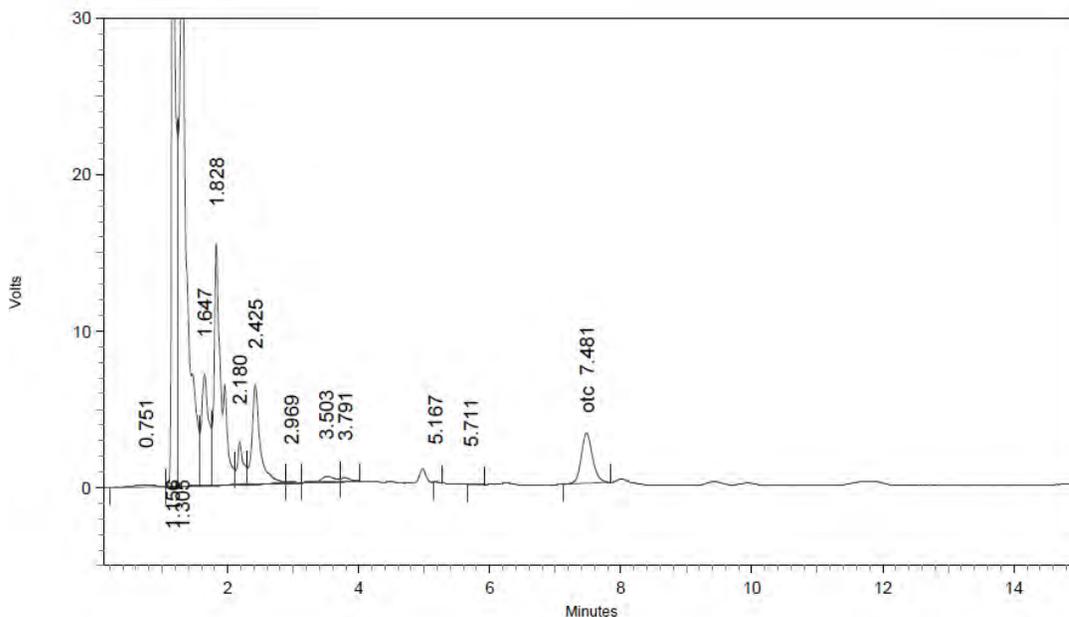


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.439	43167	9612.45



F-17 OTC 28-Abril-2016

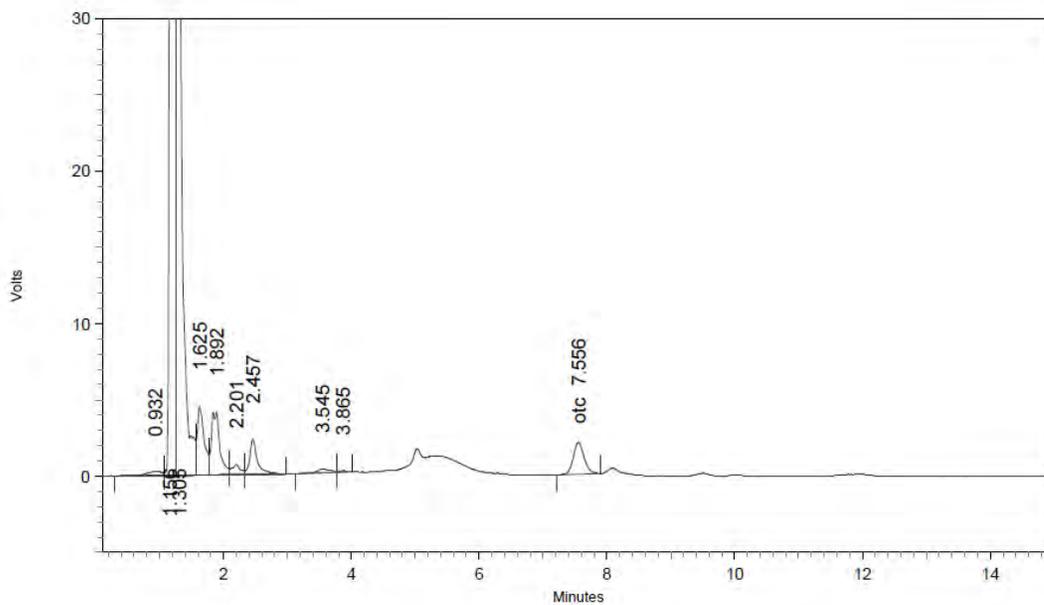


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.481	38338	9120.83



F-18 OTC 28-Abril-2016

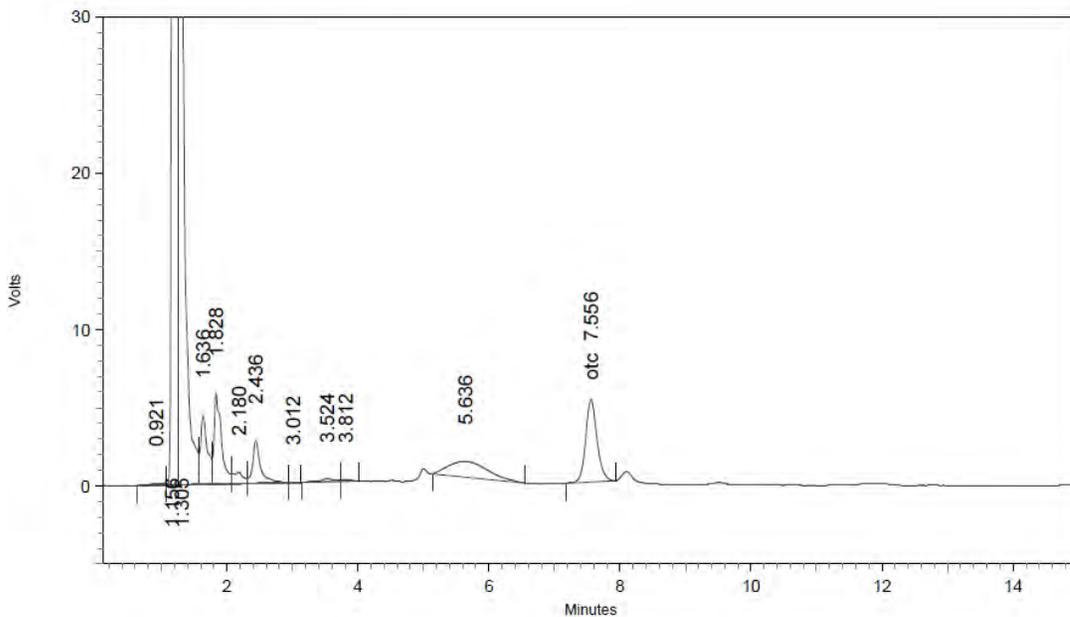


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.556	24606	9396.55



F-19 OTC 28-Abril-2016

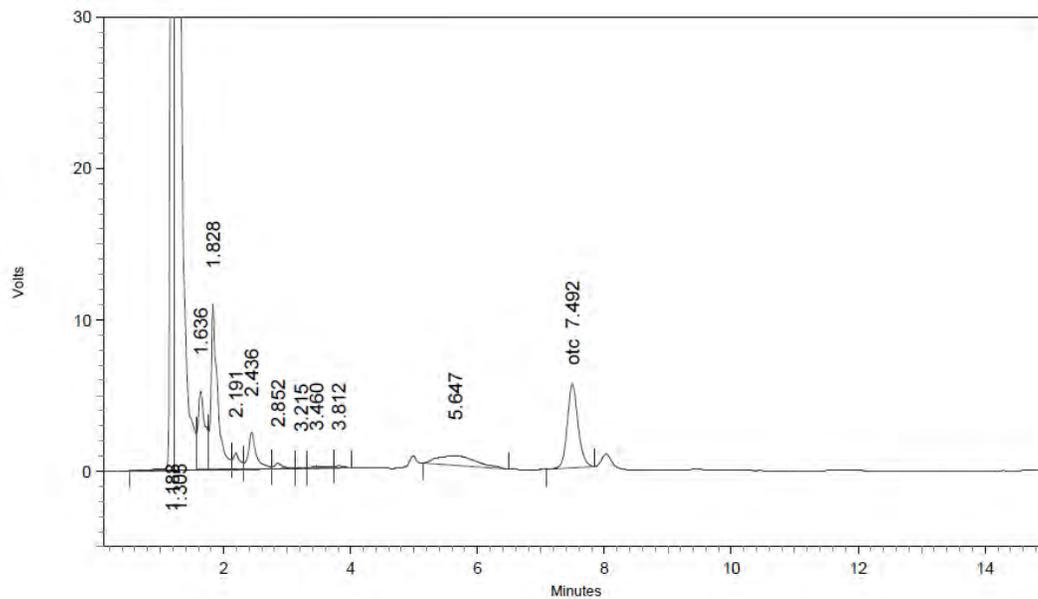


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.556	63588	9251.49



F-20 OTC 28-Abril-2016



2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.492	65021	9500.51



Anexo 8.5. Resultados de OTC en piel-músculo de Coho para el cálculo de la curva de depleci3n de Terrivet en condiciones controladas.

Fecha análisis	Nº Mx	Días post-inyecci3n	área	Conc obtenida ng/g
23/03/2016	G-1	32	44.468	340,7
23/03/2016	G-2	32	43.811	335,0
23/03/2016	G-3	32	32.703	248,9
23/03/2016	G-4	32	113.282	902,7
23/03/2016	G-5	32	145.793	1129,0
30/03/2016	H-1	32	31.685	245,3
30/03/2016	H-2	32	82.598	638,6
30/03/2016	H-3	32	76.765	585,4
30/03/2016	H-4	32	64.458	490,2
30/03/2016	H-5	32	31.019	243,4
30/03/2016	I-1	32	18.484	146,6
30/03/2016	I-2	32	102.693	789,9
30/03/2016	I-3	32	137.032	1065,1
30/03/2016	I-4	32	114.412	883,8
30/03/2016	I-5	32	104.038	822,3
07/04/2016	G-6	39	26.373	200,7
07/04/2016	G-7	39	39.332	302,8
07/04/2016	G-8	39	93.761	716,9
07/04/2016	G-9	39	100.640	778,6
07/04/2016	G-10	39	155.544	1209,3
07/04/2016	H-6	39	129.789	991,4
07/04/2016	H-7	39	65.473	502,8
07/04/2016	H-8	39	24.509	185,6
07/04/2016	H-9	39	91.736	730,5
07/04/2016	H-10	39	48.392	382,7
07/04/2016	I-6	39	119.610	929,4
07/04/2016	I-7	39	73.068	565,7

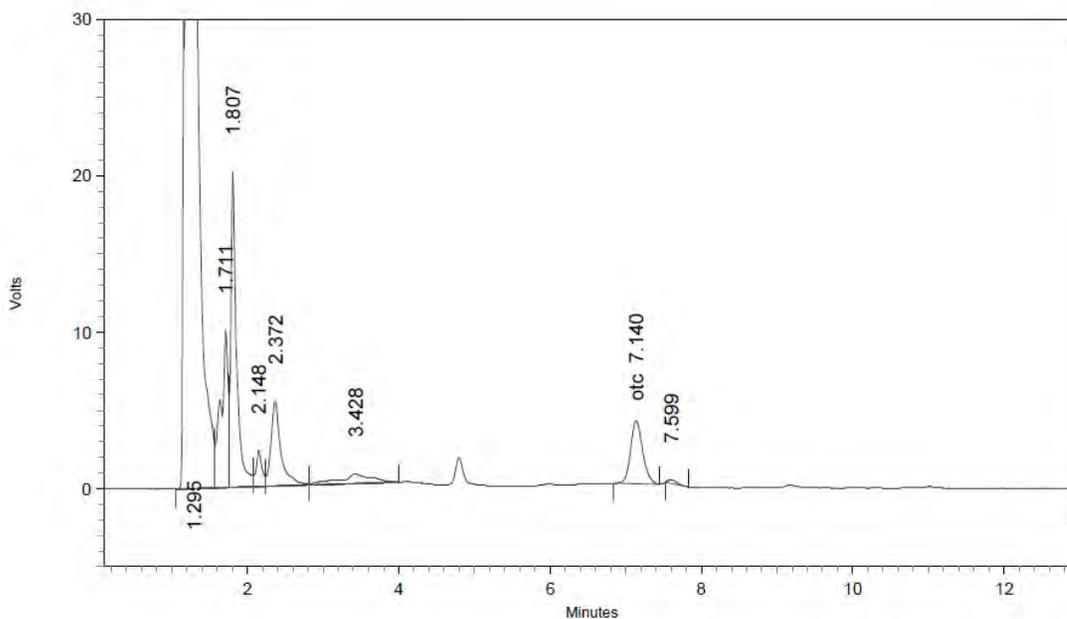


07/04/2016	I-8	39	191.610	1499,0
07/04/2016	I-9	39	80.908	640,2
07/04/2016	I-10	39	124.748	1004,3
21/04/2016	G11	46	42.810	324,2
21/04/2016	G12	46	39.365	307,8
21/04/2016	G13	46	32.023	244,2
21/04/2016	G14	46	26.436	201,2
21/04/2016	G15	46	39.736	309,5
26/04/2016	H-11	46	20.275	158,2
26/04/2016	H-12	46	11.458	87,3
26/04/2016	H-13	46	25.094	191,9
26/04/2016	H-14	46	21.335	161,6
26/04/2016	H-15	46	15.899	120,2
26/04/2016	I-11	46	88.757	685,0
26/04/2016	I-12	46	22.530	176,5
26/04/2016	I-13	46	79.778	633,7
26/04/2016	I-14	46	47.039	365,4
26/04/2016	I-15	46	106.867	828,5
28/04/2016	G-16	53	35.306	265,4
28/04/2016	G-17	53	53.733	431,1
28/04/2016	G-18	53	48.098	363,8
28/04/2016	H-16	53	35.534	273,3
28/04/2016	H-17	53	16.573	130,4
28/04/2016	H-18	53	24.474	187,5
28/04/2016	H-19	53	33.314	252,2
28/04/2016	H-20	53	32.138	248,9
28/04/2016	I-16	53	20.202	158,0
28/04/2016	I-17	53	53.039	418,0
28/04/2016	I-18	53	77.457	610,4
28/04/2016	I-19	53	53.808	423,3
28/04/2016	I-20	53	56.745	428,0



Anexo 8.6. Cromatogramas de curva de depleci3n Terrivet coh, condiciones controladas

G-1 OTC 23-marzo-2016

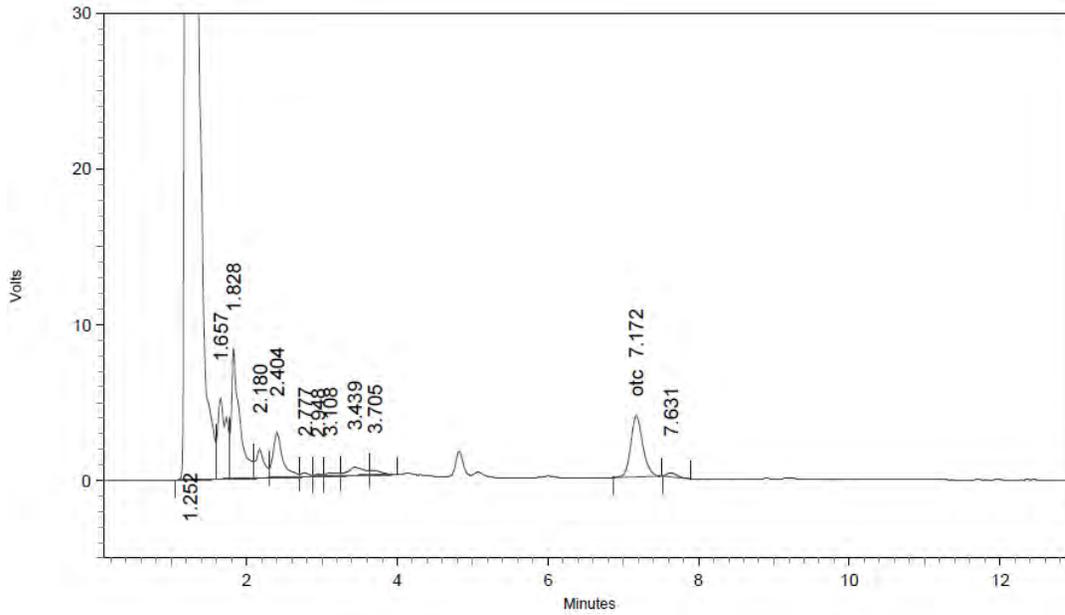


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.140	44468	9445.41



G-2 OTC 23-marzo-2016

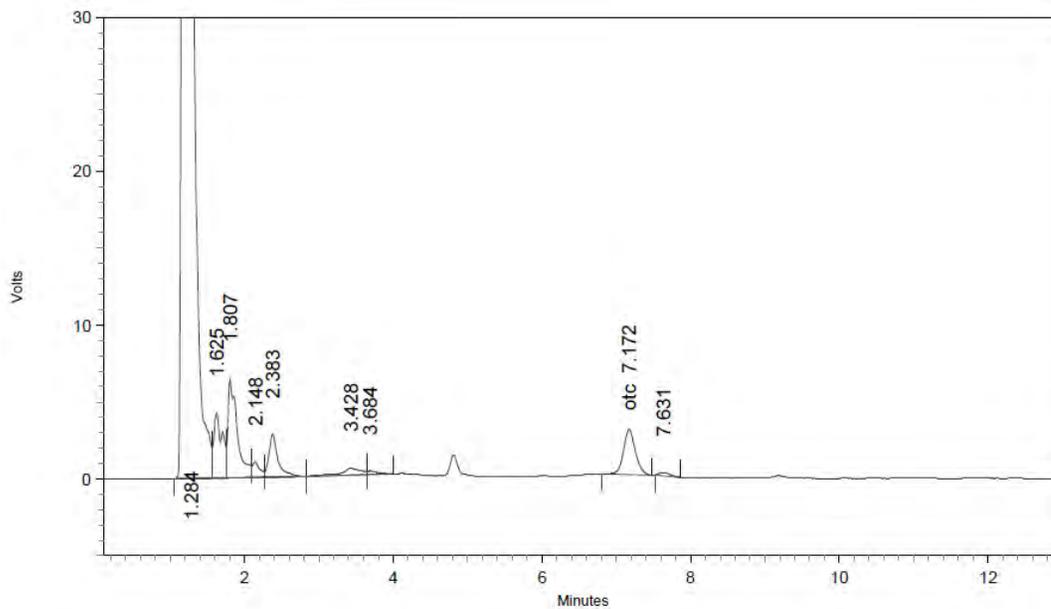


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.172	43811	9491.36



G-3 OTC 23-marzo-2016

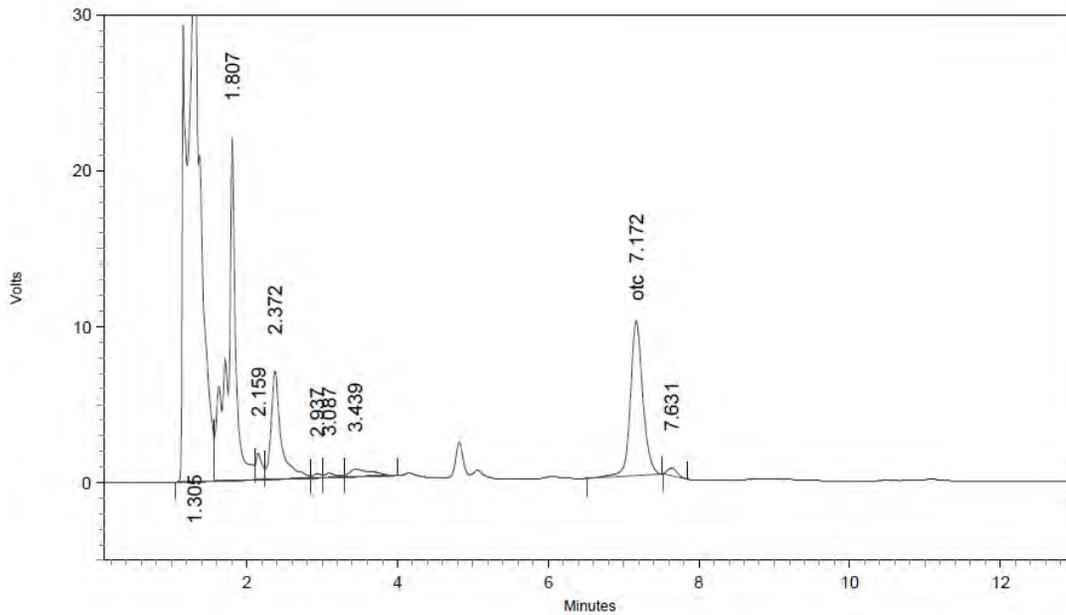


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.172	32703	9484.54



G-4 OTC 23-marzo-2016

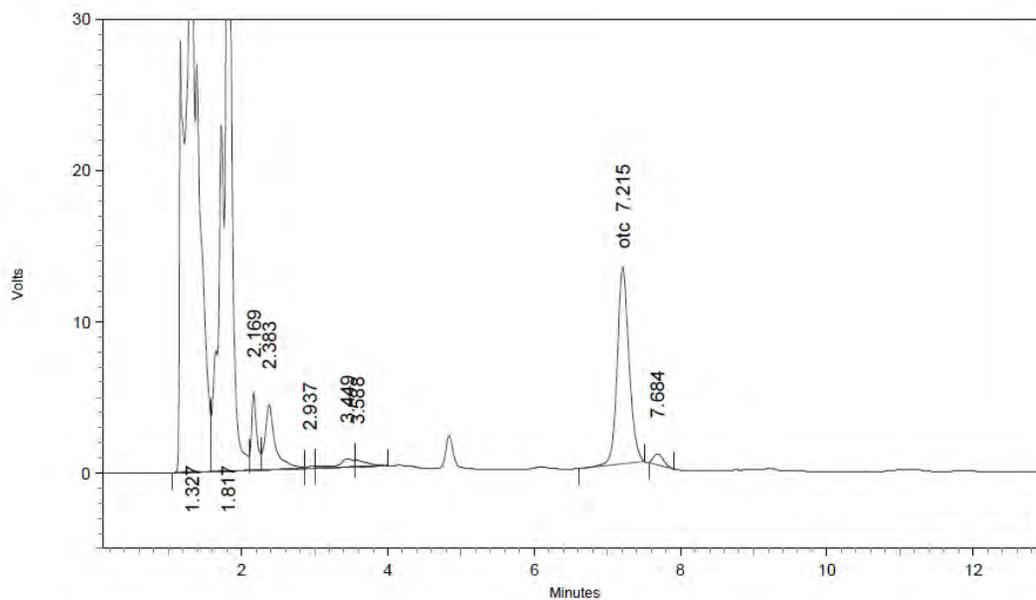


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.172	113282	9784.03



G-5 OTC 23-marzo-2016

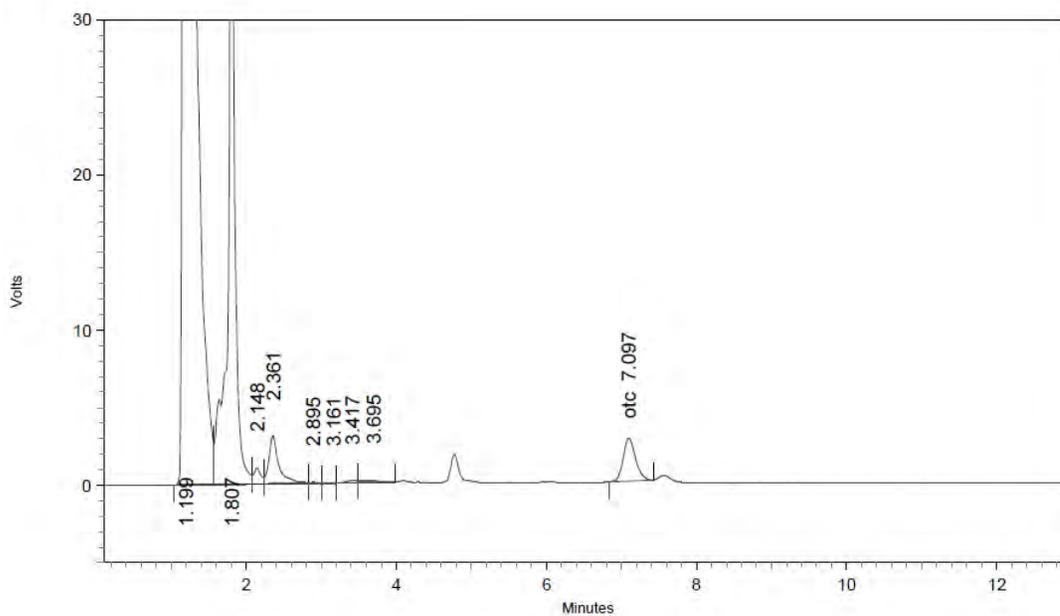


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.215	145793	9453.73



H-1 OTC 30-Marzo-2016

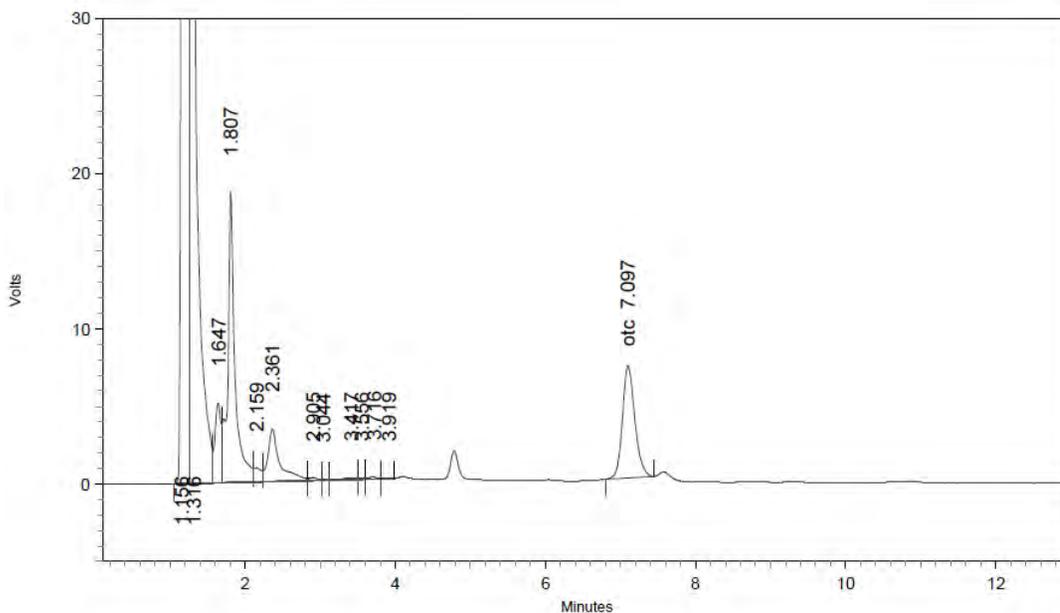


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.097	31685	8785.92



H-2 OTC 30-Marzo-2016

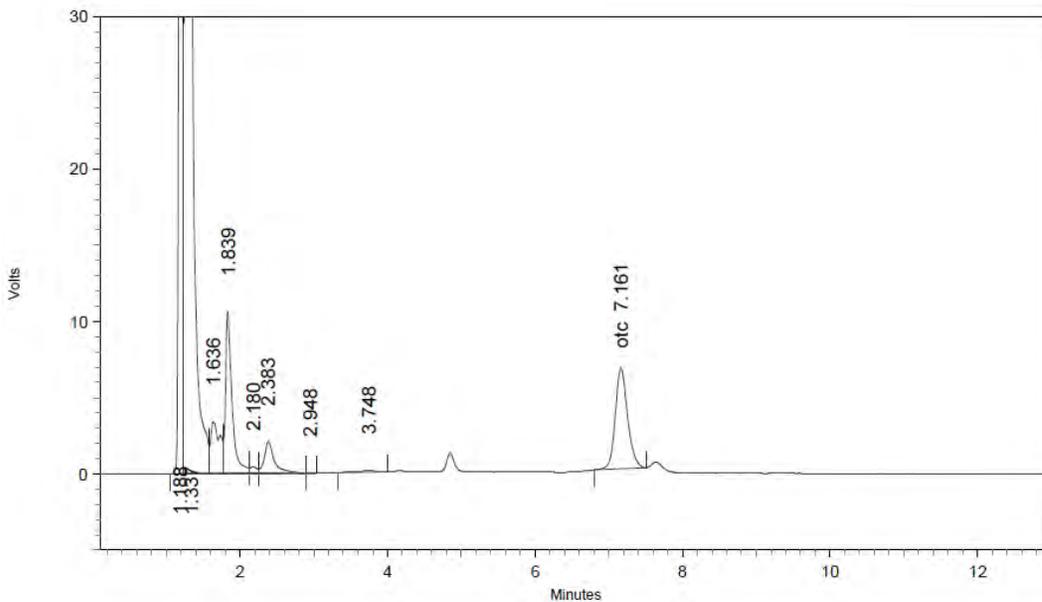


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.097	82598	8948.95



H-3 OTC 30-Marzo-2016

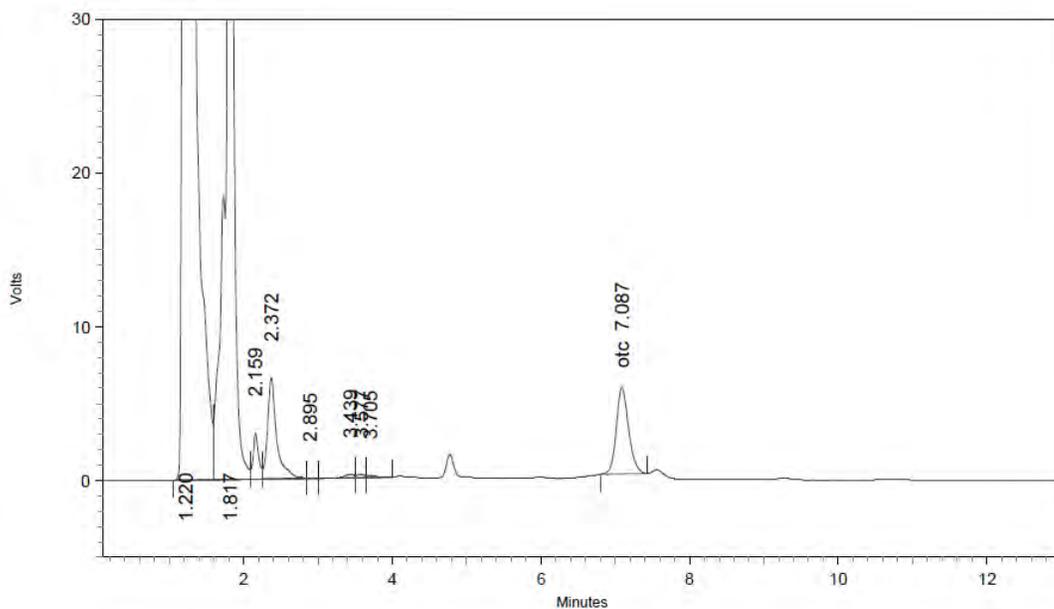


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.161	76765	8993.44



H-4 OTC 30-Marzo-2016

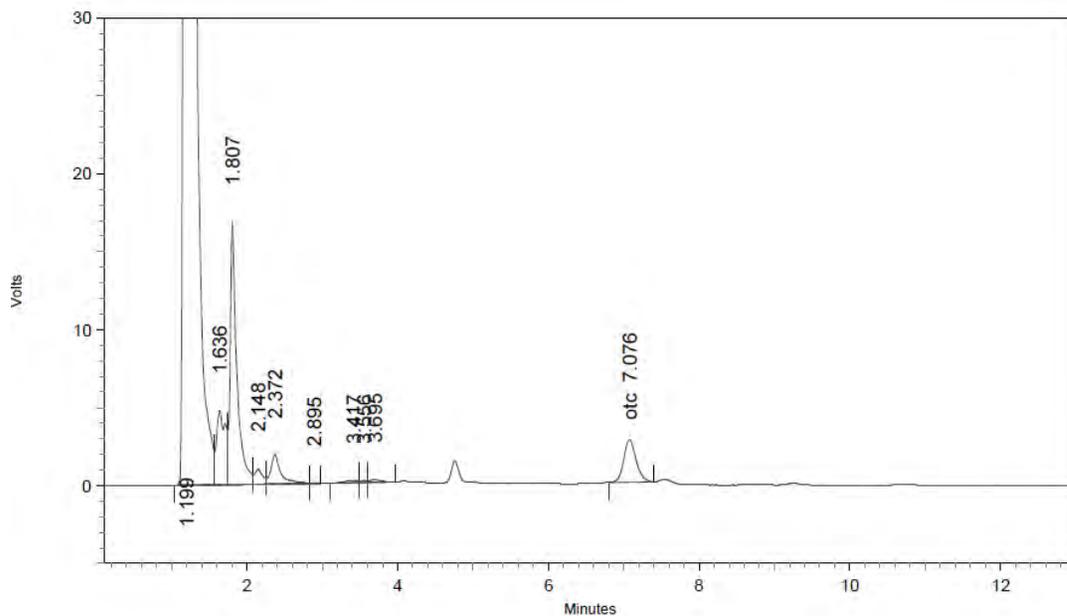


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.087	64458	8902.62



H-5 OTC 30-Marzo-2016

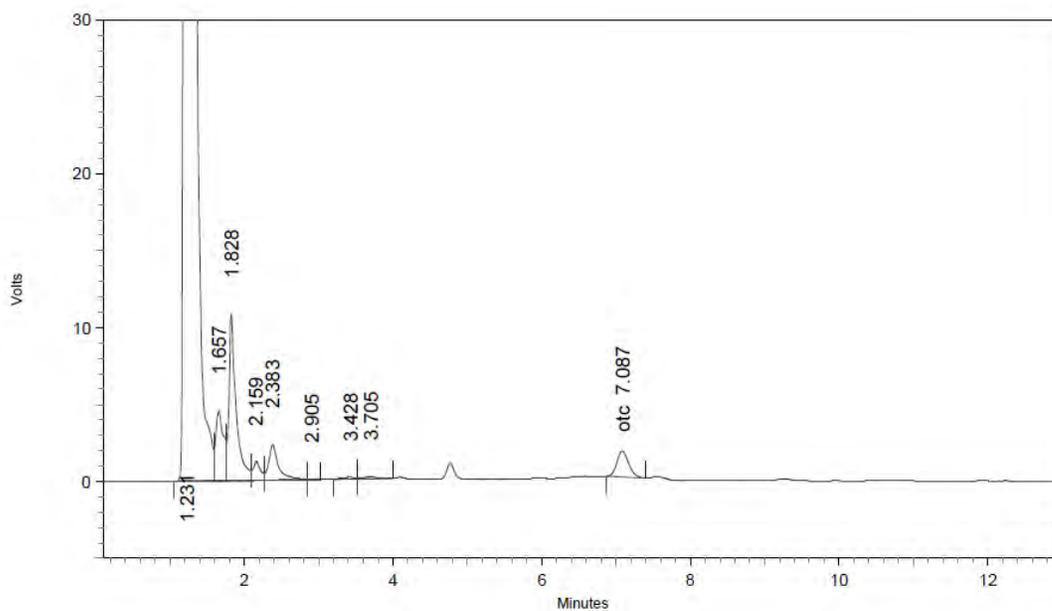


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.076	31019	8814.38



I-1 OTC 30-Marzo-2016

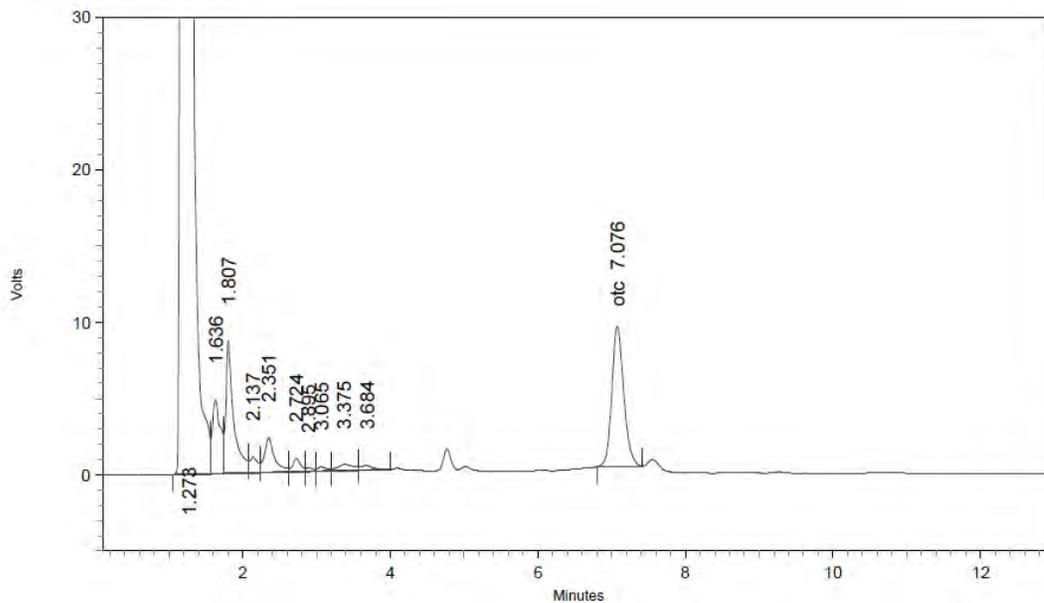


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.087	18484	9074.85



I-2 OTC 30-Marzo-2016

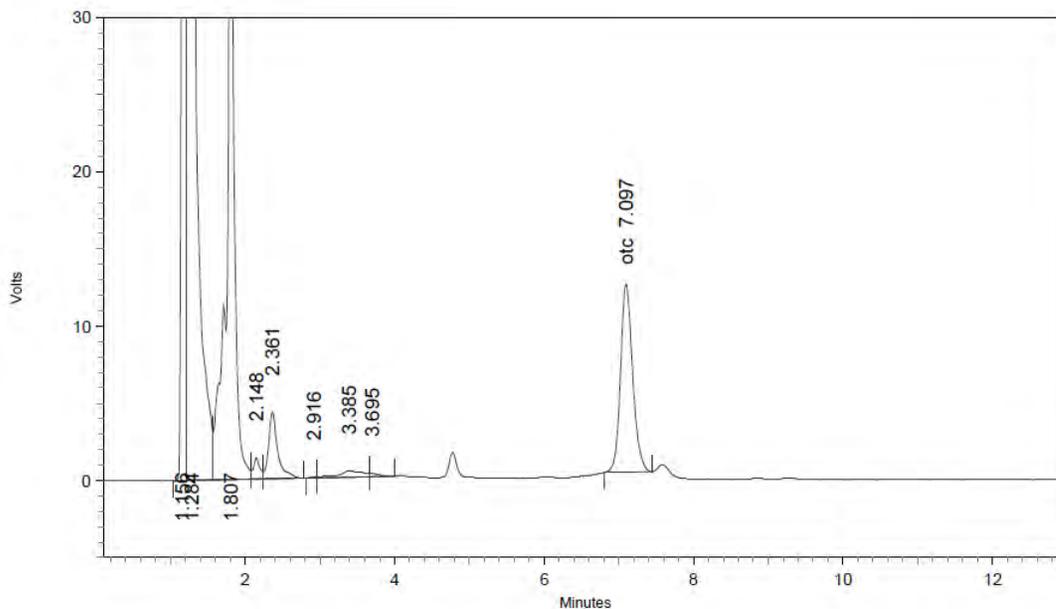


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.076	102693	9177.39



I-3 OTC 30-Marzo-2016

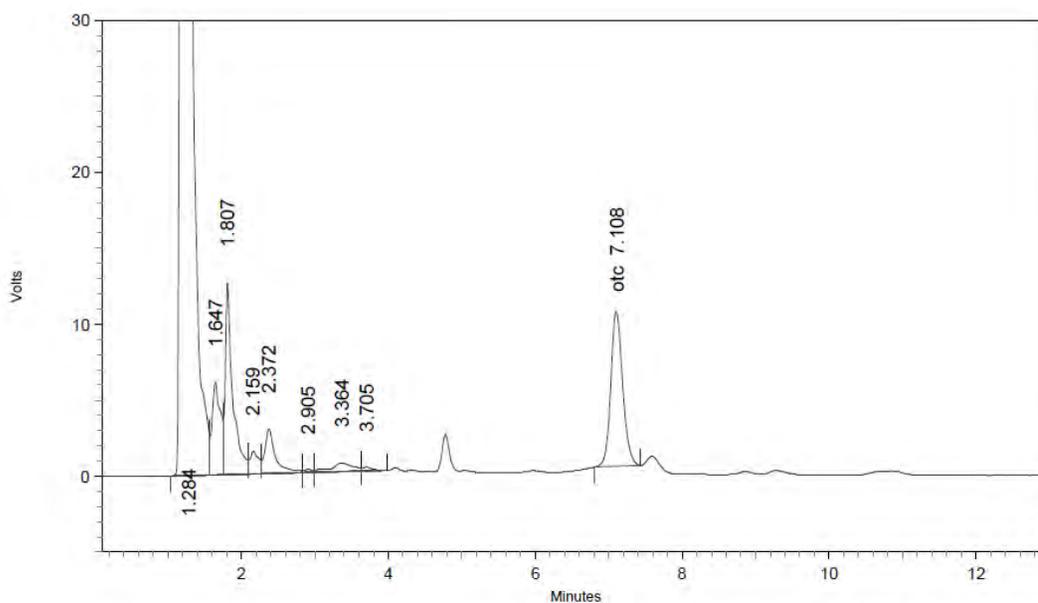


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.097	137032	9145.38



I-4 OTC 30-Marzo-2016

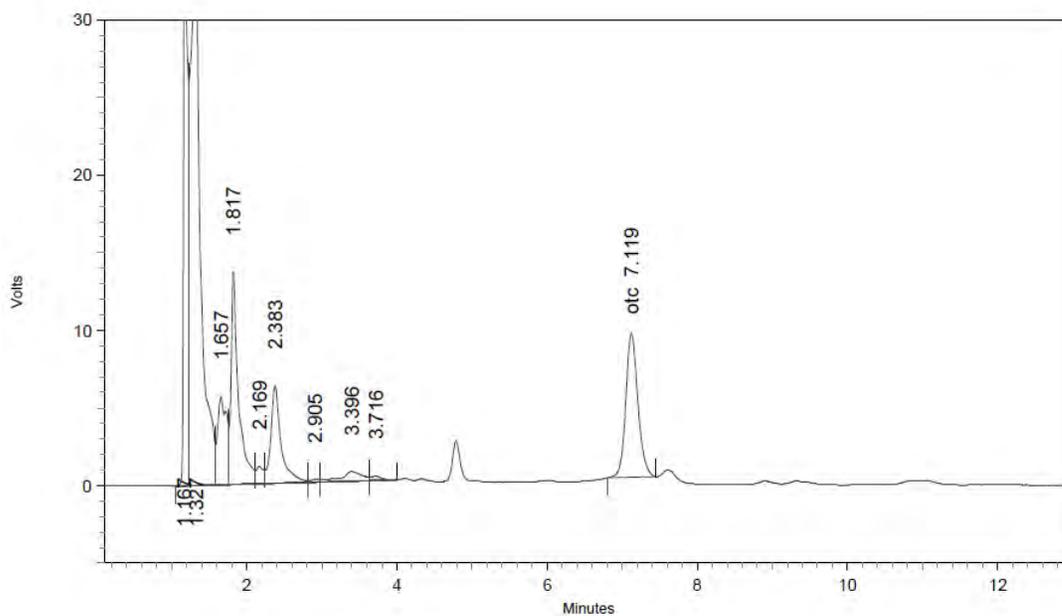


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.108	114412	9056.42



I-5 OTC 30-Marzo-2016

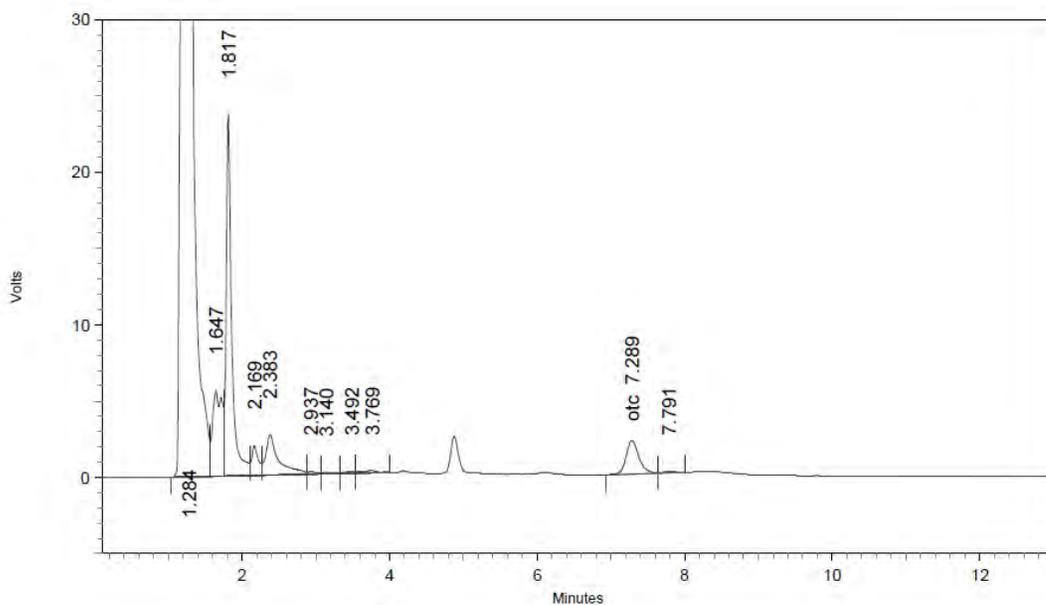


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.119	104038	9396.53



G6 OTC 7-Abril-2016

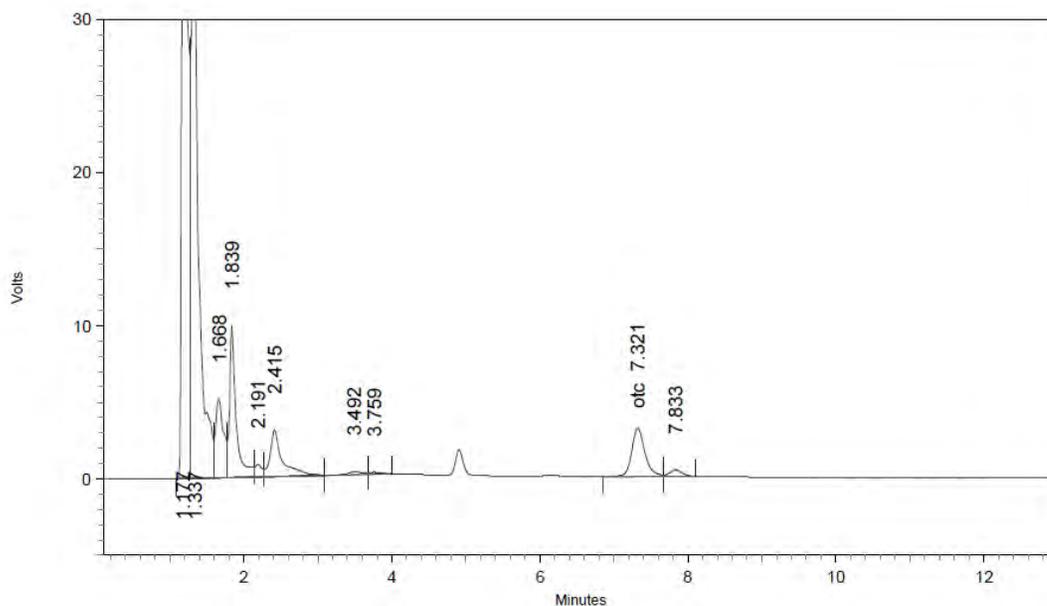


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.289	26373	8558.26



G7 OTC 7-Abril-2016

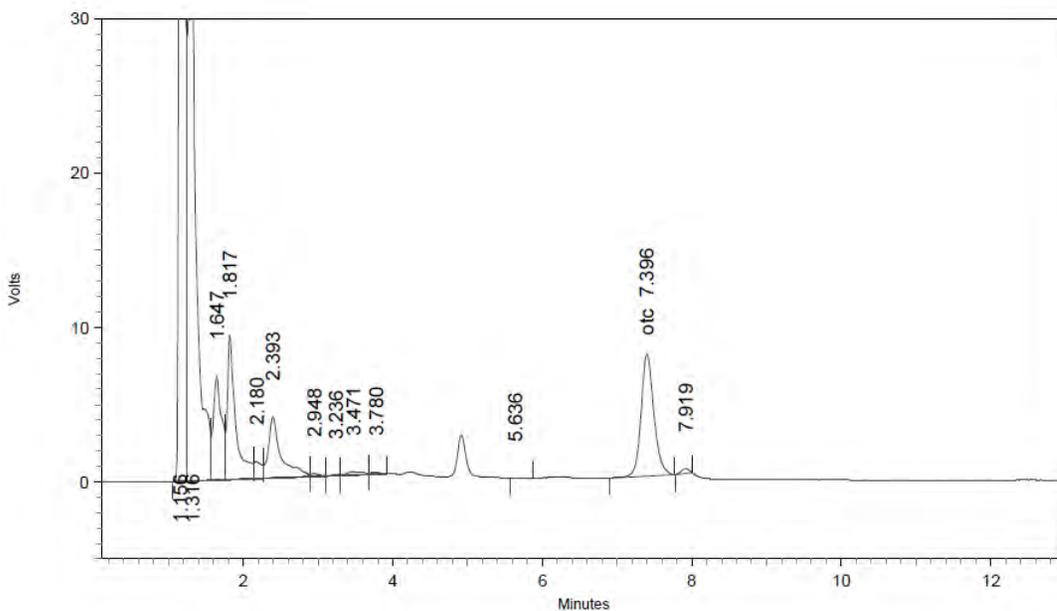


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.321	39332	8647.85



G8 OTC 7-Abril-2016

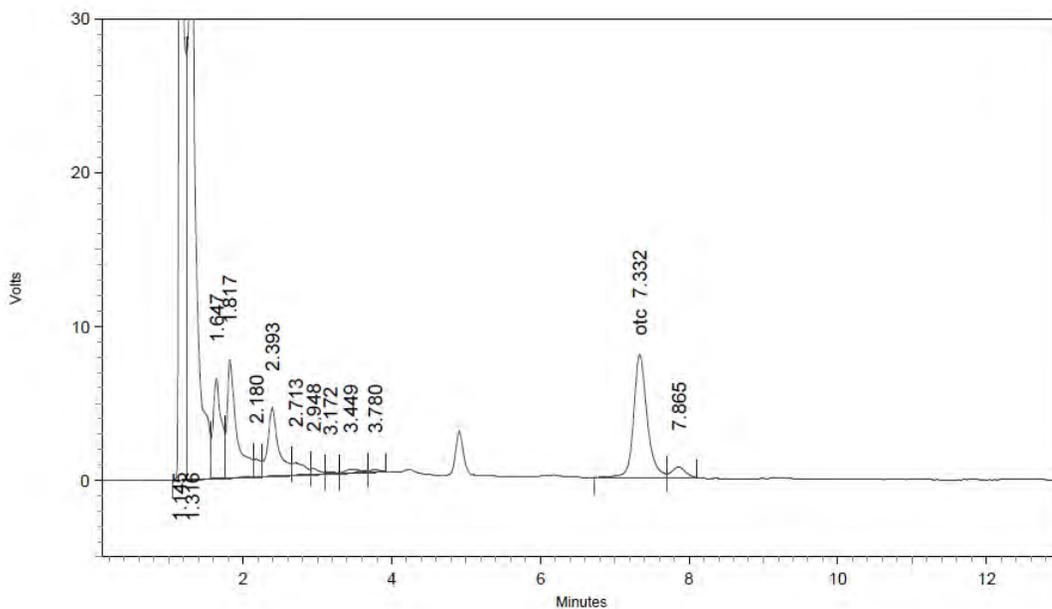


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.396	93761	9030.63



G9 OTC 7-Abril-2016

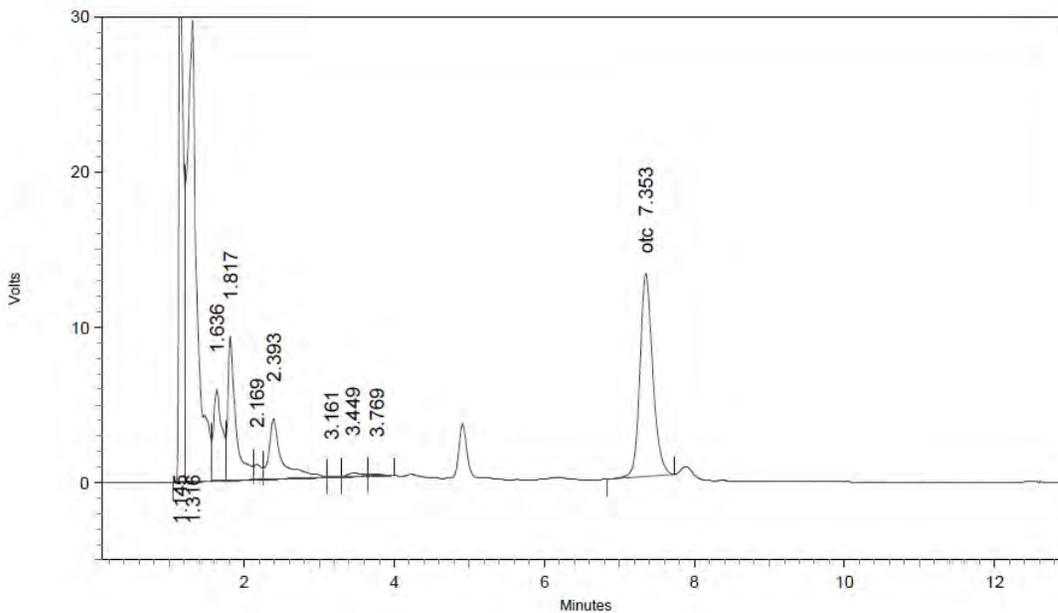


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.332	100640	8497.40



G10 OTC 7-Abril-2016

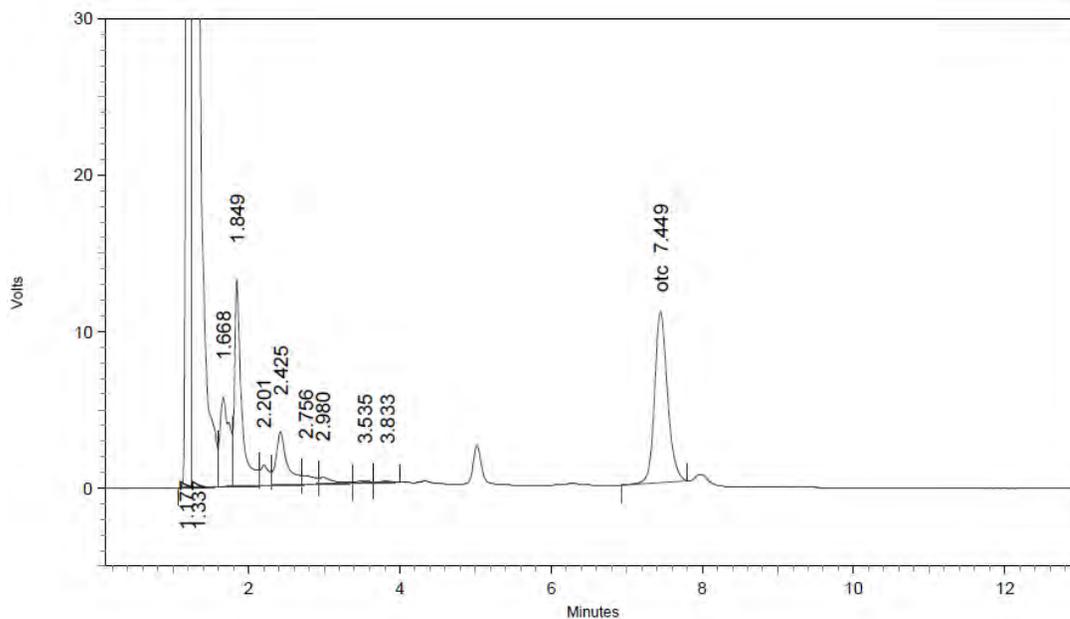


2: 355 mm, 8 mm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.353	155544	9038.03



H6 OTC 7-Abril-2016

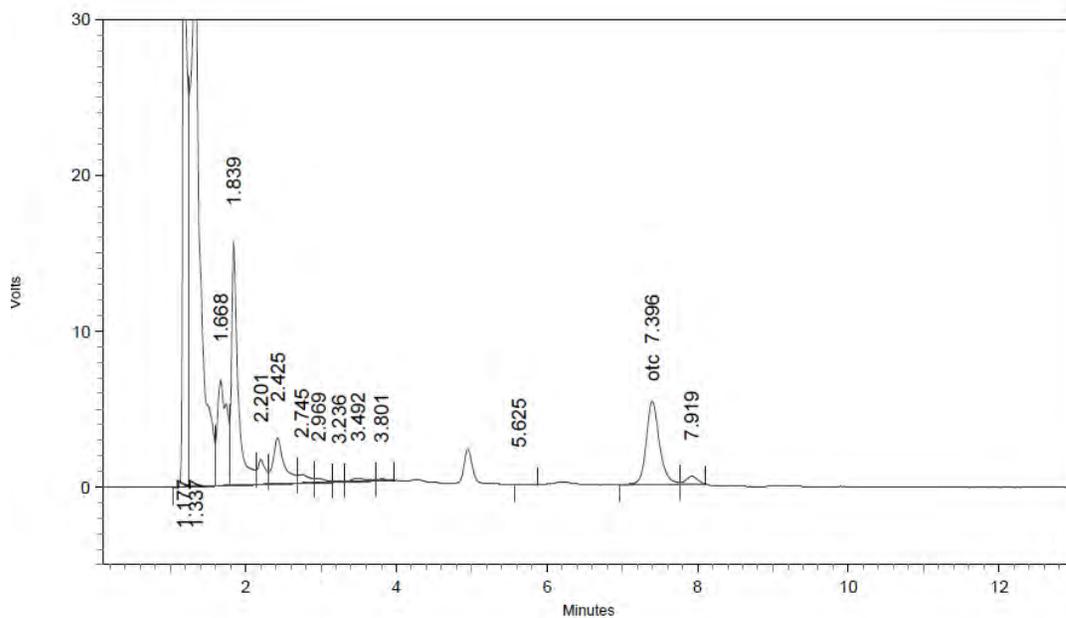


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.449	129789	9258.78



H7 OTC 7-Abril-2016

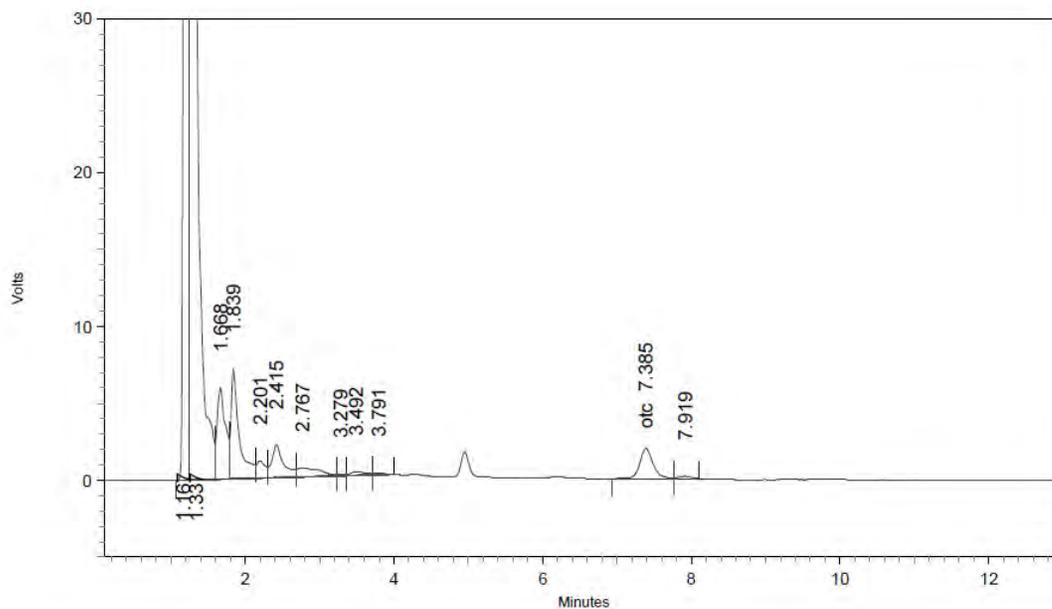


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.396	65473	9076.28



H8 OTC 7-Abril-2016

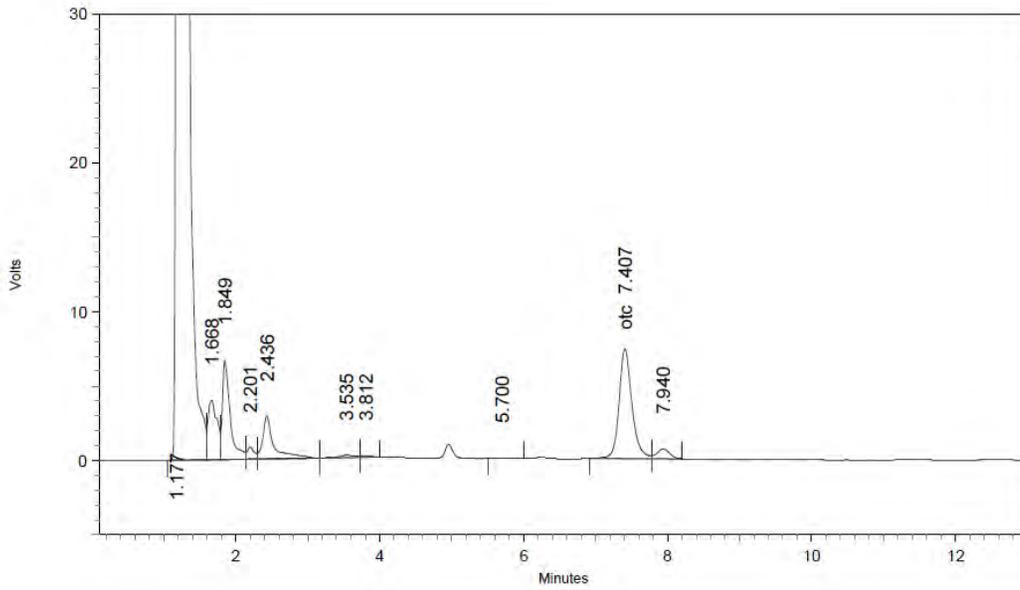


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.385	24509	8567.45



H9 OTC 7-Abril-2016

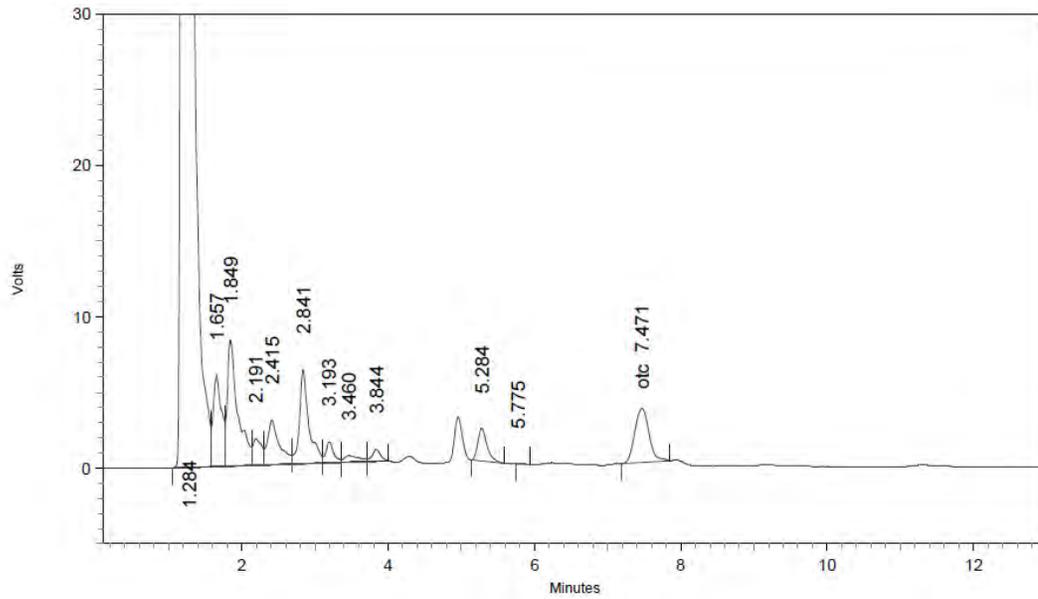


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.407	91736	8841.16



H10 OTC 7-Abril-2016

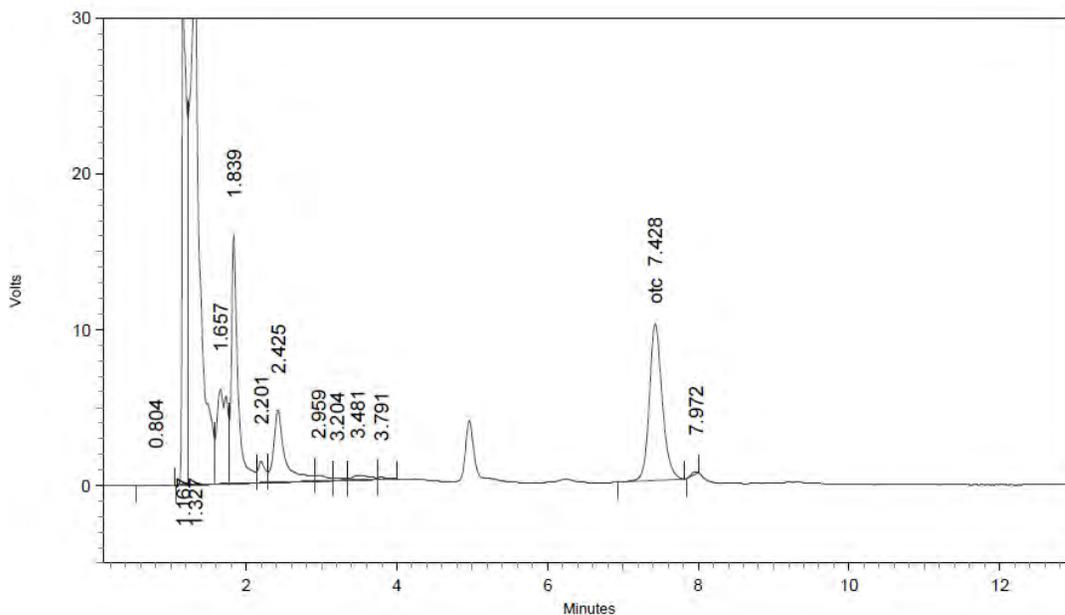


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.471	48392	7018.98



I6 OTC 7-Abril-2016

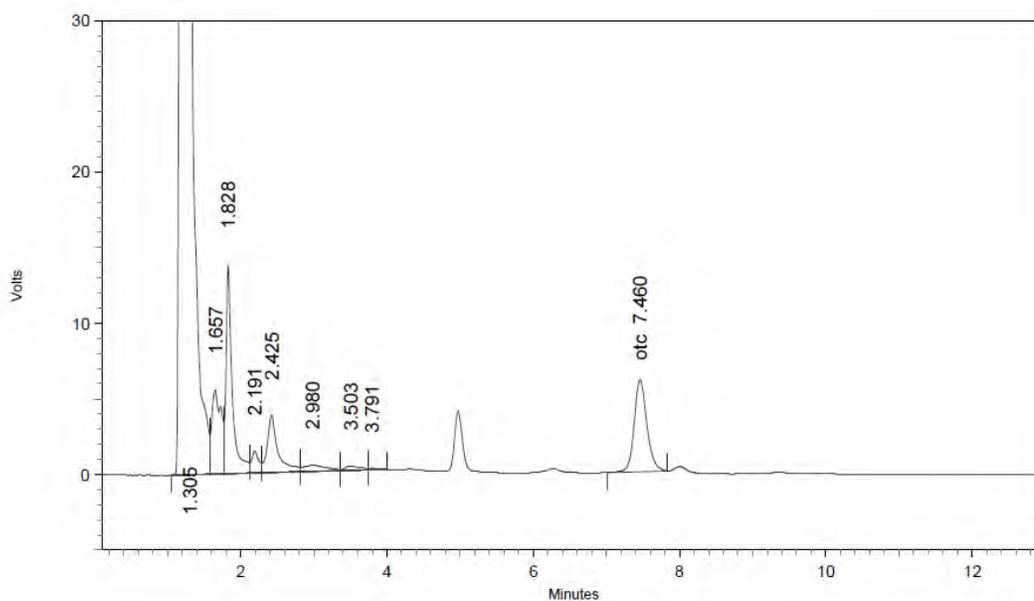


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.428	119610	9245.90



I7 OTC 7-Abril-2016

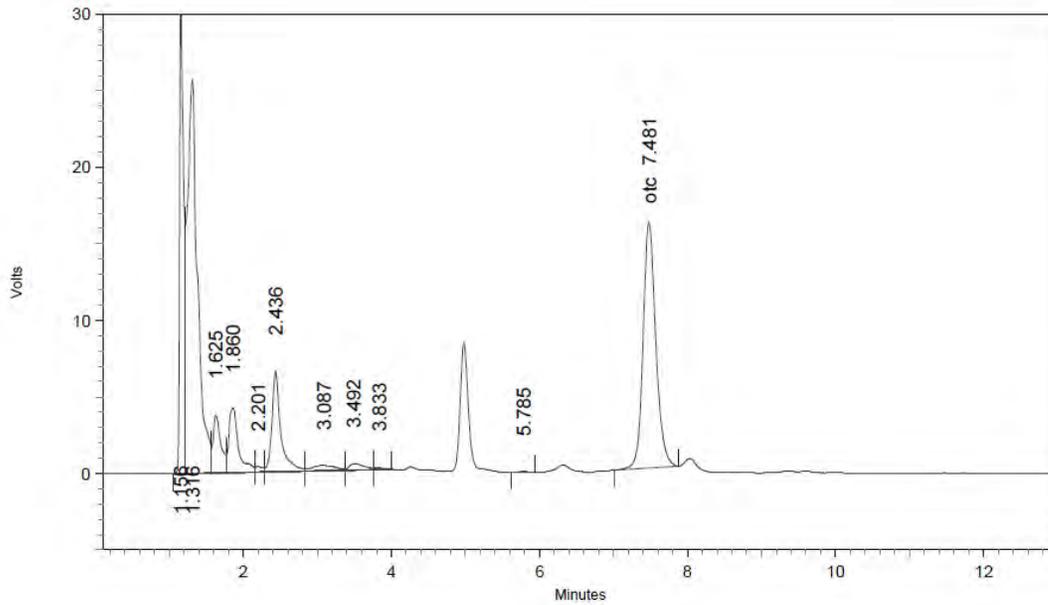


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.460	73068	9155.71



I8 OTC 7-Abril-2016

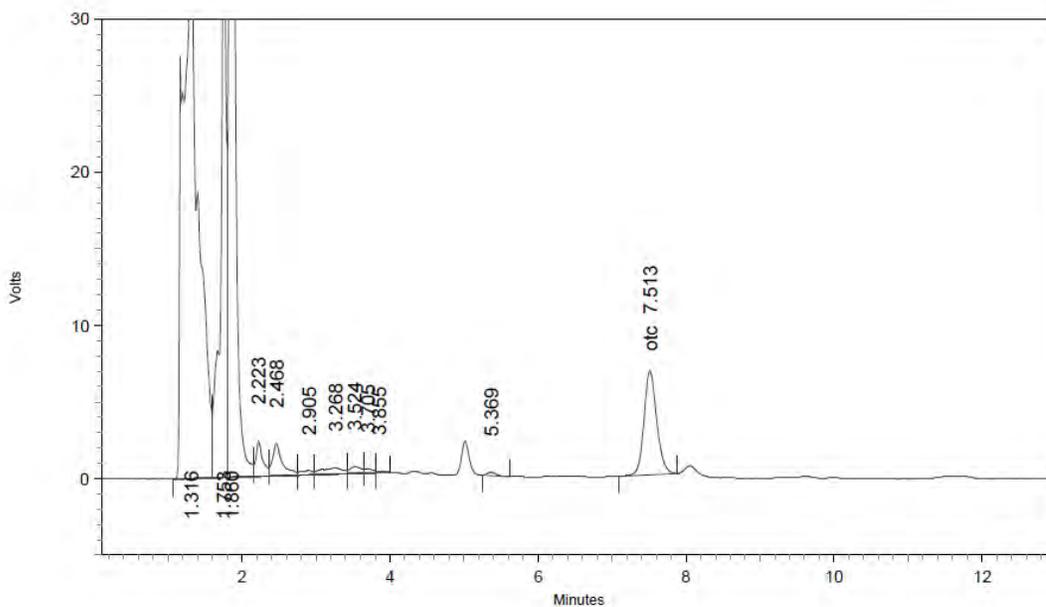


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.481	191610	9235.48



I9 OTC 7-Abril-2016

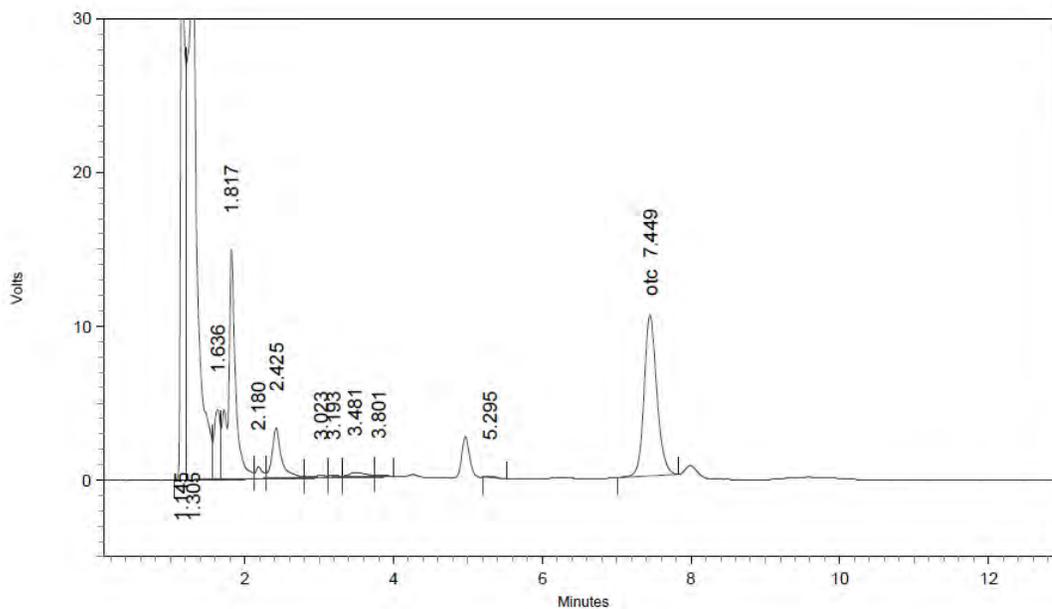


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.513	80908	9216.64



I10 OTC 7-Abril-2016

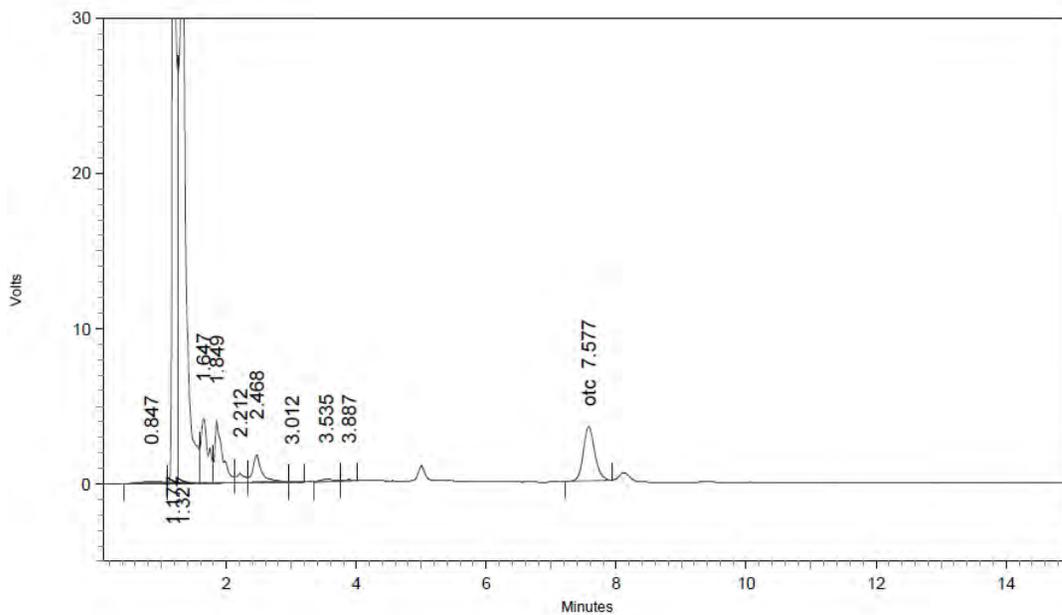


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.449	124748	9150.19



G-11 OTC 21-Abril-2016

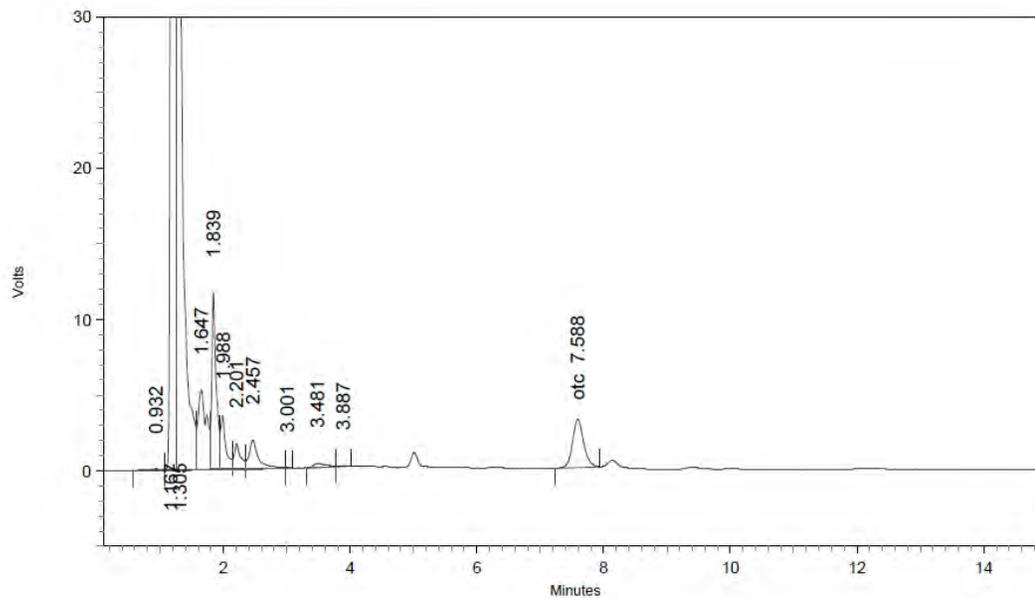


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.577	42810	9108.10



G-12 OTC 21-Abril-2016

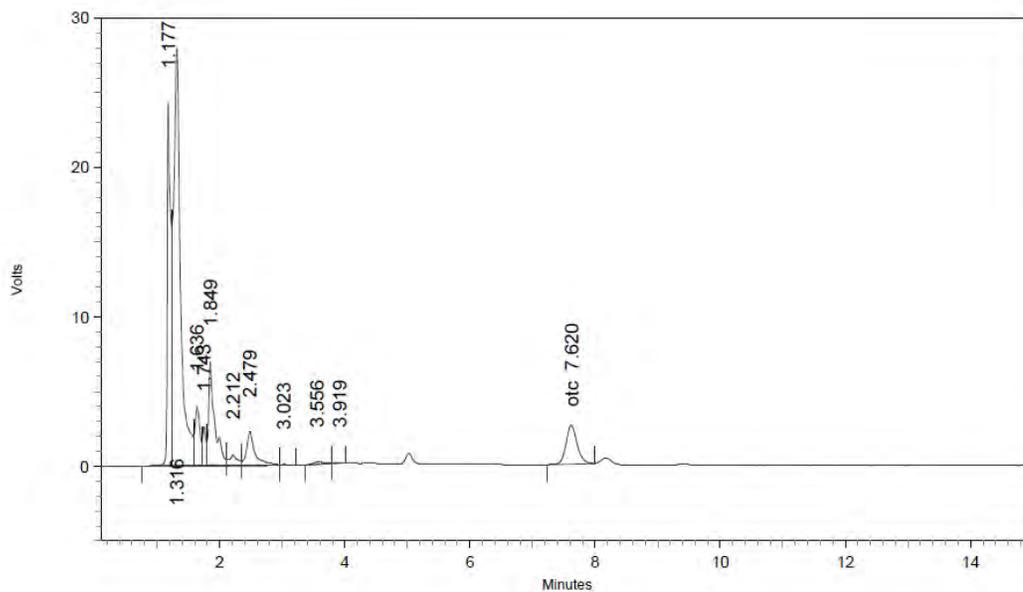


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.588	39365	8782.23



G-13 OTC 21-Abril-2016

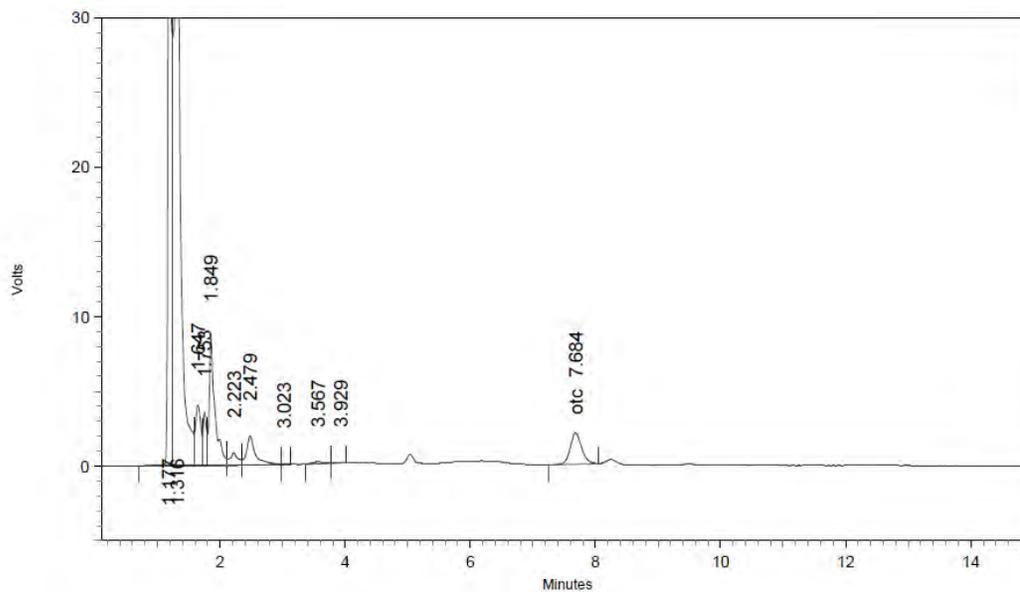


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.620	32023	9057.28



G-14 OTC 21-Abril-2016

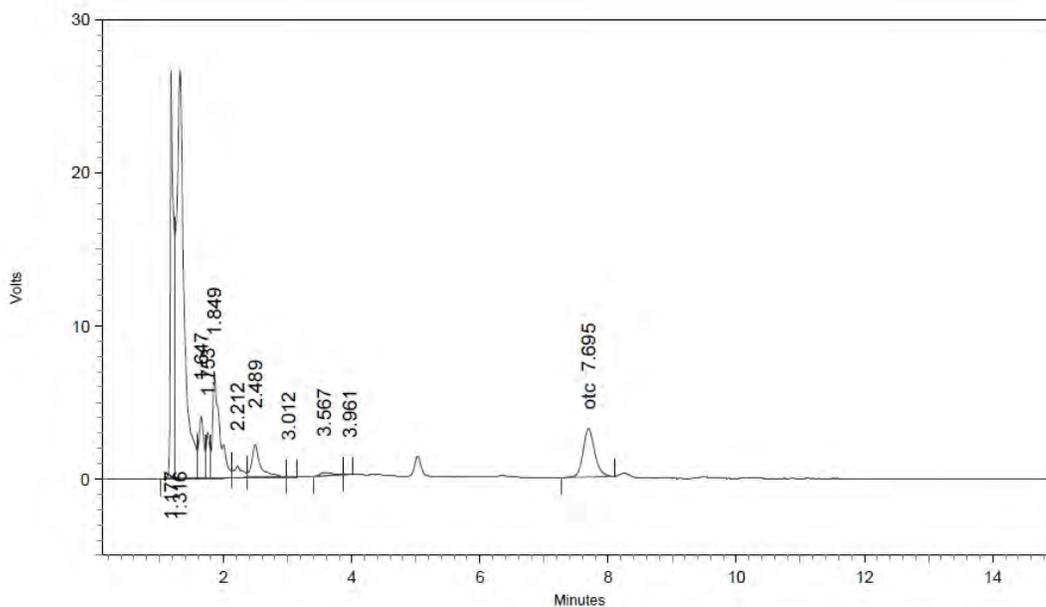


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.684	26436	8587.88



G-15 OTC 21-Abril-2016

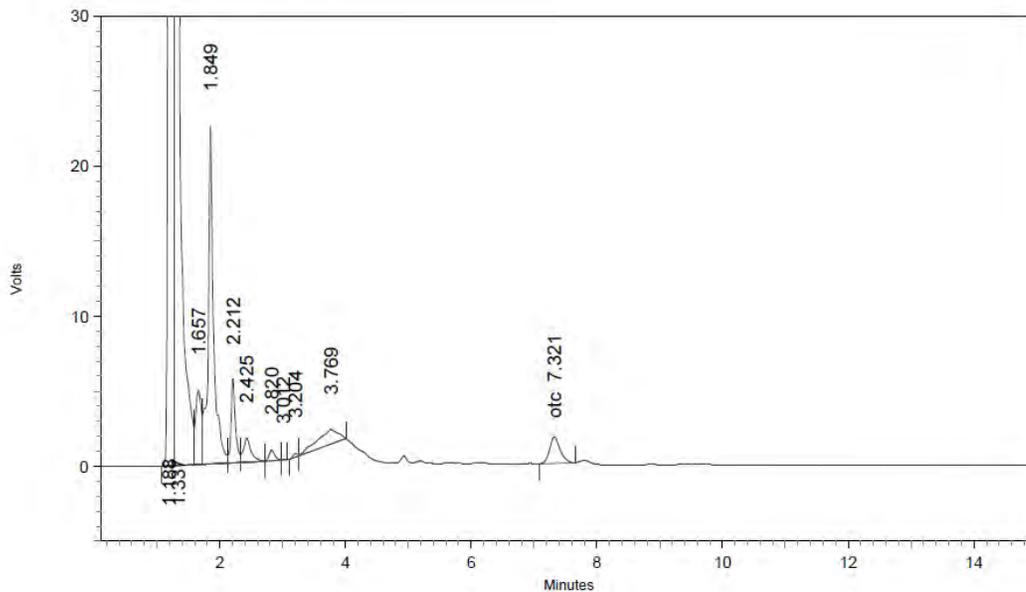


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.695	39736	9008.54



H-11 OTC 26-Abril-2016

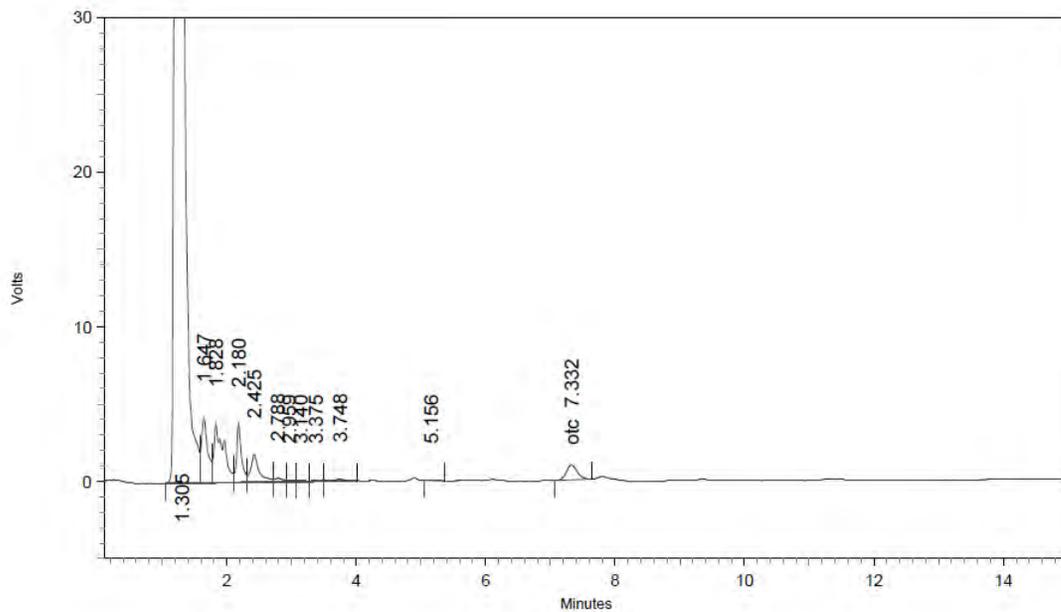


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.321	20275	9158.39



H-12 OTC 26-Abril-2016

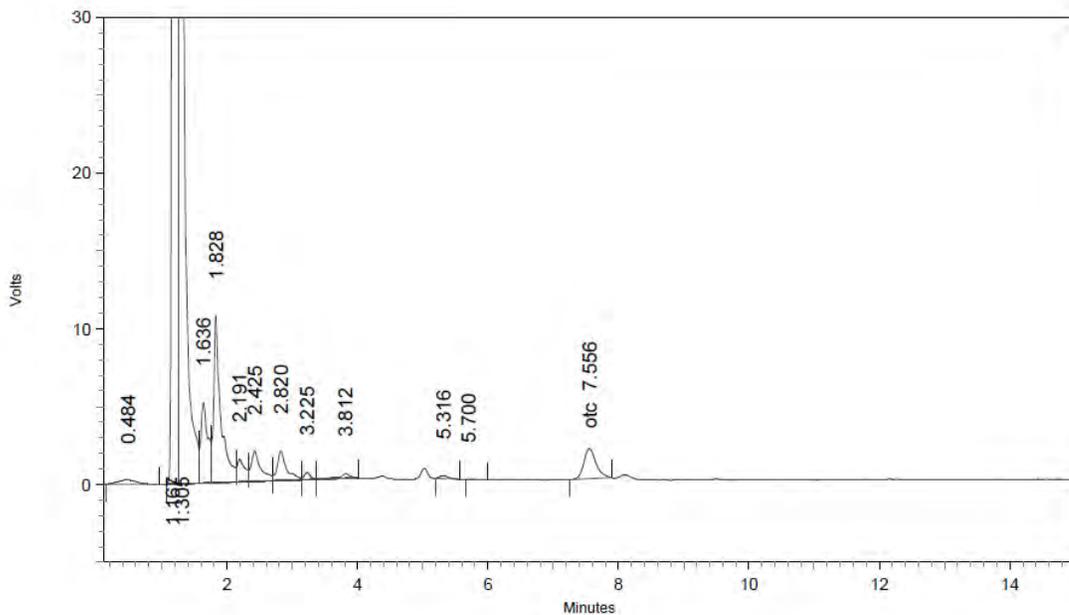


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.332	11458	9082.97



H-13 OTC 26-Abril-2016

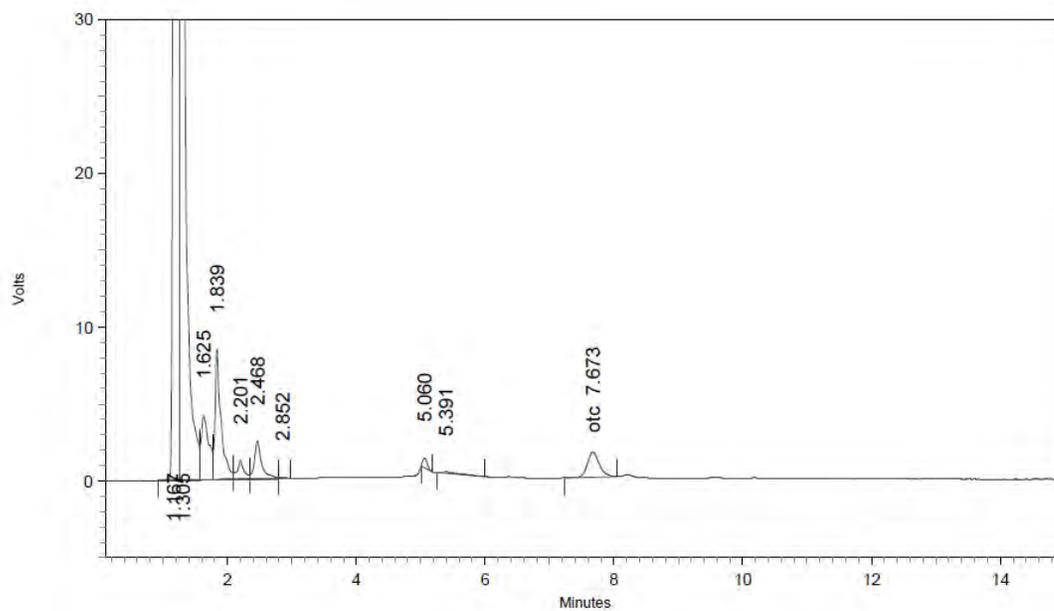


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.556	25094	8157.56



H-14 OTC 26-Abril-2016

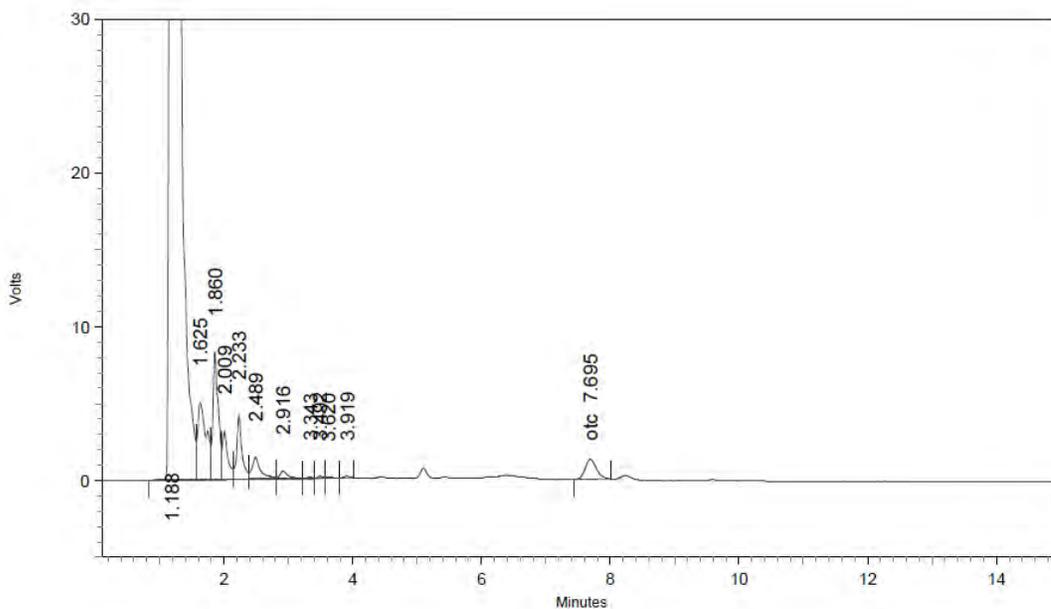


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.673	21335	8290.05



H-15 OTC 26-Abril-2016

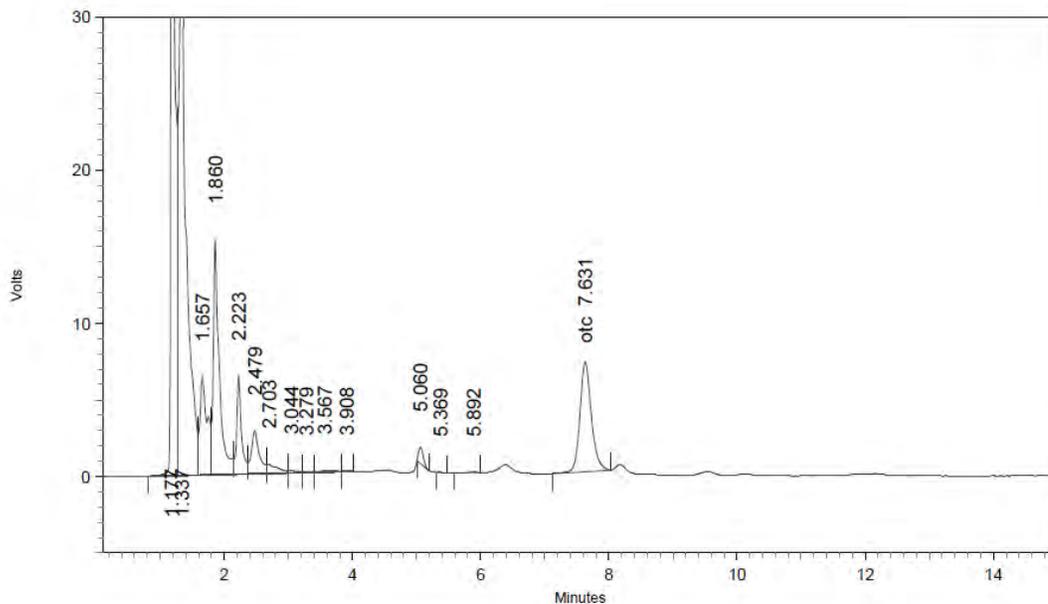


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.695	15899	8918.23



I-11 OTC 26-Abril-2016

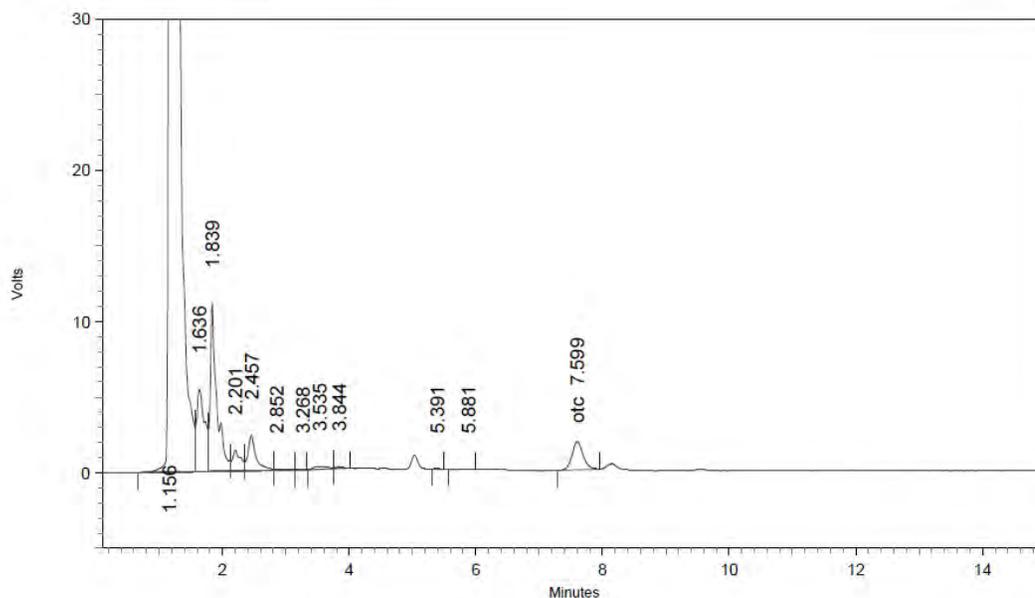


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.631	88757	8819.04



I-12 OTC 26-Abril-2016

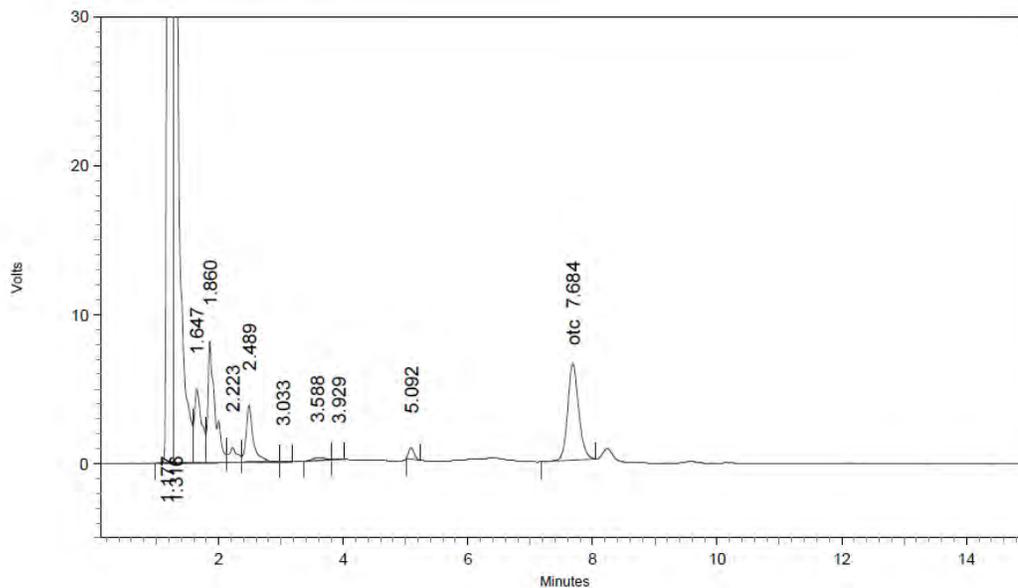


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.599	22530	8999.55



I-13 OTC 26-Abril-2016

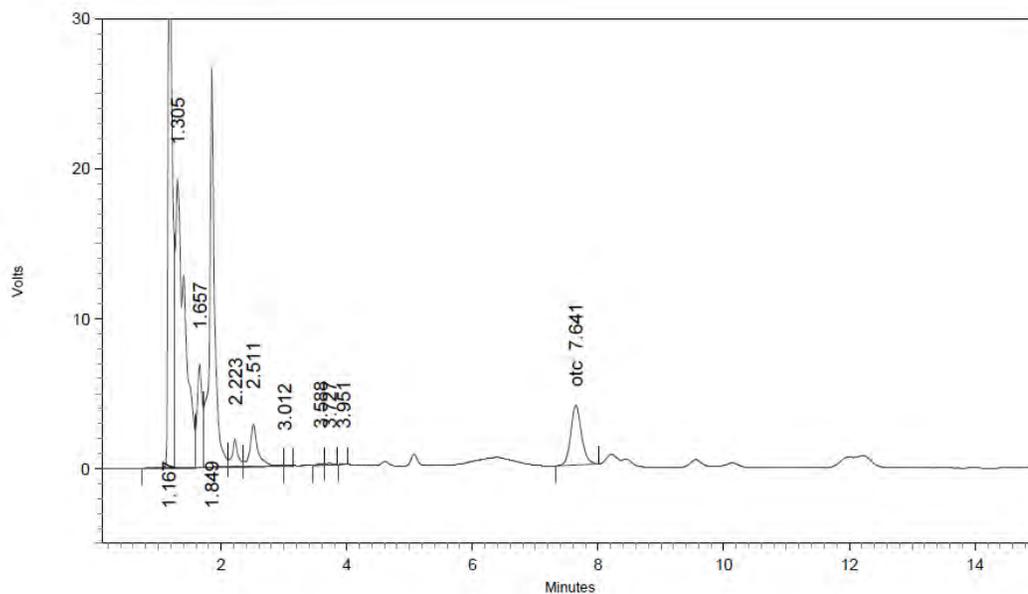


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.684	79778	9251.98



I-14 OTC 26-Abril-2016

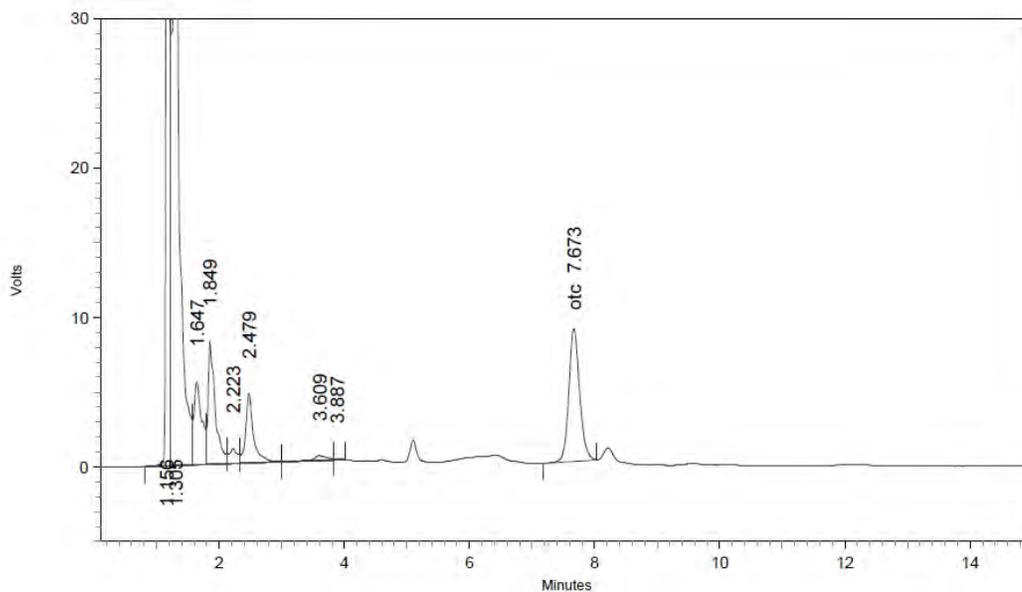


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.641	47039	9526.13



I-15 OTC 26-Abril-2016

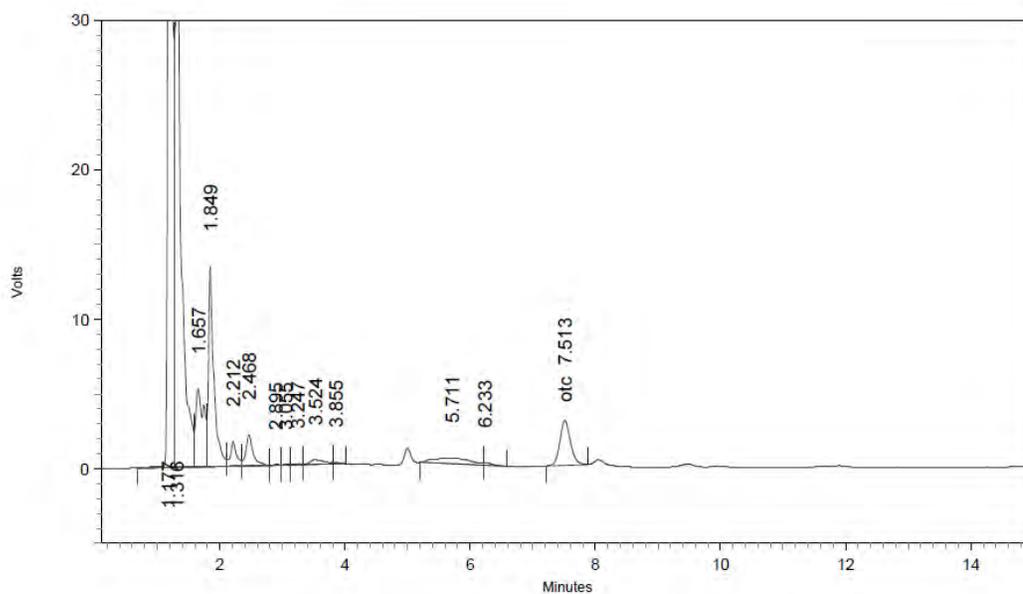


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.673	106867	9532.81



G-16 OTC 28-Abril-2016

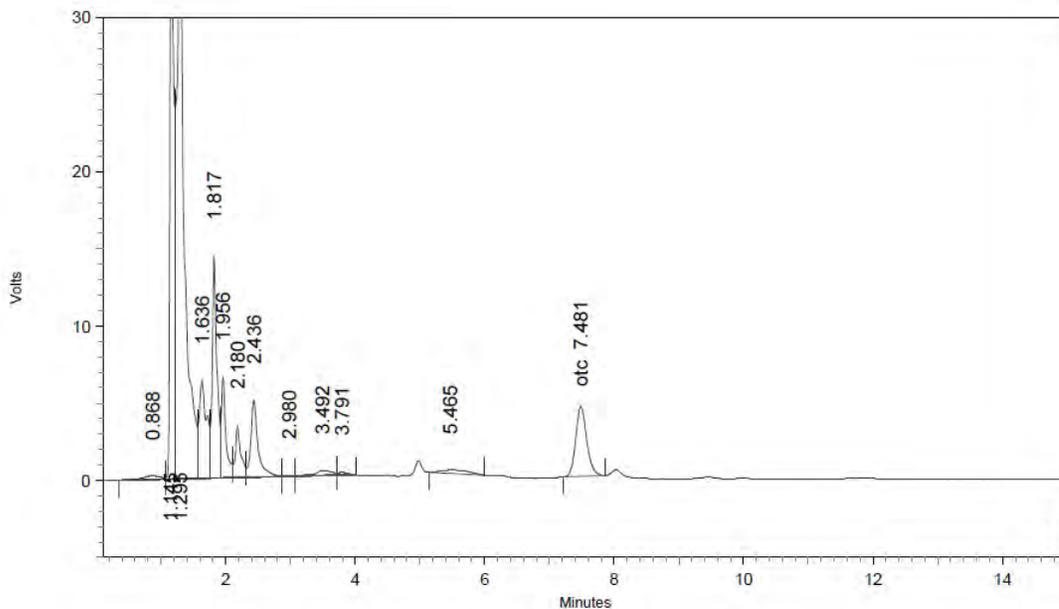


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.513	35306	9372.65



G-17 OTC 28-Abril-2016

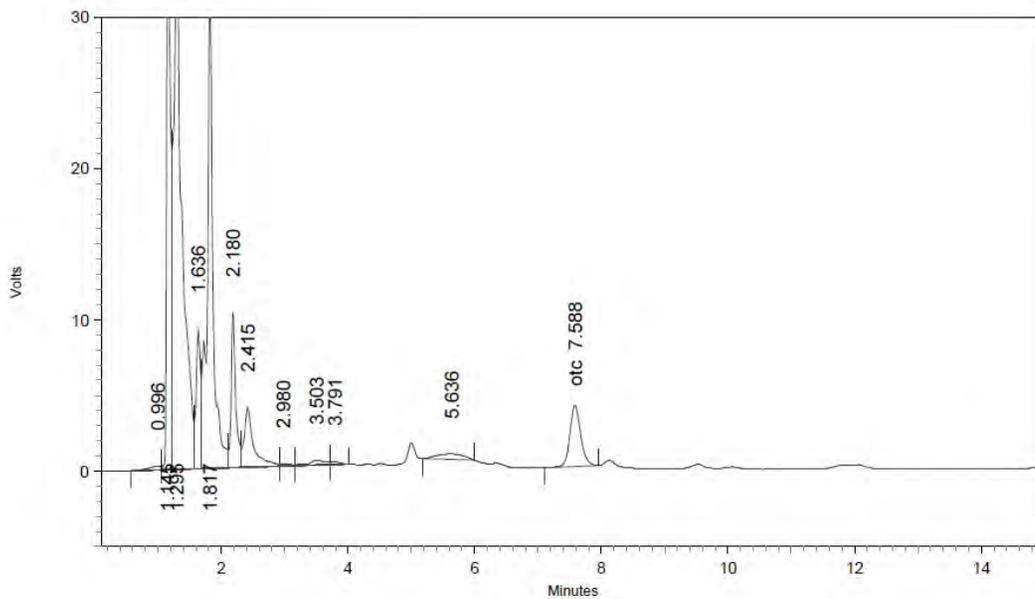


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.481	53733	9273.37



G-18 OTC 28-Abril-2016

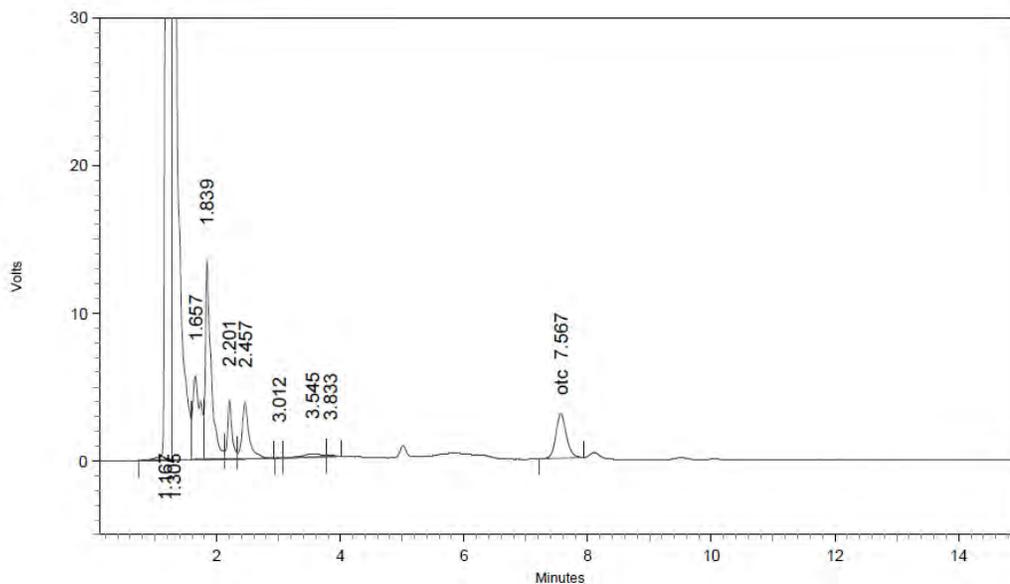


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.588	48098	9521.08



H-16 OTC 28-Abril-2016

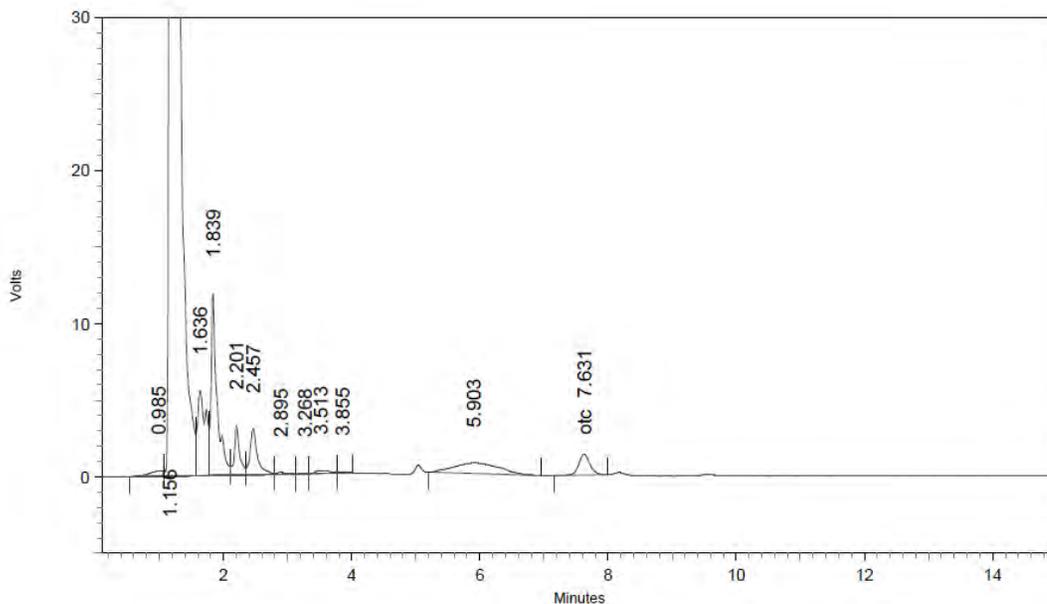


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.567	35534	9463.68



H-17 OTC 28-Abril-2016

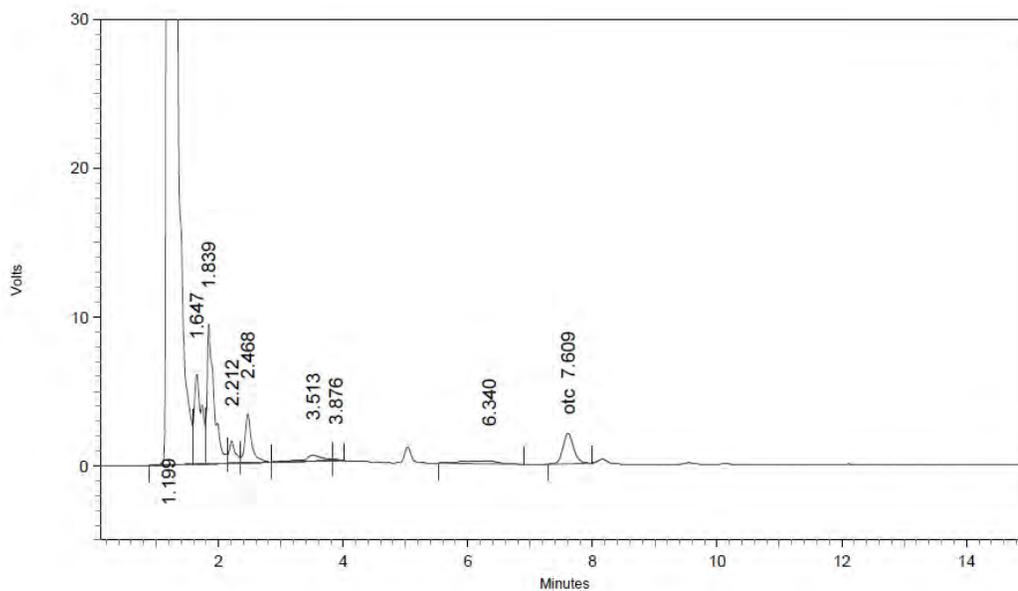


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.631	16573	9214.53



H-18 OTC 28-Abril-2016

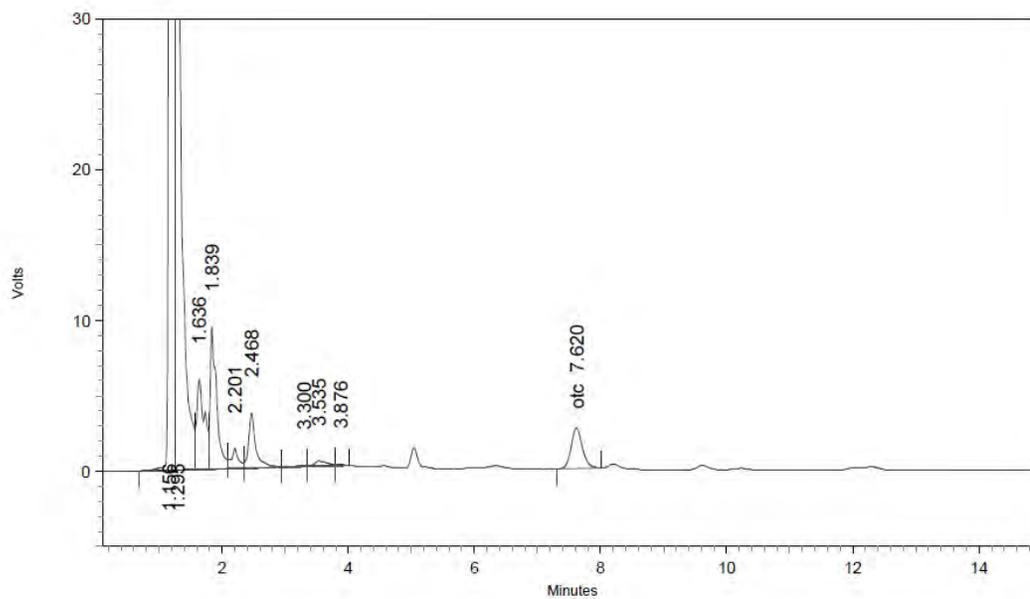


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.609	24474	9388.15



H-19 OTC 28-Abril-2016

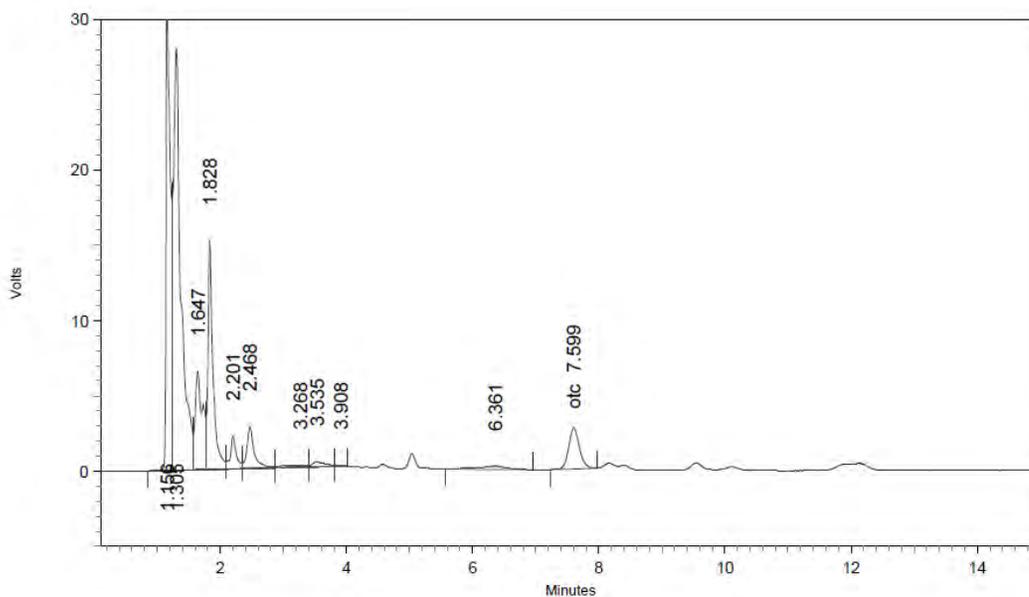


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.620	33314	8832.09



H-20 OTC 28-Abril-2016

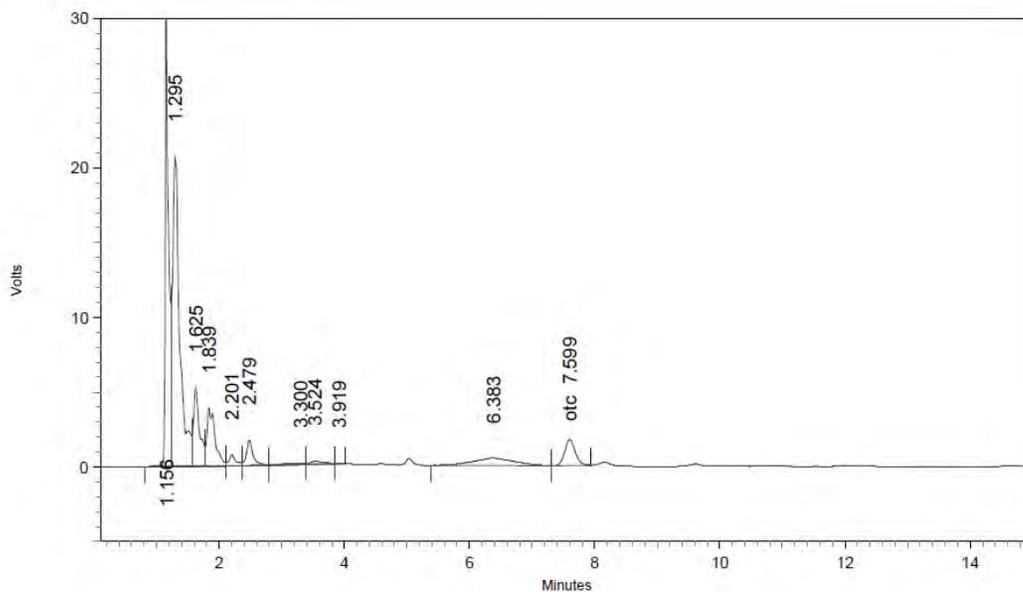


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.599	32138	9443.56



I-16 OTC 28-Abril-2016

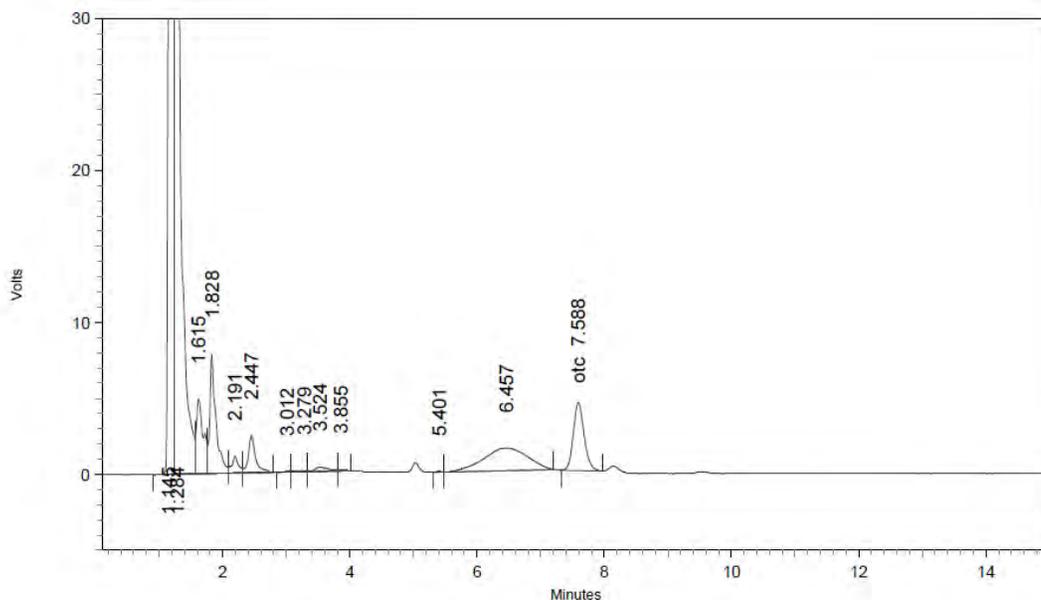


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.599	20202	9908.31



I-17 OTC 28-Abril-2016

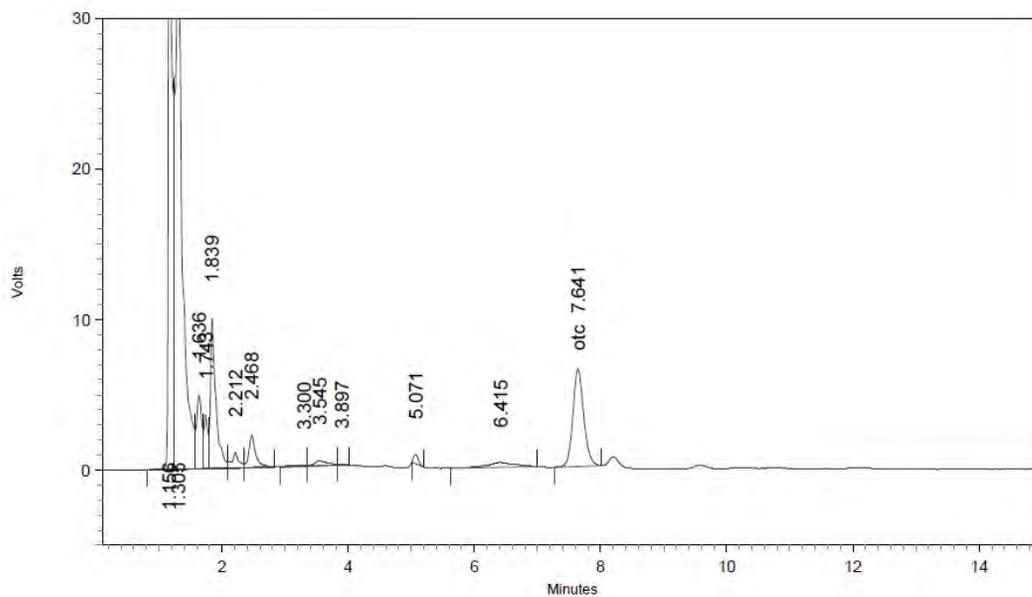


2: 355 nm. 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.588	53039	9392.98



I-18 OTC 28-Abril-2016

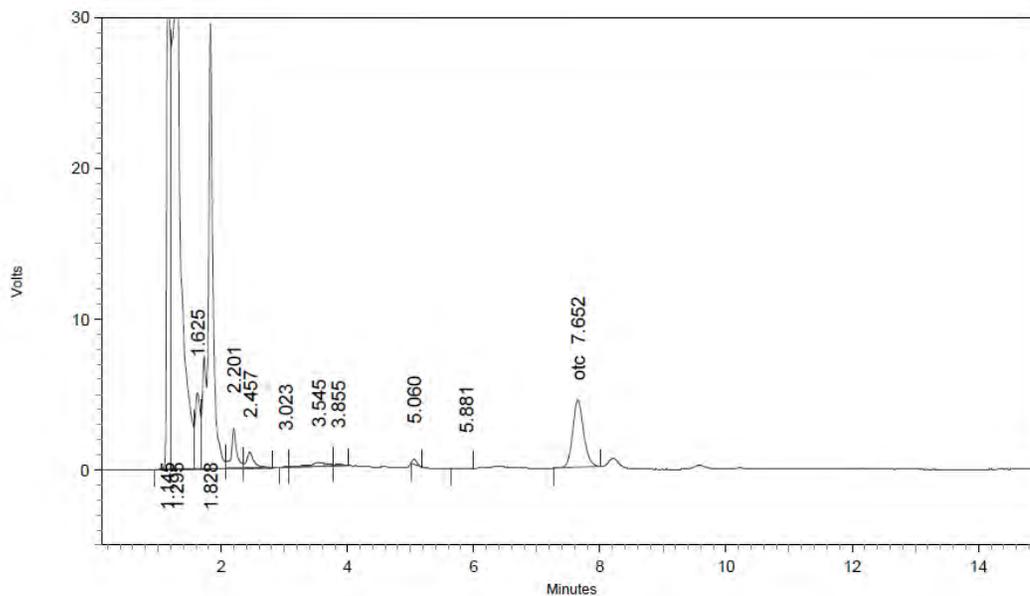


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.641	77457	9456.64



I-19 OTC 28-Abril-2016

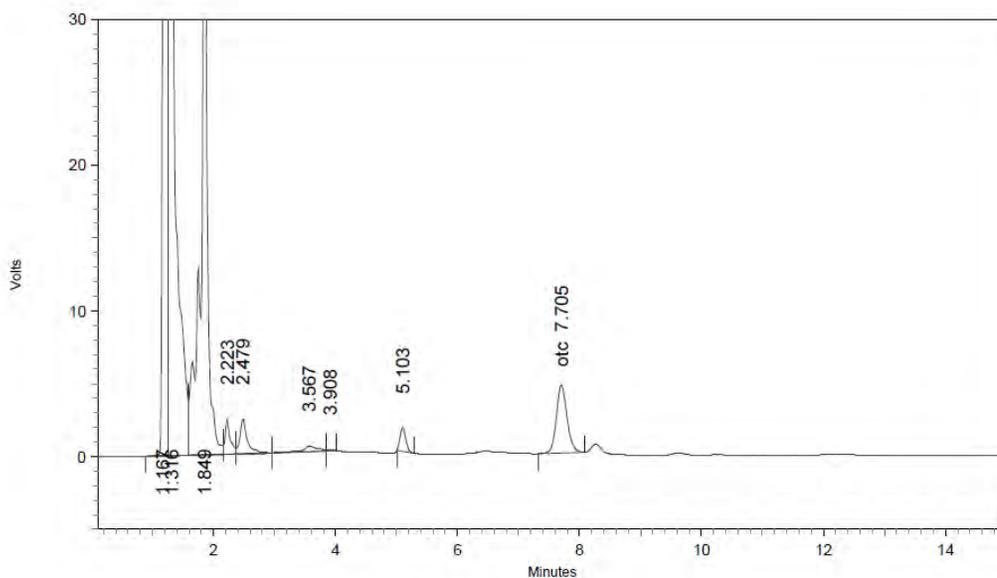


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.652	53808	9323.64



I-20 OTC 28-Abril-2016



2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.705	56745	9428.47



Anexo 8.7. Resultados de OTC en piel-m3sculo de Trucha para el c3lculo de la curva de depleci3n de Liguamicina en condiciones controladas

Fecha an3lisis	Nº Mx	D3as post- inyecci3n	3rea	Conc obtenida ng/g
21/06/2016	AJ1	30	54.076	433,9
21/06/2016	AJ2	30	40.223	322,1
21/06/2016	AJ3	30	3.391	24,4
21/06/2016	AJ4	30	53.210	423,5
21/06/2016	AJ5	30	45.232	348,6
22/06/2016	AK1	30	24.696	191,0
22/06/2016	AK2	30	44.116	352,8
22/06/2016	AK3	30	30.550	235,1
22/06/2016	AK4	30	72.617	577,8
22/06/2016	AK5	30	53.972	427,9
21/06/2016	AJ6	38	76.684	589,3
21/06/2016	AJ7	38	23.435	181,5
21/06/2016	AJ8	38	38.630	292,3
21/06/2016	AJ9	38	40.234	313,4
21/06/2016	AJ10	38	24.795	187,8
09/06/2016	AK6	38	82.003	636,4
09/06/2016	AK7	38	93.538	729,1
09/06/2016	AK8	38	59.420	466,8
09/06/2016	AK9	38	17.350	134,5
09/06/2016	AK10	38	32.805	247,4
21/06/2016	AJ11	44	21.330	163,7
22/06/2016	AJ12	44	28.846	226,6
22/06/2016	AJ13	44	44.758	357,3
22/06/2016	AJ14	44	29.415	224,1
22/06/2016	AJ15	44	26.032	207,6
22/06/2016	AK11	44	40.759	318,1

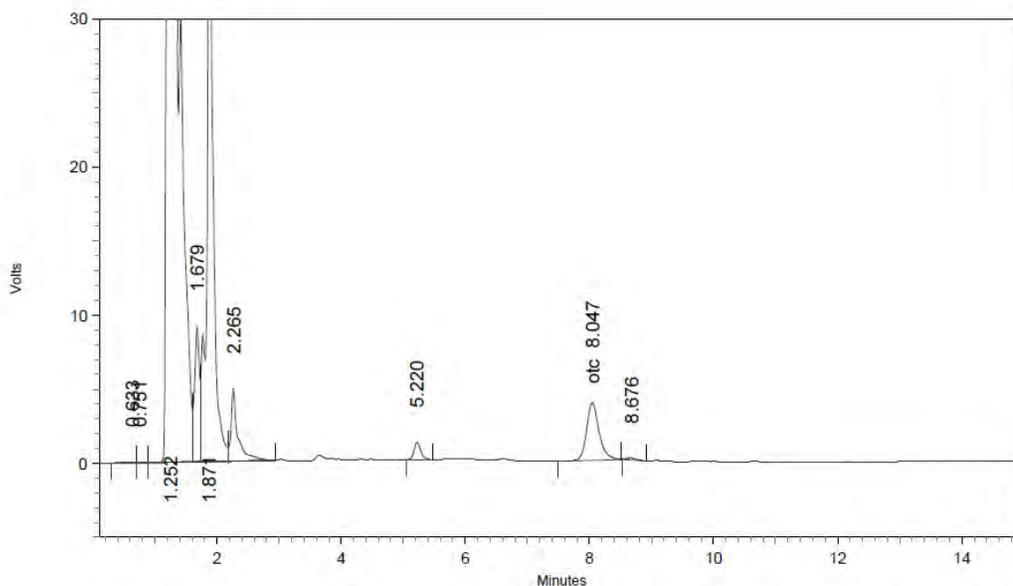


22/06/2016	AK12	44	31.117	245,6
22/06/2016	AK13	44	19.569	153,2
22/06/2016	AK14	44	17.381	132,7
22/06/2016	AK15	44	15.838	119,8
22/06/2016	AJ16	55	5.853	44,7
22/06/2016	AJ17	55	16.409	125,4
22/06/2016	AJ18	55	11.407	86,6
22/06/2016	AJ19	55	18.658	144,9
22/06/2016	AJ20	55	38.215	292,4
22/06/2016	AK16	55	24.334	187,1
22/06/2016	AK17	55	450	12,5
23/06/2016	AK18	55	59.837	456,6
23/06/2016	AK19	55	23.225	177,4
23/06/2016	AK20	55	37.229	288,1



Anexo 8.8. Cromatogramas de curva de depleci3n Liquamicina trucha, condiciones controladas

AJ-1 OTC 21 Junio-2016

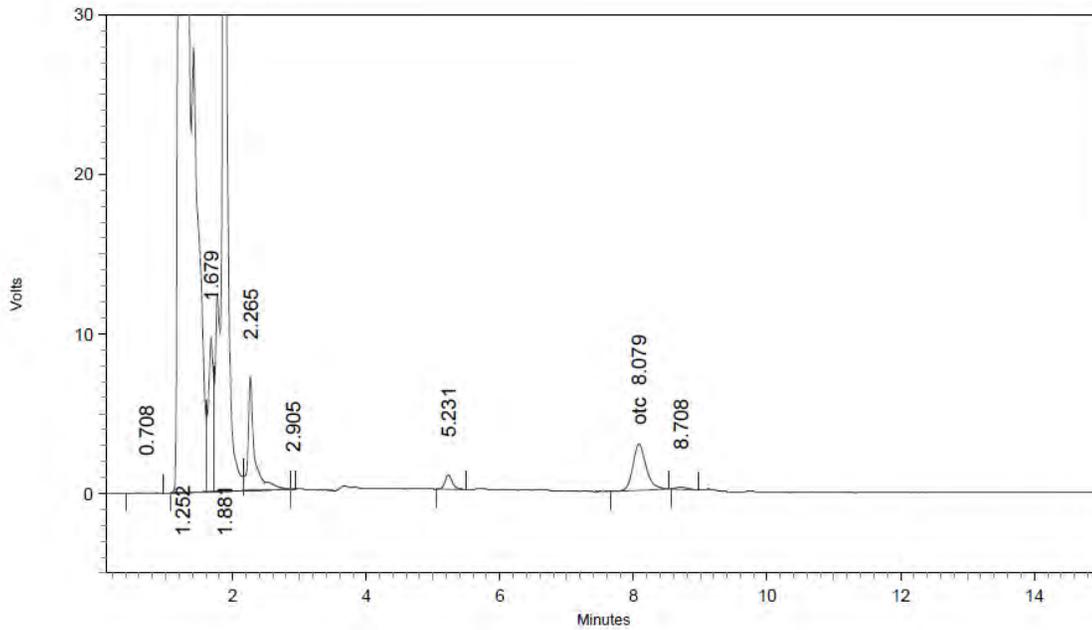


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.047	54076	8101.05



AJ-2 OTC 21 Junio-2016

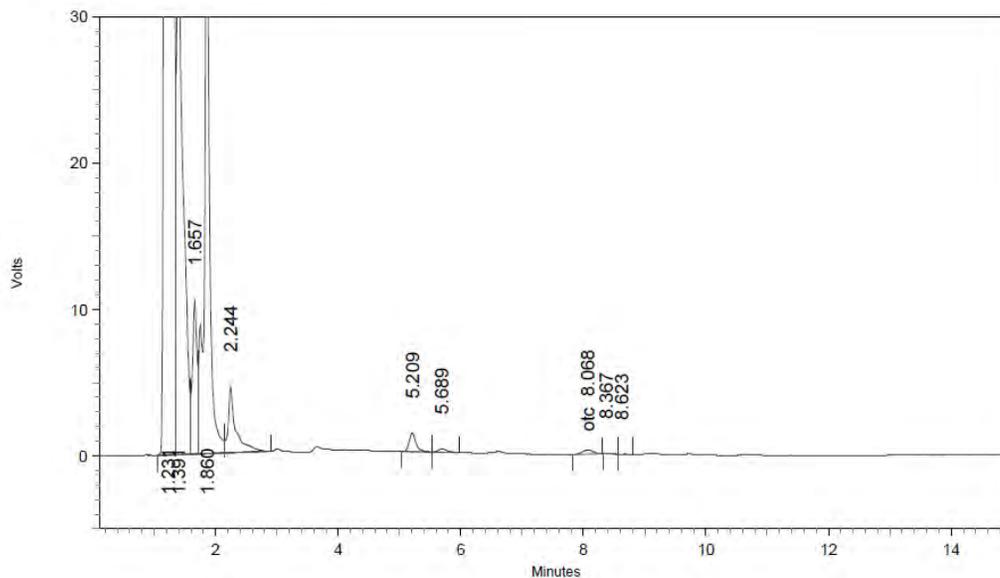


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.079	40223	8198.29



AJ-3 OTC 21 Junio-2016

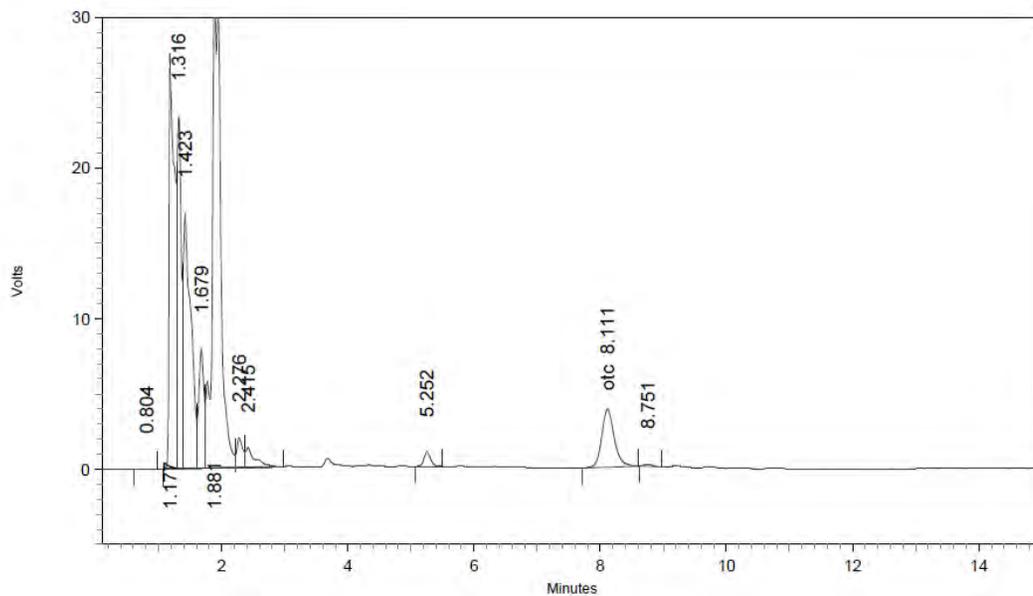


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.068	3391	9695.46



AJ-4 OTC 21 Junio-2016

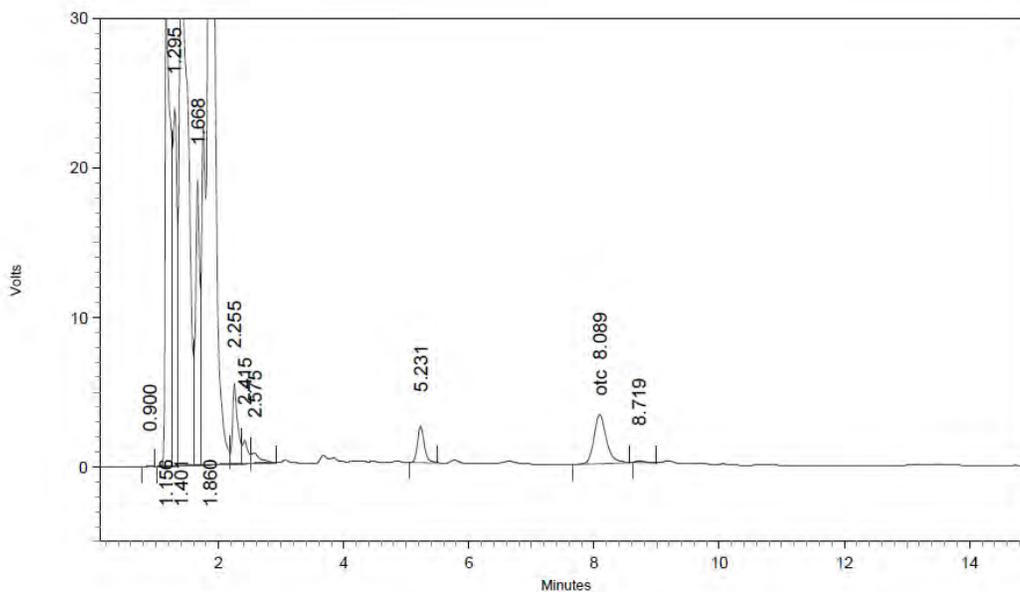


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.111	53210	8477.78



AJ-5 OTC 21 Junio-2016

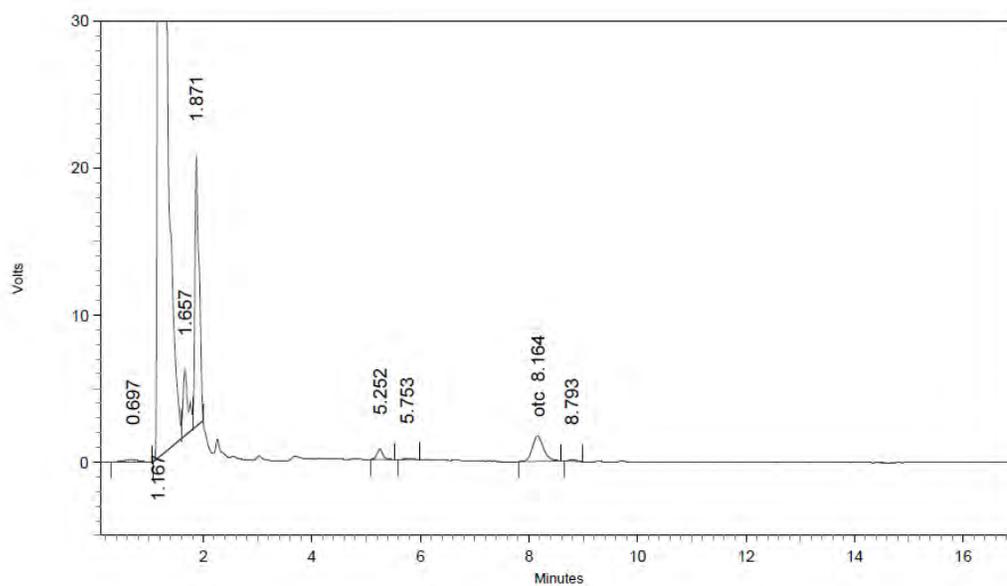


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.089	45232	8361.49



AK-1 OTC 22-Junio-2016

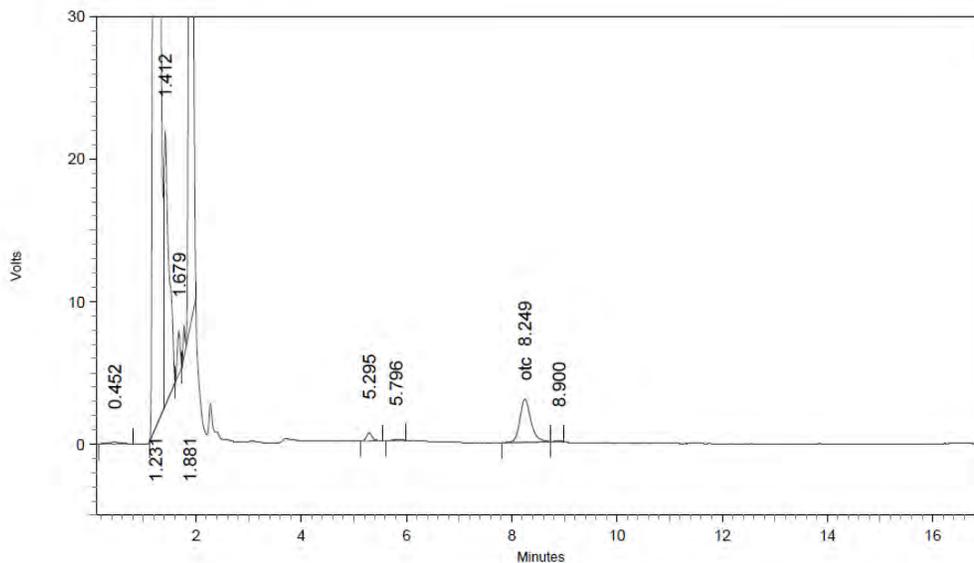


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.164	24696	7680.63



AK-2 OTC 22-Junio-2016

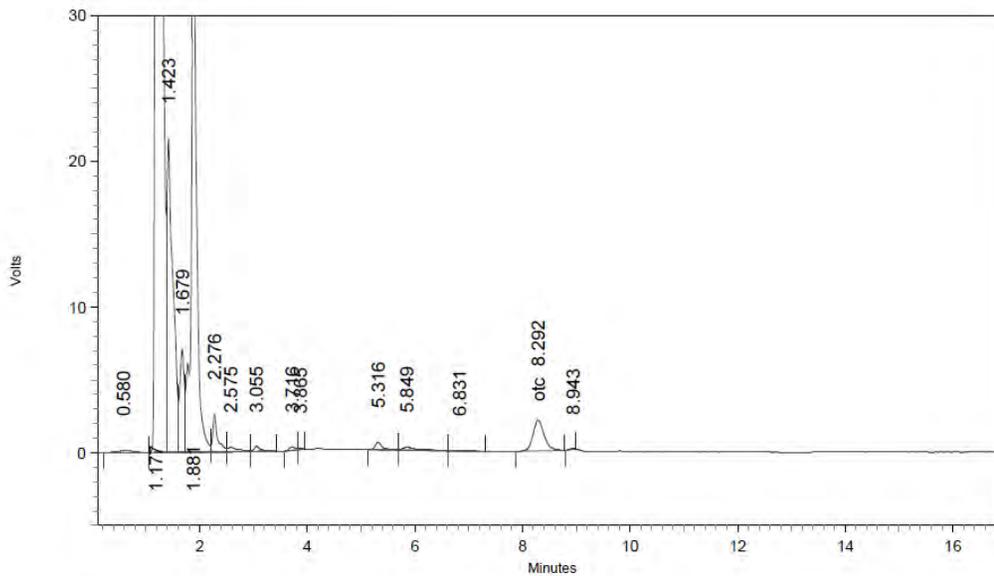


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.249	44116	8012.81



AK-3 OTC 22-Junio-2016

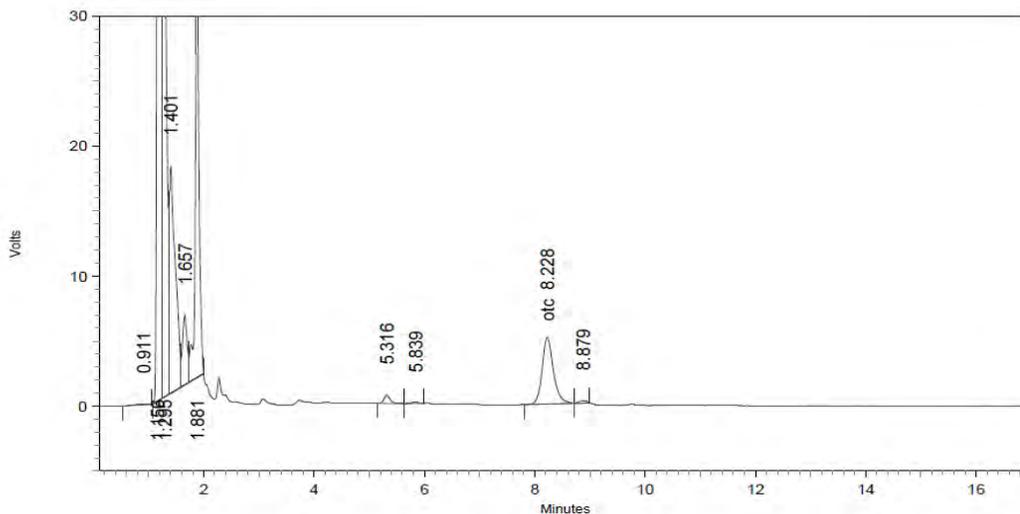


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.292	30550	7990.43



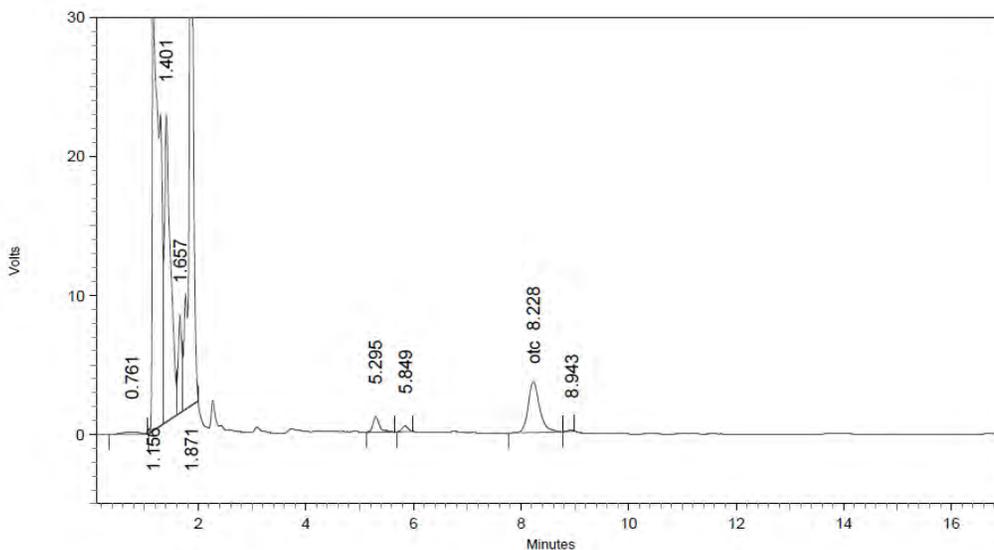
AK-4 OTC 22-Junio-2016



2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.228	72617	8154.34

AK-5 OTC 22-Junio-2016

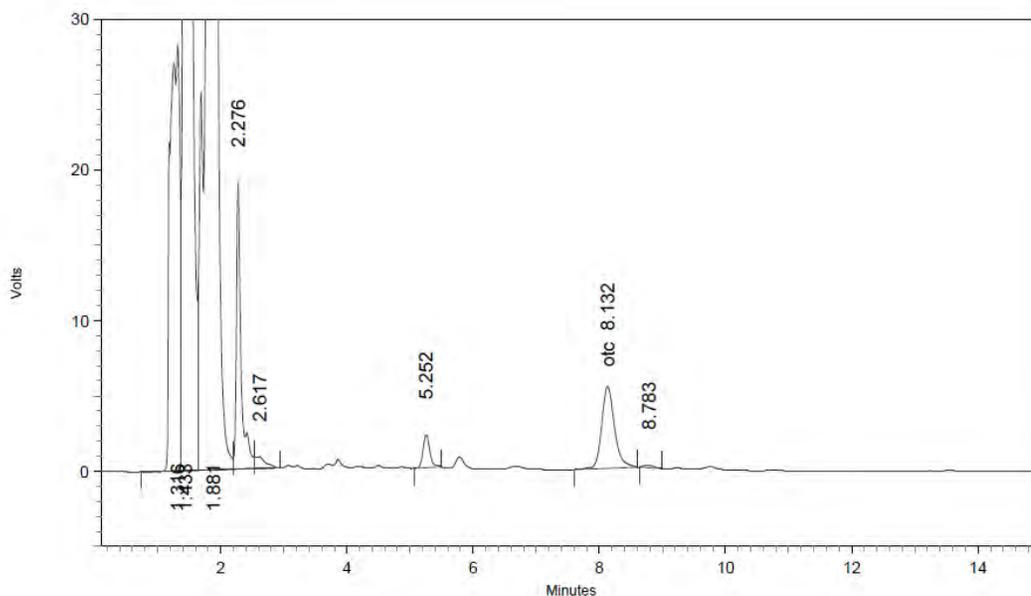


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.228	53972	7514.34



AJ-6 OTC 21 Junio-2016

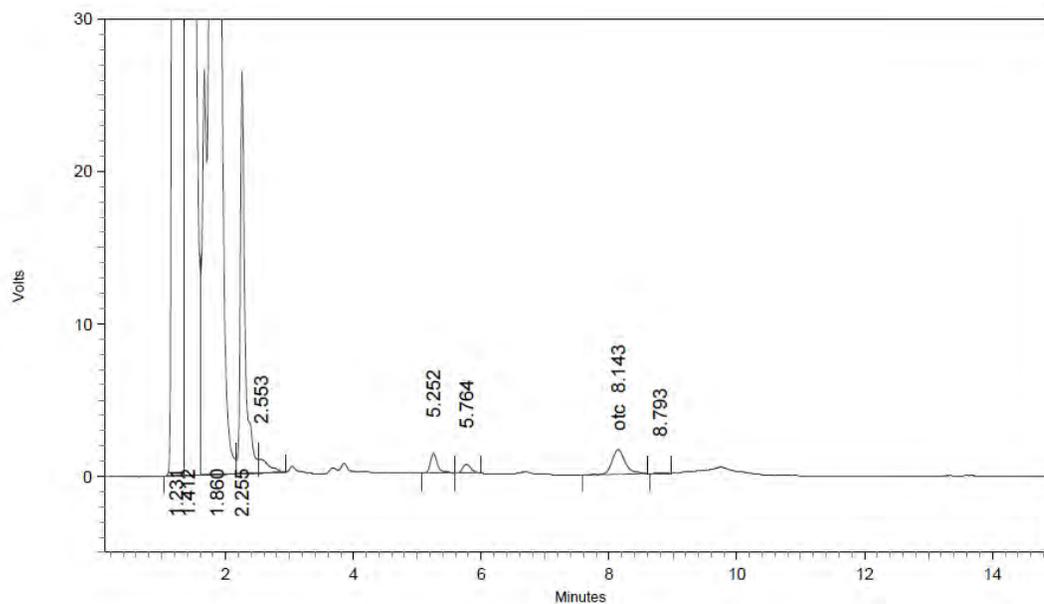


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.132	76684	8181.43



AJ-7 OTC 21 Junio-2016

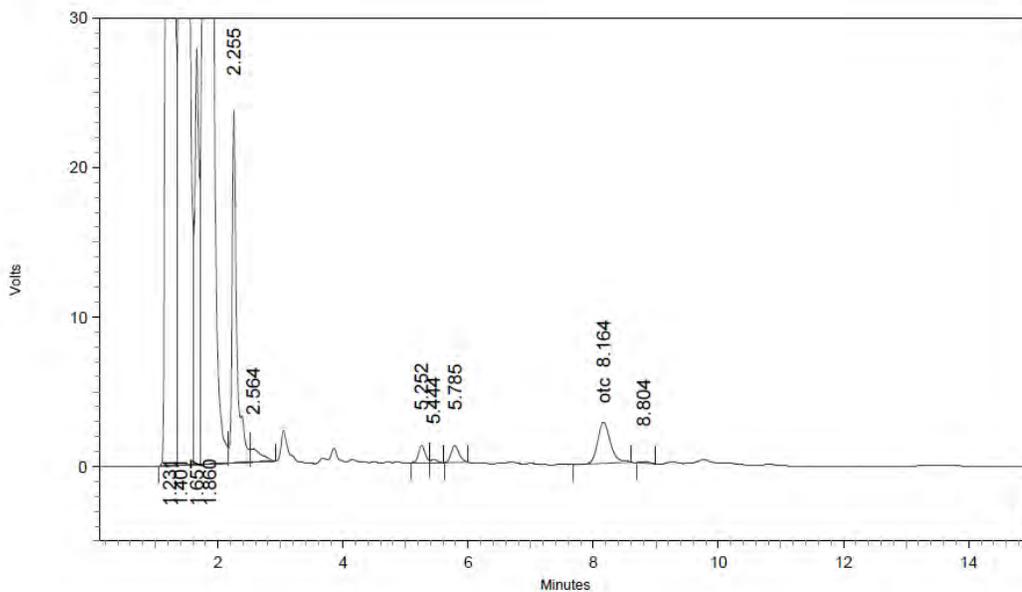


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.143	23435	7852.31



AJ-8 OTC 21 Junio-2016

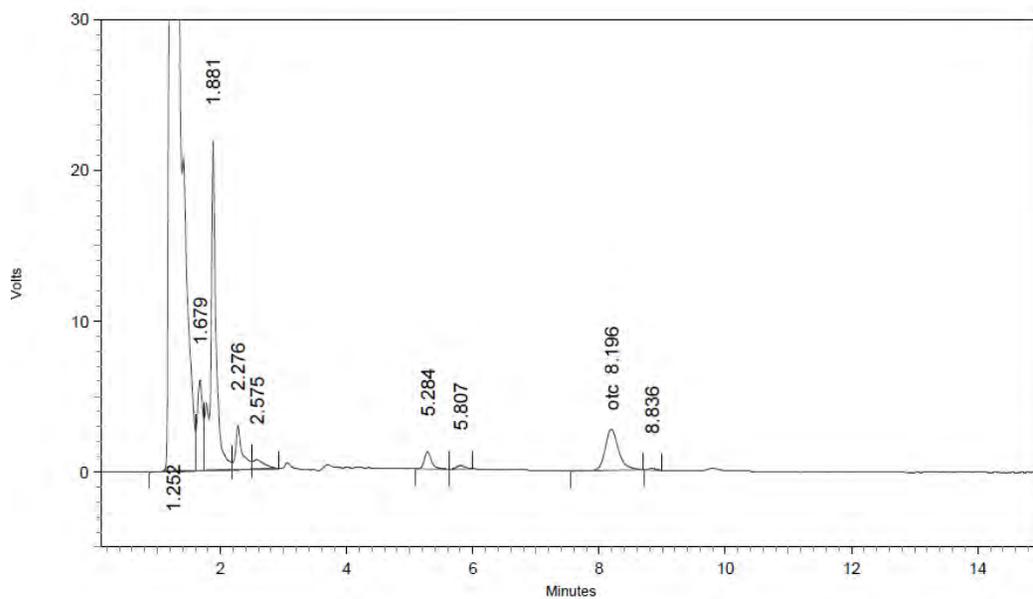


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.164	38630	7842.31



AJ-9 OTC 21 Junio-2016

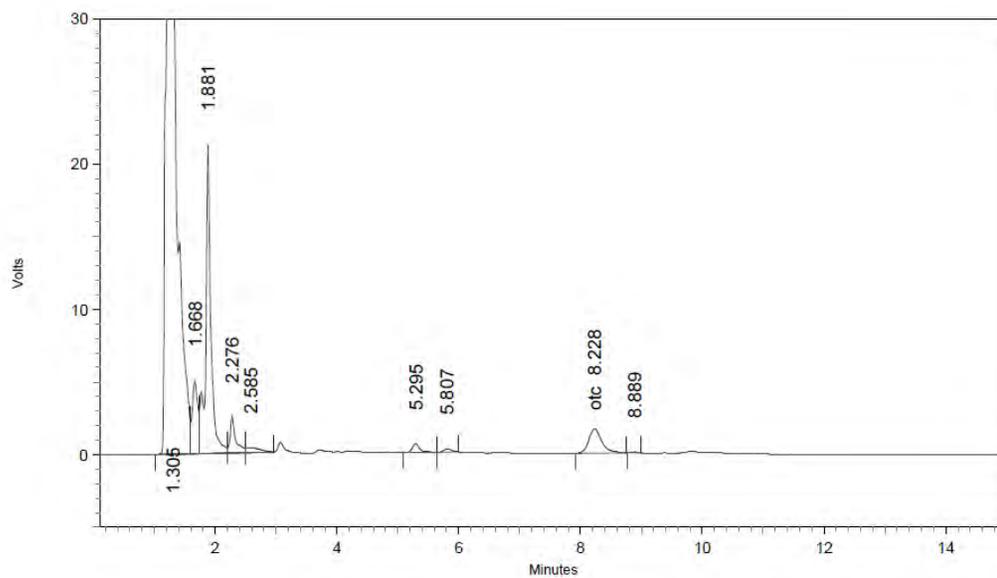


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.196	40234	7612.18



AJ-10 OTC 21 Junio-2016

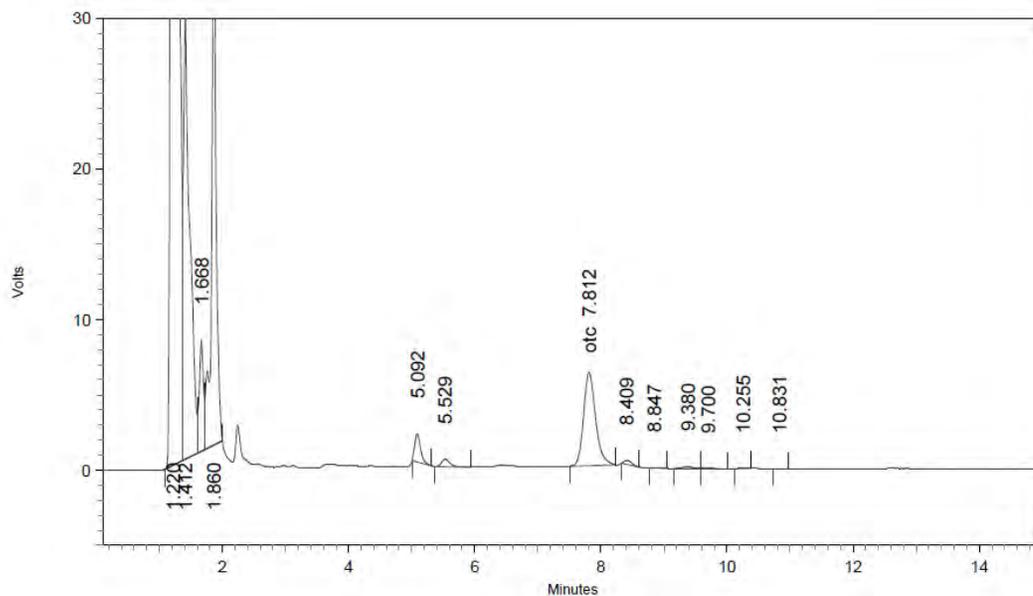


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.228	24795	7542.36



AK-6 otc 9-Junio-2016

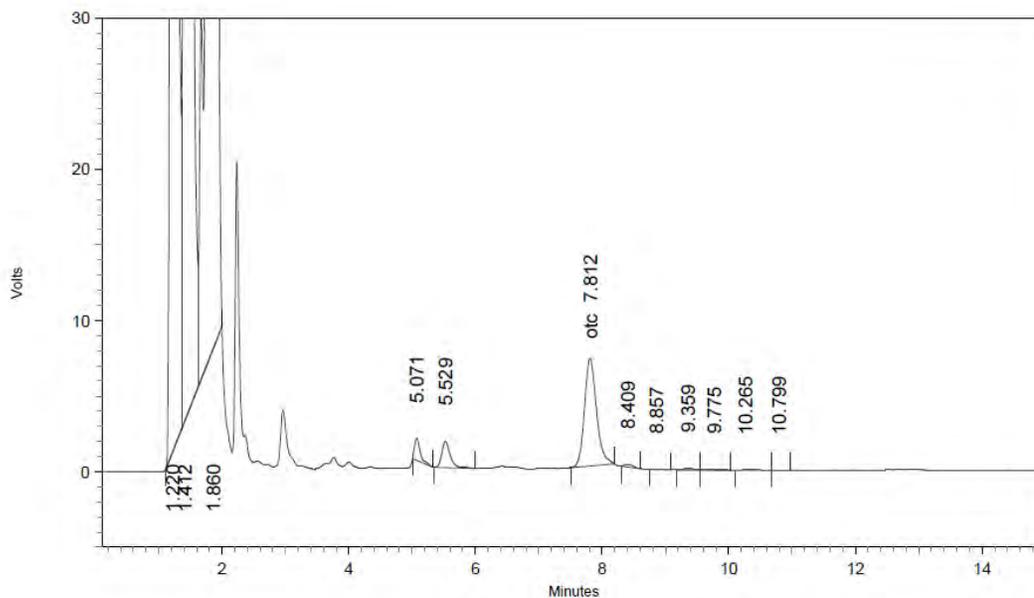


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.812	82003	8333.57



AK-7 otc 9-Junio-2016

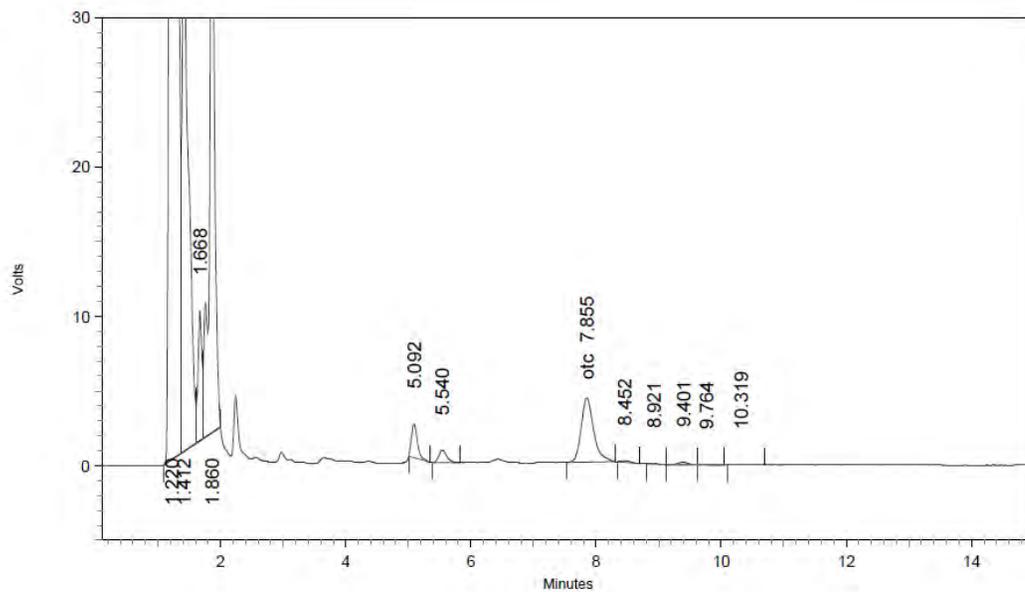


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.812	93538	8231.42



AK-8 otc 9-Junio-2016

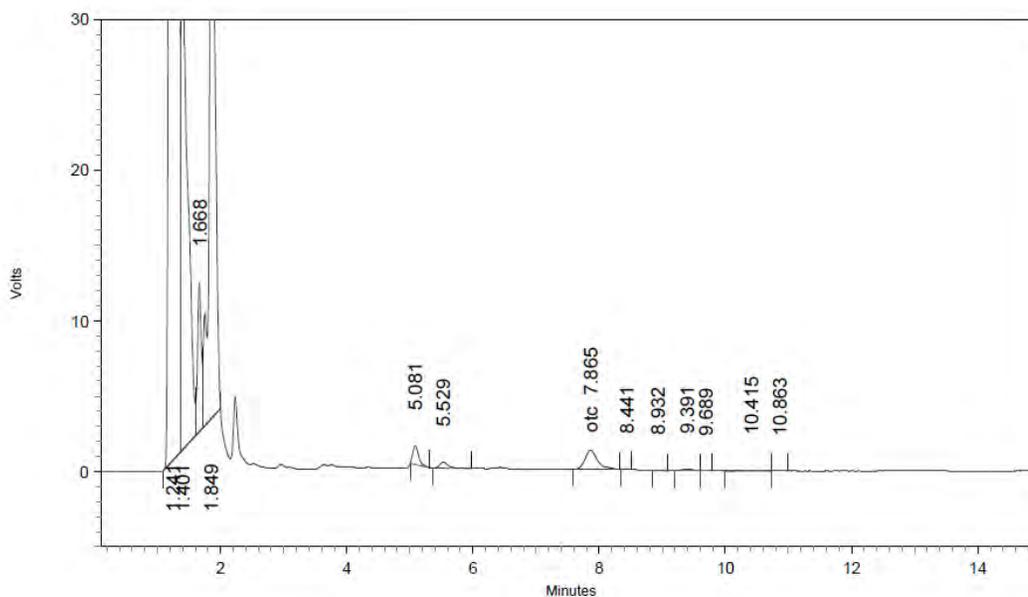


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.855	59420	7784.18



AK-9 otc 9-Junio-2016

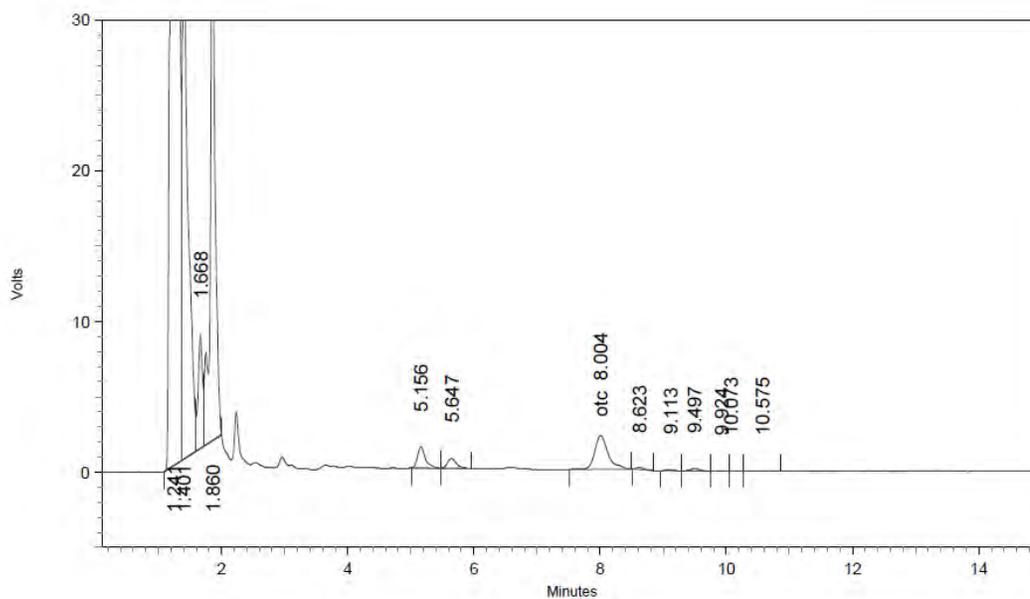


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.865	17350	7834.47



AK-10 otc 9-Junio-2016

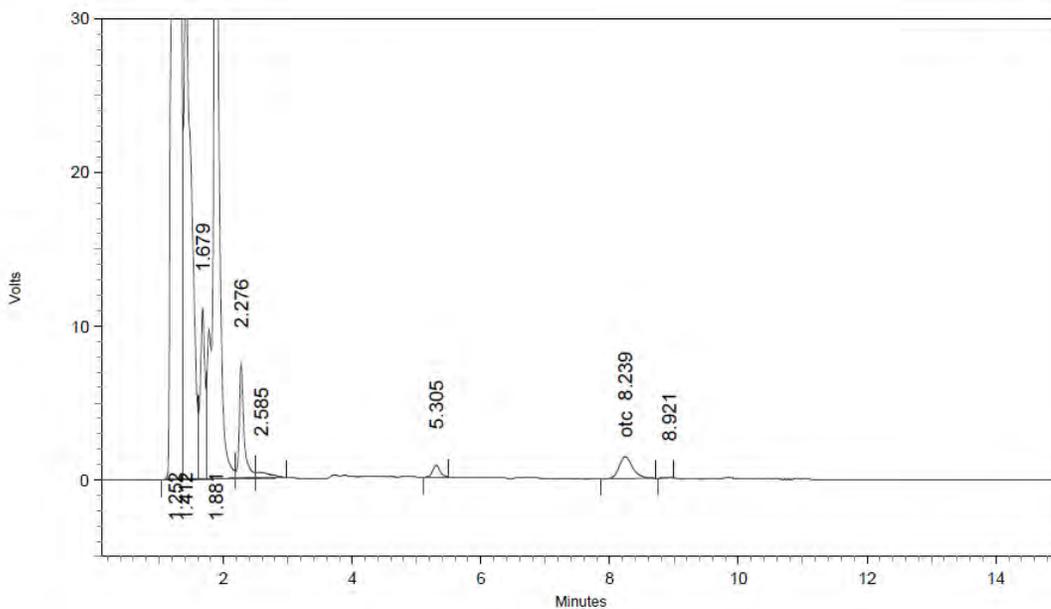


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.004	32805	7764.15



AJ-11 OTC 21 Junio-2016

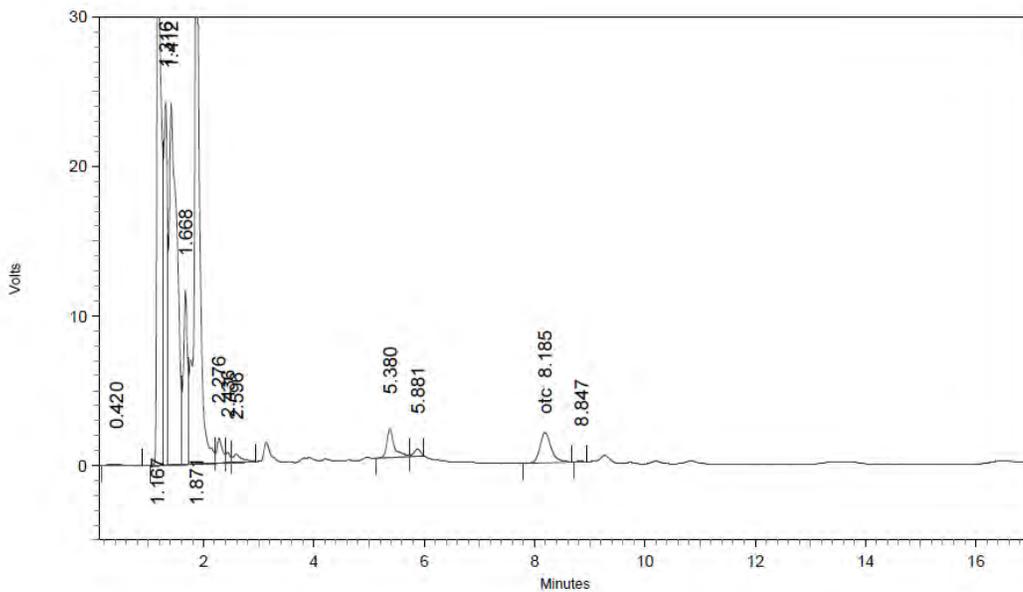


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.239	21330	7432.65



AJ-12 OTC 22-Junio-2016

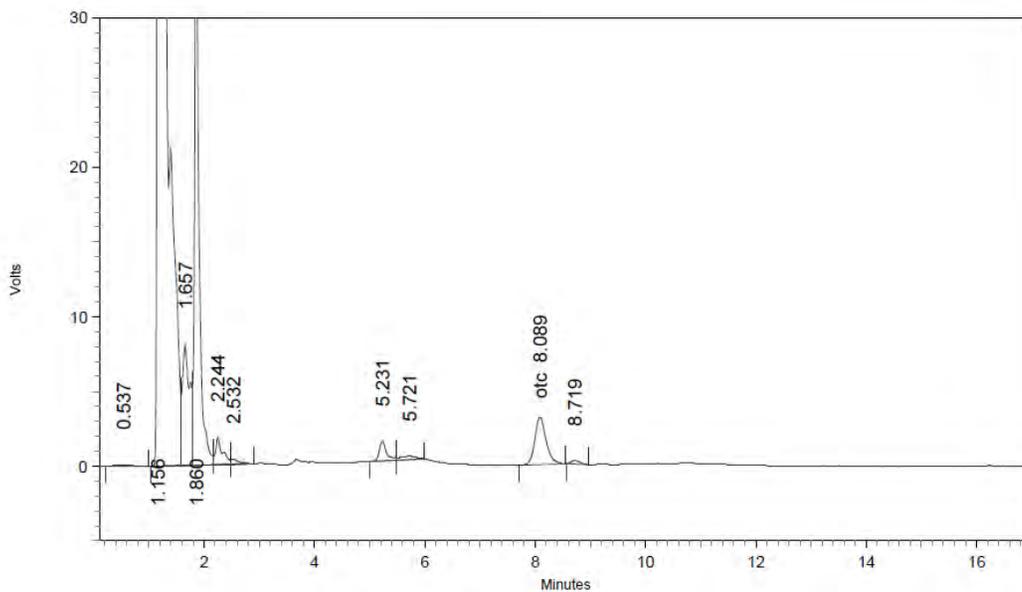


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.185	28846	8078.85



AJ-13 OTC 22-Junio-2016

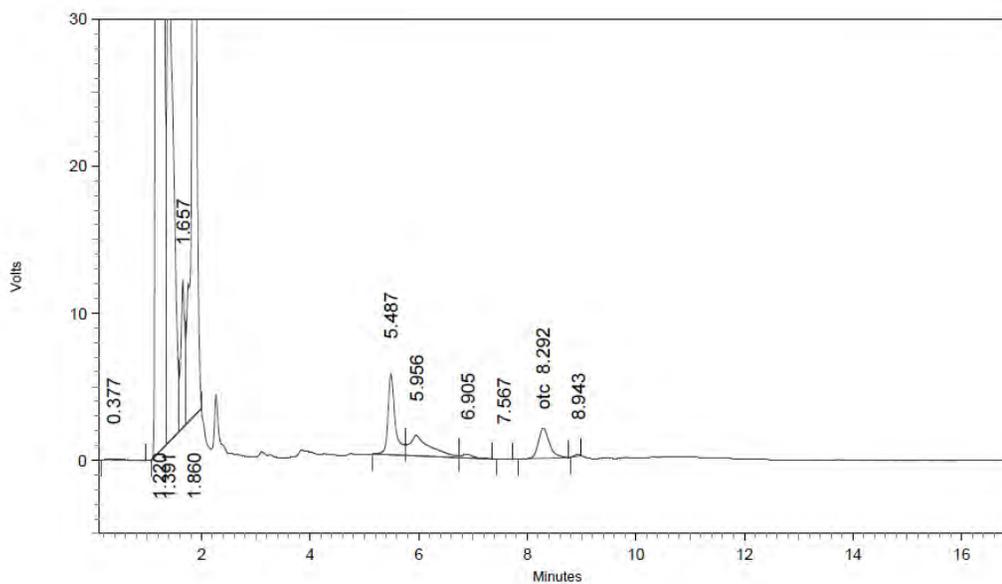


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.089	44758	7723.42



AJ-14 OTC 22-Junio-2016

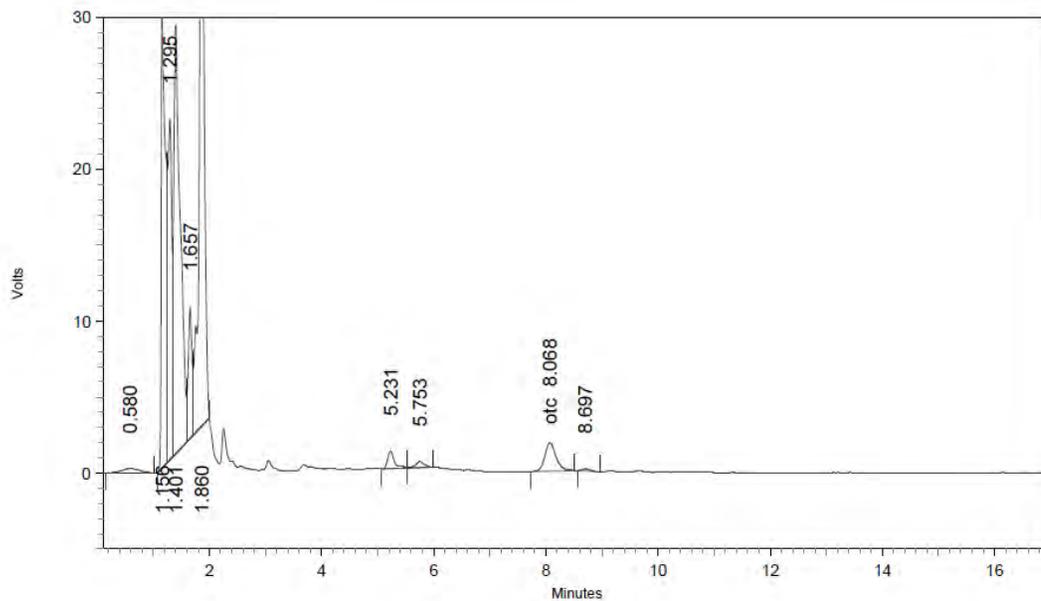


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.292	29415	8226.63



AJ-15 OTC 22-Junio-2016

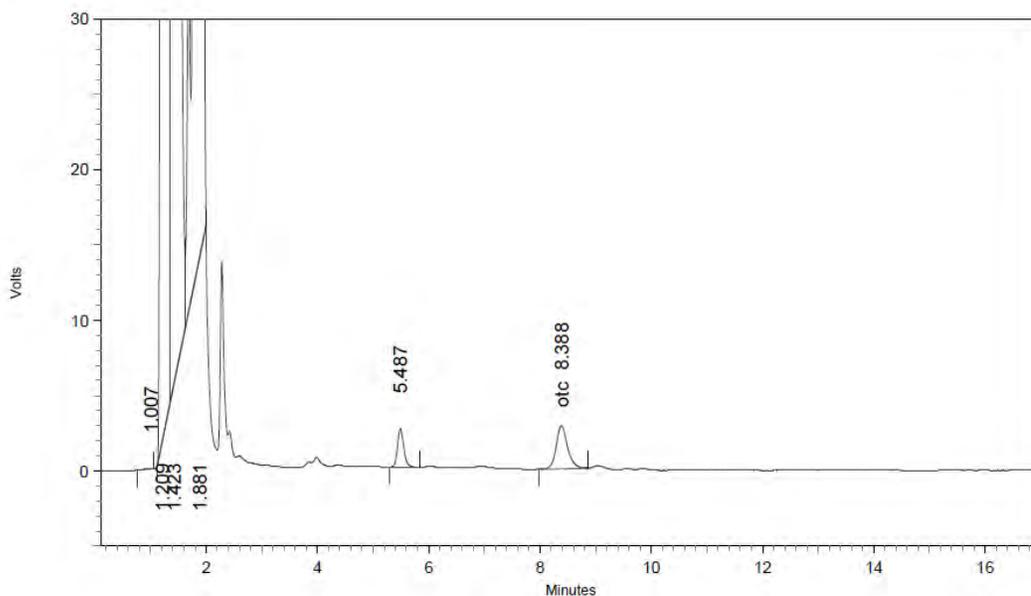


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.068	26032	7855.87



AK-11 OTC 22-Junio-2016

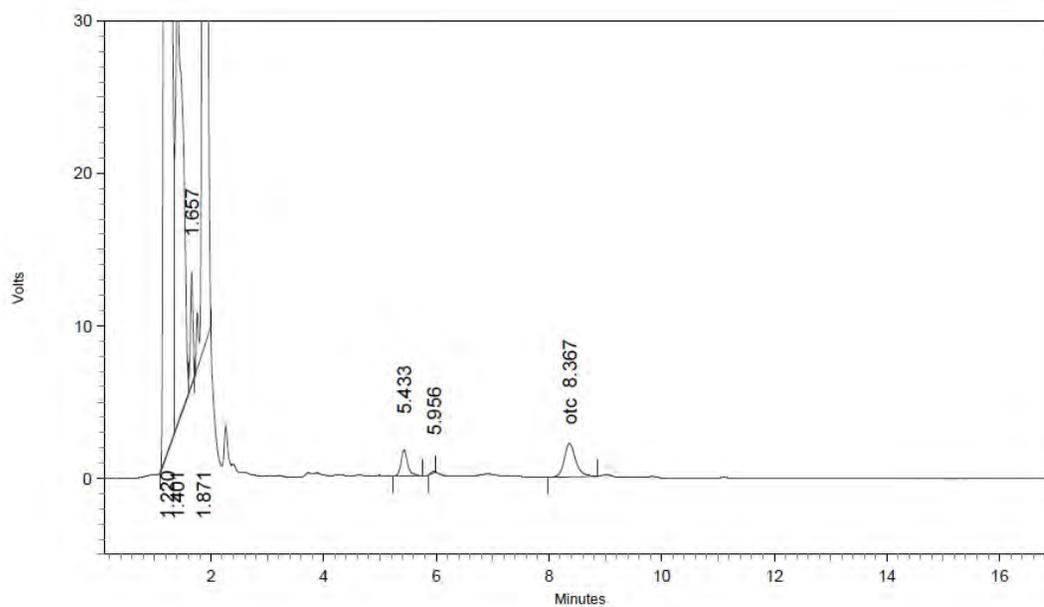


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.388	40759	8329.03



AK-12 OTC 22-Junio-2016

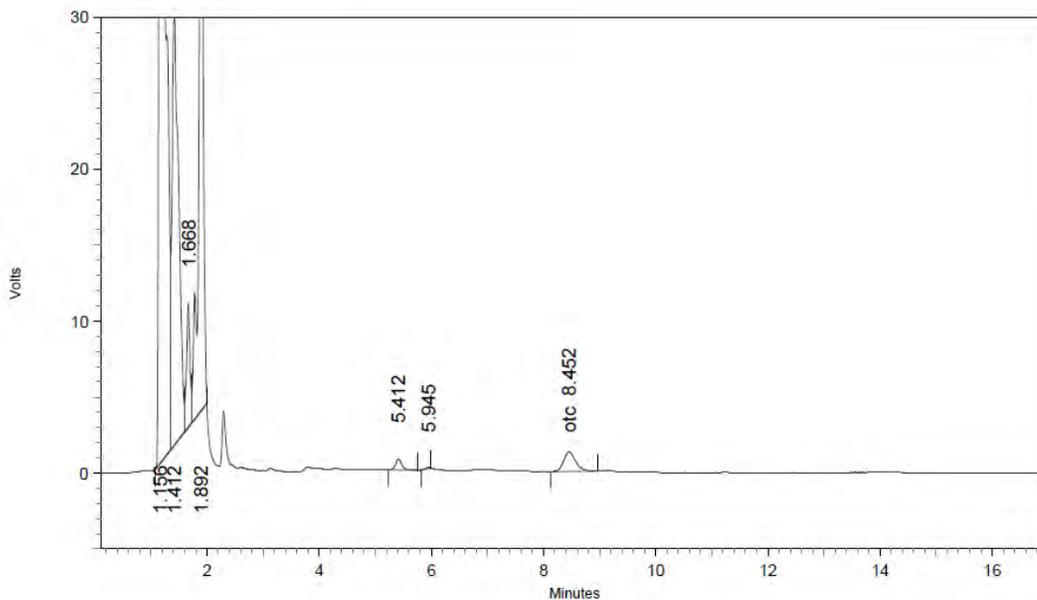


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.367	31117	8464.81



AK-13 OTC 22-Junio-2016

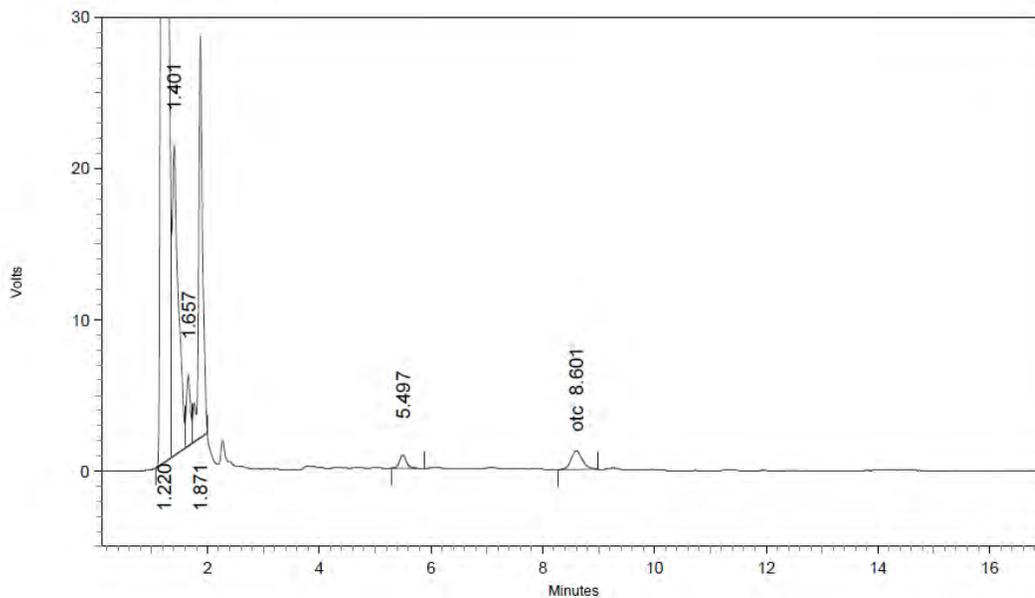


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.452	19569	7543.80



AK-14 OTC 22-Junio-2016

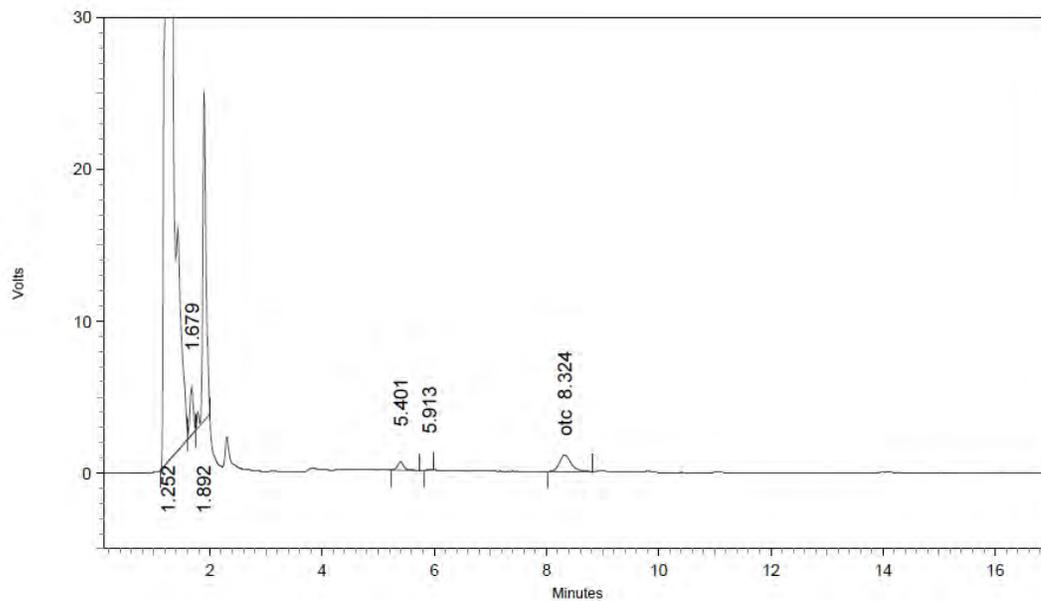


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.601	17381	8884.48



AK-15 OTC 22-Junio-2016

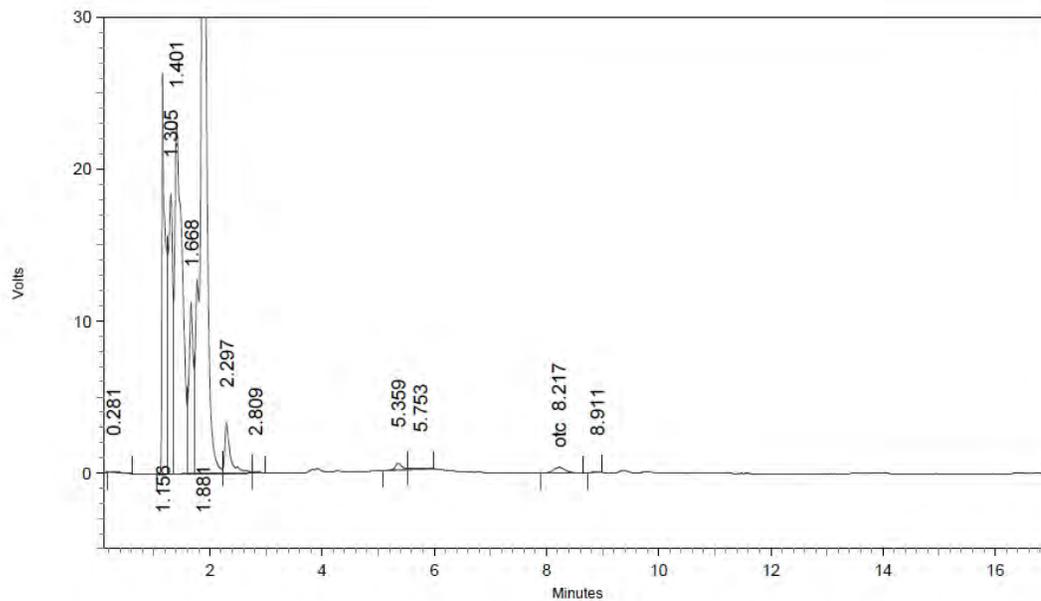


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.324	15838	7973.12



AJ-16 OTC 22-Junio-2016

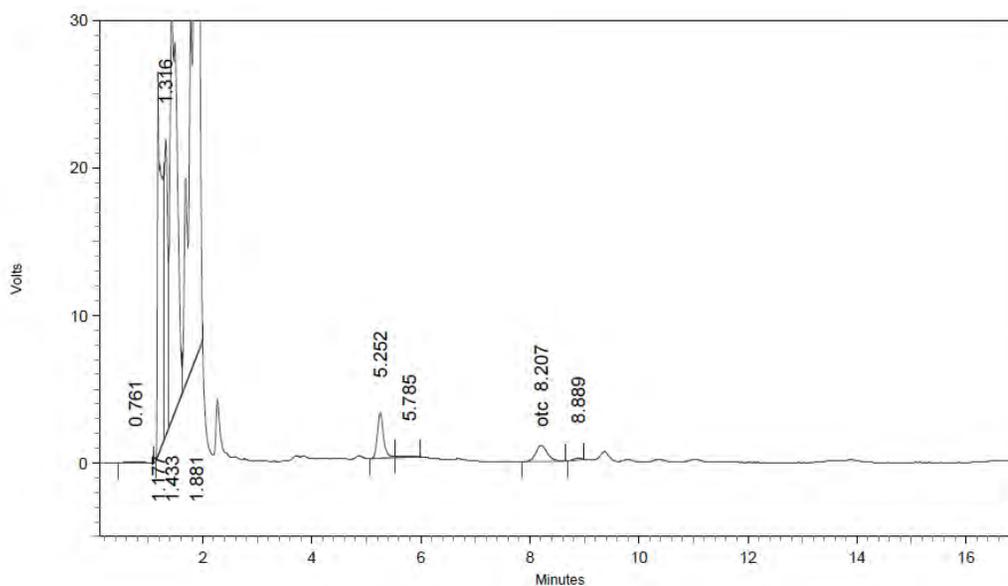


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.217	5853	6954.95



AJ-17 OTC 22-Junio-2016

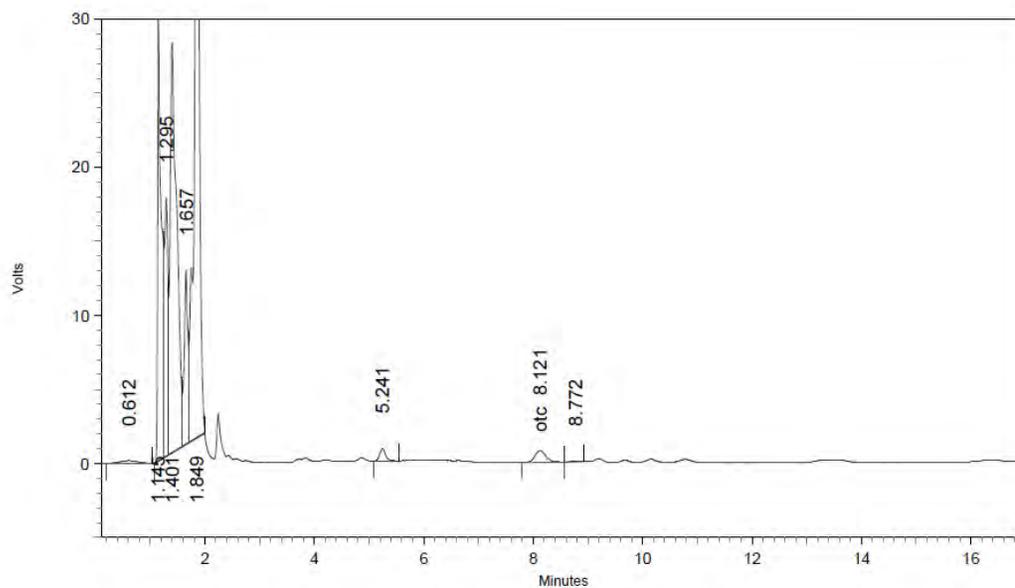


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.207	16409	7026.15



AJ-18 OTC 22-Junio-2016

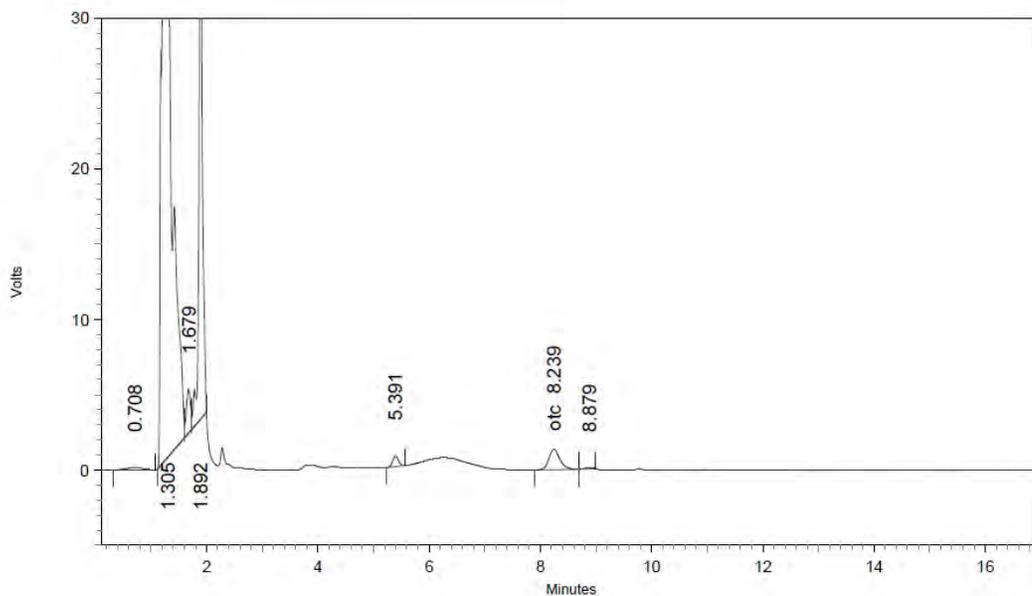


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.121	11407	8515.06



AJ-19 OTC 22-Junio-2016

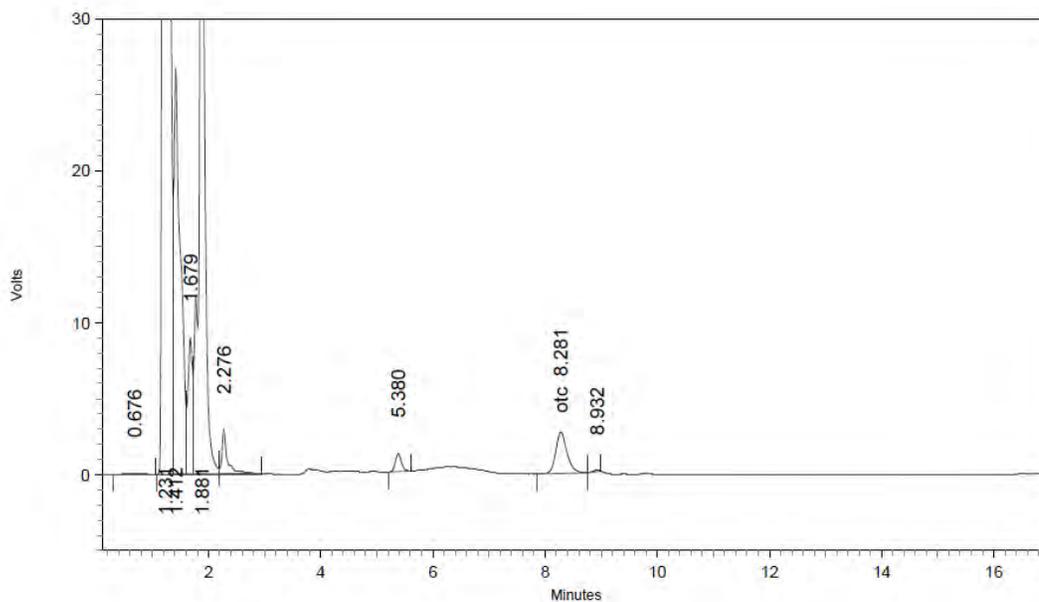


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.239	18658	8543.85



AJ-20 OTC 22-Junio-2016

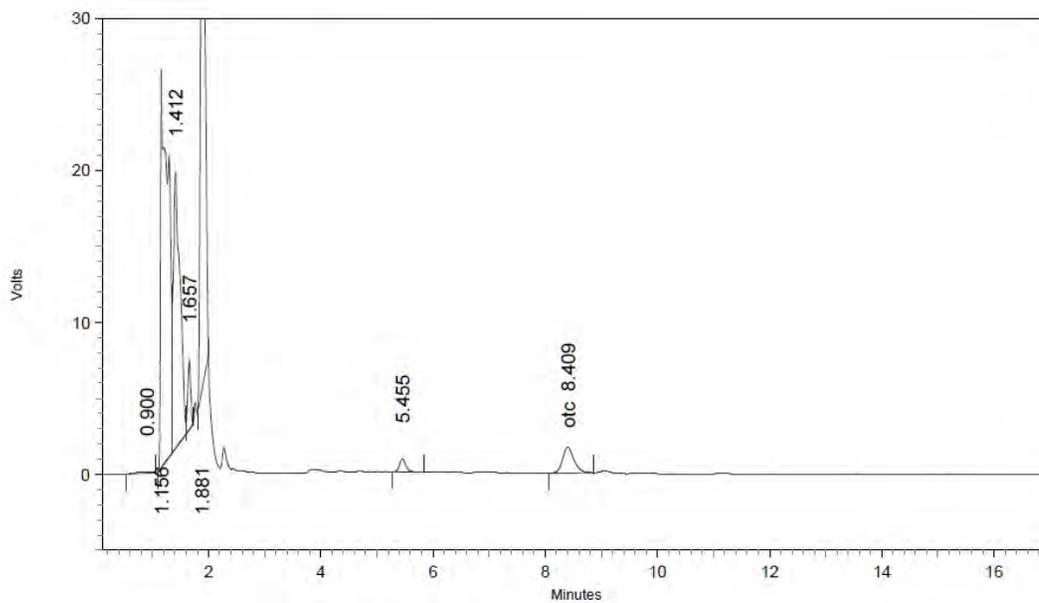


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.281	38215	8456.68



AK-16 OTC 22-Junio-2016

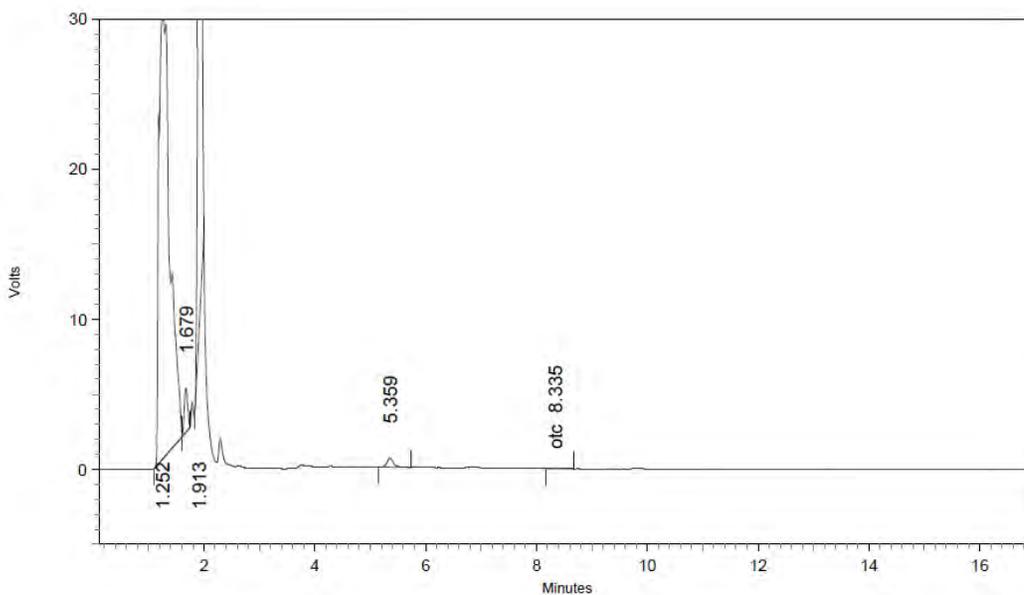


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.409	24334	8324.28



AK-17 OTC 22-Junio-2016

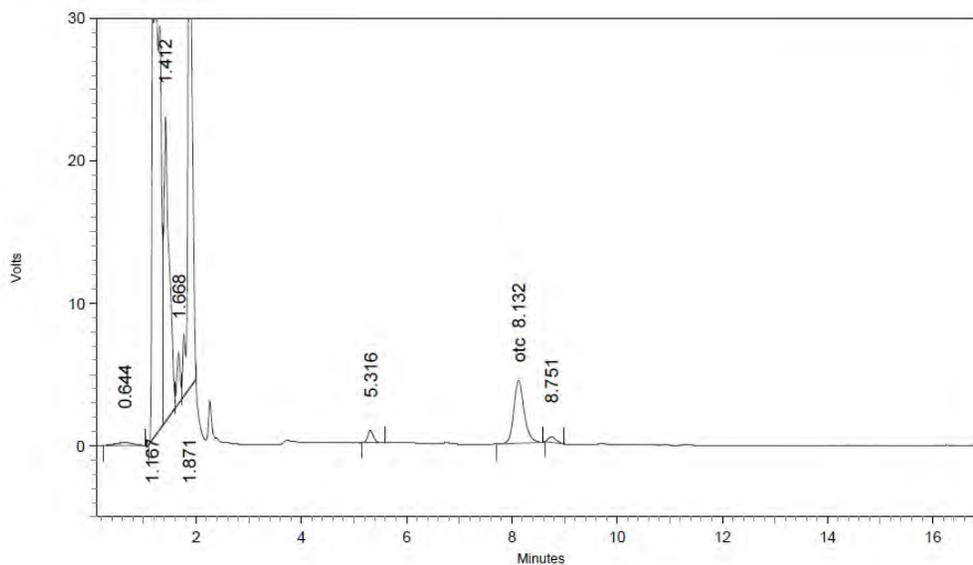


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.335	450	7964.31



AK-18 OTC 23-Junio-2016

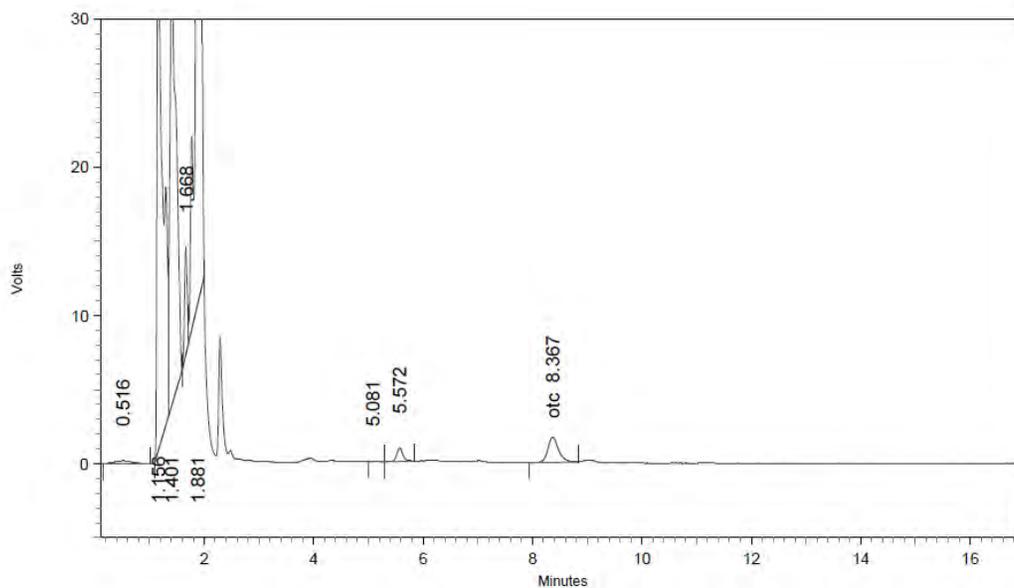


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.132	59837	8671.73



AK-19 OTC 23-Junio-2016

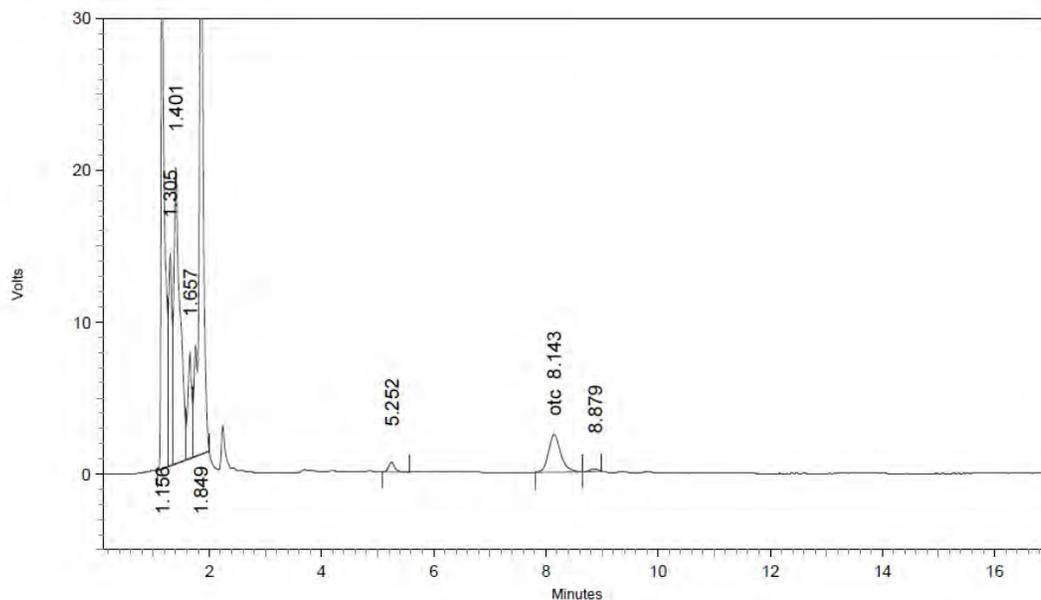


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.367	23225	9110.14



AK-20 OTC 23-Junio-2016



2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.143	37229	6982.36





Anexo 8.9. Resultados de OTC en piel-m3sculo de Trucha para el c3lculo de la curva de depleci3n de Magnadur en condiciones controladas

Fecha an3lisis	N3 Mx	D3as post- inyecci3n	3rea	conc obtenida ng/g
11/05/2016	M-1	33	26.996	213,6
11/05/2016	M-2	33	33.365	262,5
11/05/2016	M-3	33	13.104	101,4
11/05/2016	M-4	33	16.617	126,5
11/05/2016	M-5	33	7.623	58,6
11/05/2016	N-1	33	37.413	298,2
11/05/2016	N-2	33	38.452	301,2
11/05/2016	N-3	33	28.650	227,3
11/05/2016	N-4	33	44.882	349,9
11/05/2016	N-5	33	18.289	140,6
11/05/2016	O-1	33	68.869	539,3
11/05/2016	O-2	33	40.002	315,3
11/05/2016	O-3	33	65.328	510,4
11/05/2016	O-4	33	43.895	338,2
11/05/2016	O-5	33	73.467	586,9
05/05/2016	M-7	42	16.449	128,4
05/05/2016	M-8	42	19.800	150,3
05/05/2016	M-9	42	21.592	166,4
05/05/2016	M-10	42	19.017	149,4
05/05/2016	N-8	42	28.628	222,7
05/05/2016	N-9	42	17.335	132,8
05/05/2016	N-10	42	42.063	334,9
05/05/2016	O-7	42	30.581	233,5
05/05/2016	O-8	42	25.218	191,4
05/05/2016	O-9	42	31.484	241,9
05/05/2016	O-10	42	8.519	63,3

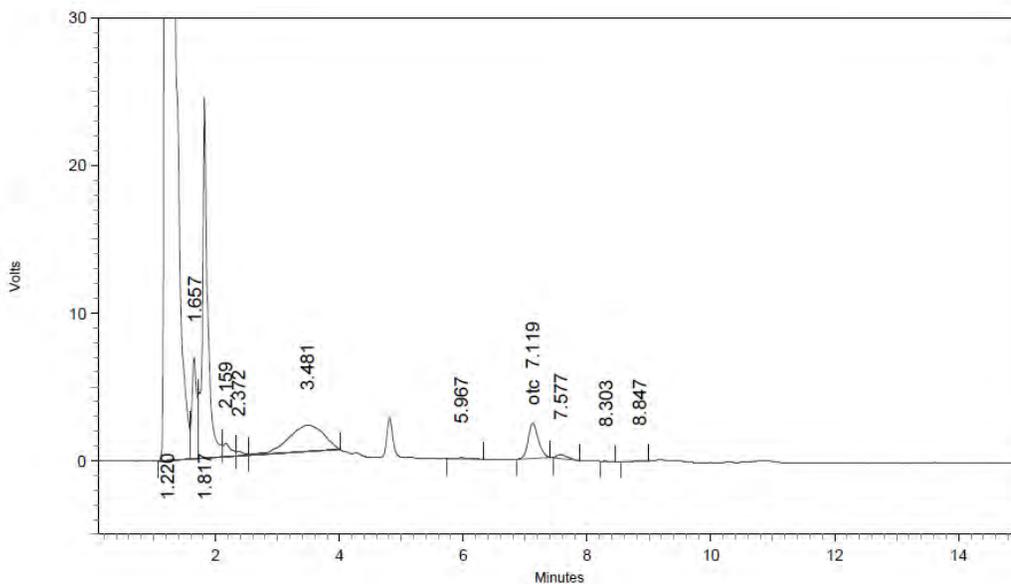


05/05/2016	M-11	50	22.659	180,3
05/05/2016	M-12	50	19.567	150,3
05/05/2016	M-13	50	26.992	211,9
05/05/2016	M-14	50	25.825	194,2
05/05/2016	M-15	50	8.120	61,5
04/05/2016	N-11	50	21.280	167,9
04/05/2016	N-12	50	15.584	121,3
04/05/2016	N-13	50	5.817	42,9
04/05/2016	N-14	50	22.828	170,4
04/05/2016	N-15	50	10.867	81,4
04/05/2016	O-11	50	14.250	110,0
04/05/2016	O-12	50	32.888	261,3
04/05/2016	O-13	50	23.135	177,1
04/05/2016	O-14	50	16.410	129,4
04/05/2016	O-15	50	14.338	112,1
04/05/2016	M-16	57	19.473	151,3
04/05/2016	N-16	57	32.763	260,8
04/05/2016	N-17	57	15.338	115,9
04/05/2016	N-18	57	20.982	157,4
04/05/2016	N-19	57	29.604	230,4
04/05/2016	N-20	57	13.766	105,6



Anexo 8.10. Cromatogramas de curva de depleci3n Magnadur trucha, condiciones controladas

M-1 OTC 11-mayo-2016

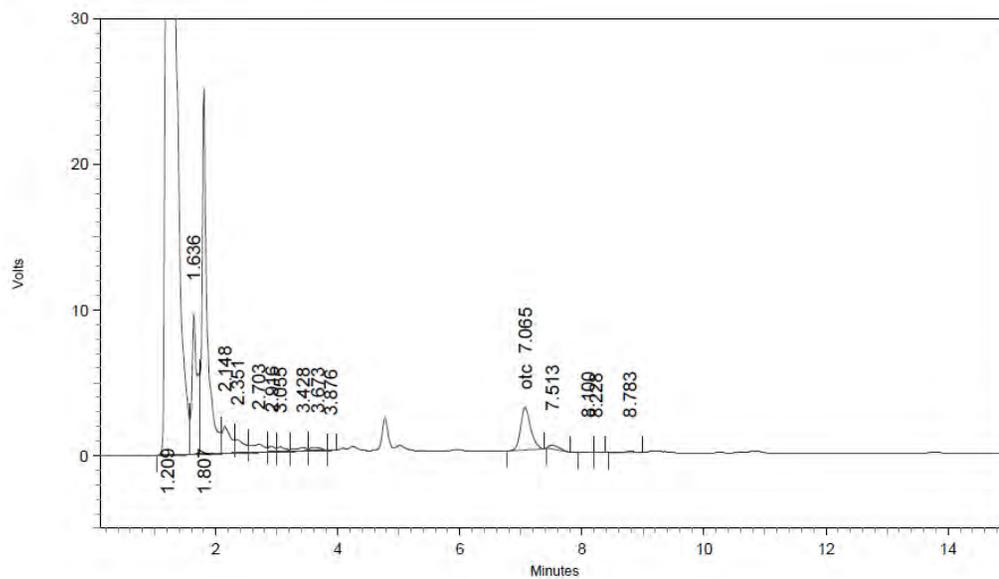


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.119	26996	8937.72



M-2 OTC 11-mayo-2016

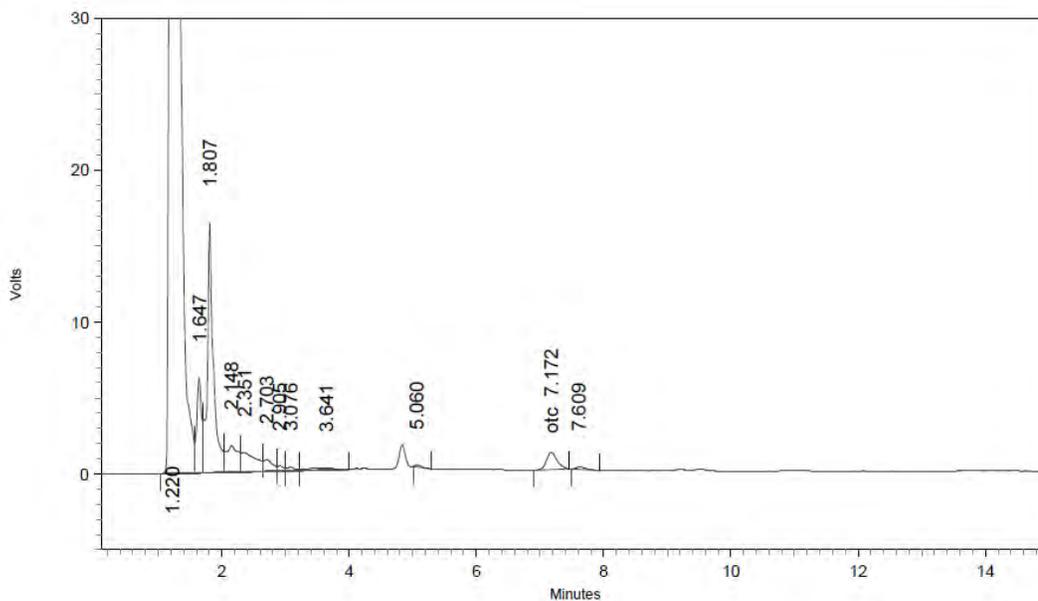


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.065	33365	8705.70



M-3 OTC 11-mayo-2016

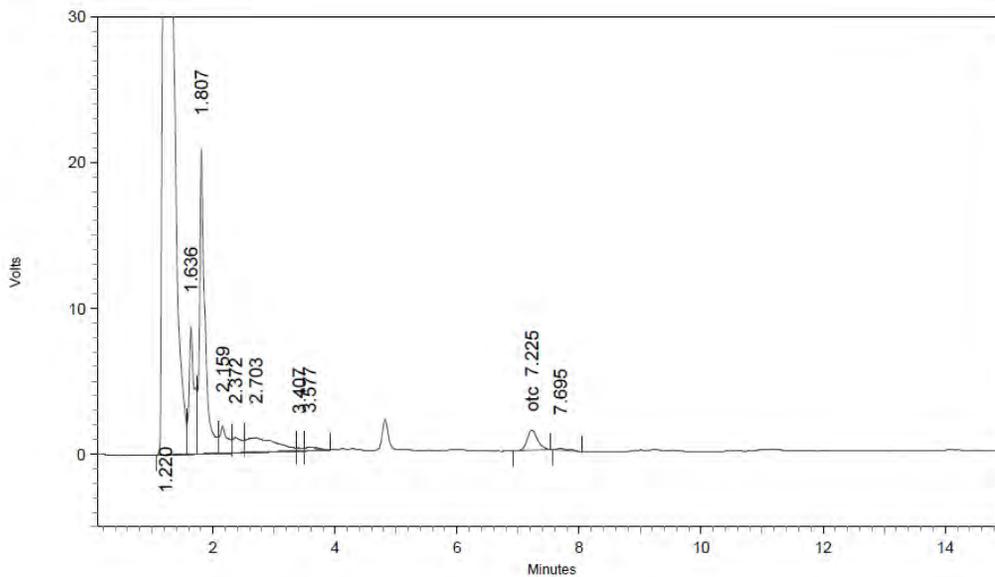


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.172	13104	8703.56



M-4 OTC 11-mayo-2016

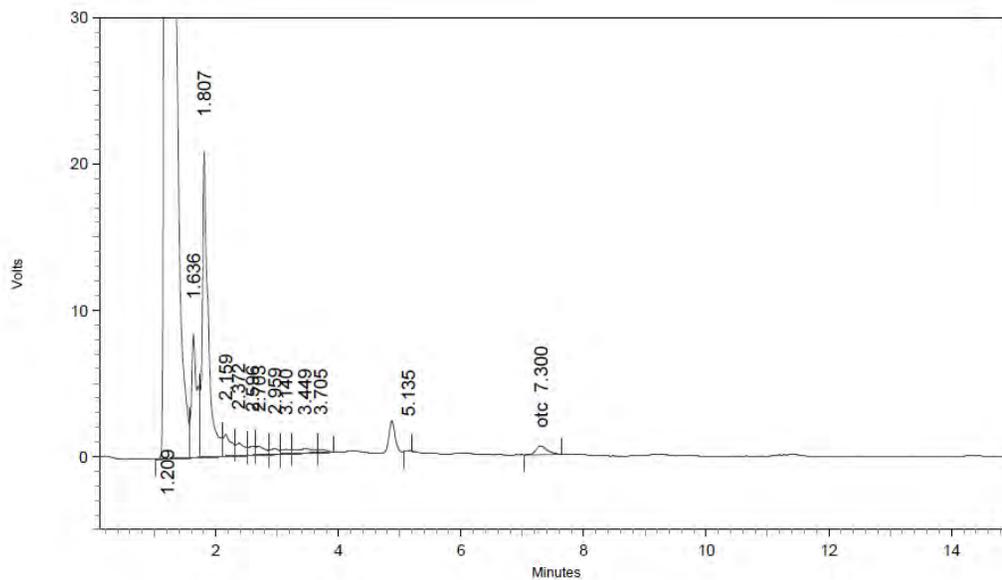


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.225	16617	8302.43



M-5 OTC 11-mayo-2016

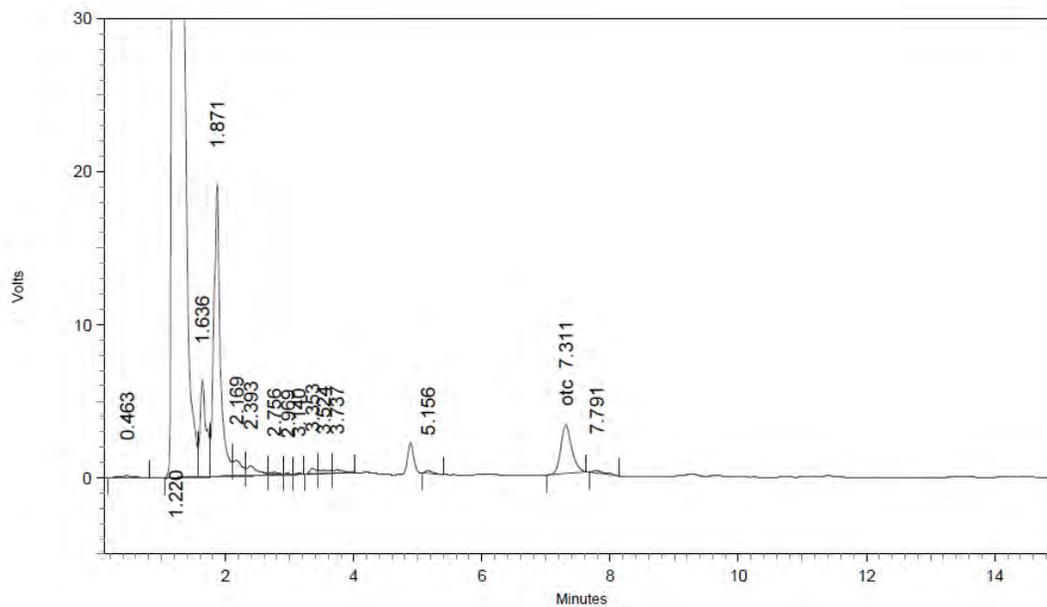


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.300	7623	7873.74



N-1 OTC 11-mayo-2016

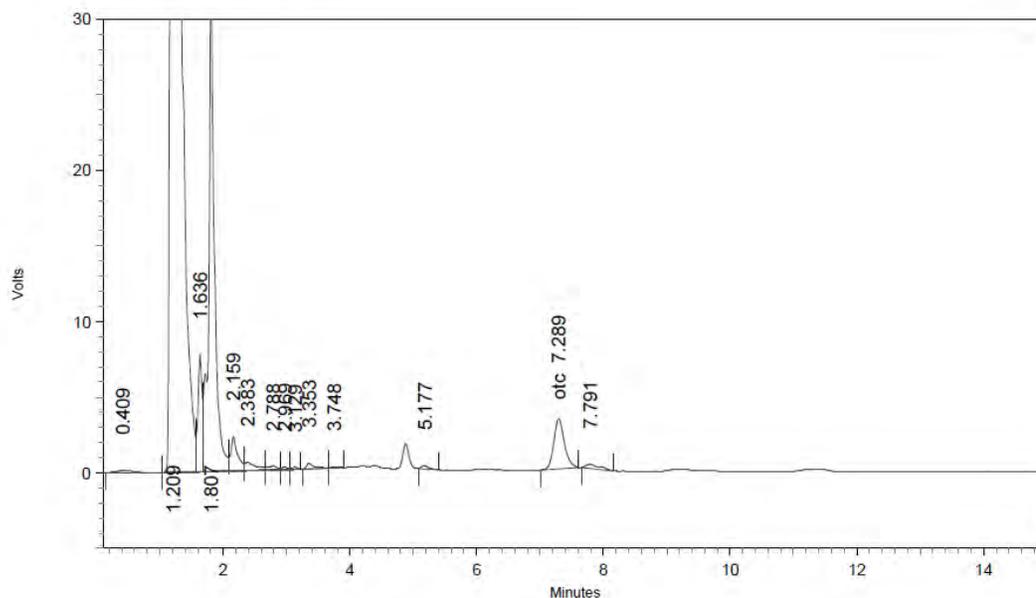


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.311	37413	8664.80



N-2 OTC 11-mayo-2016

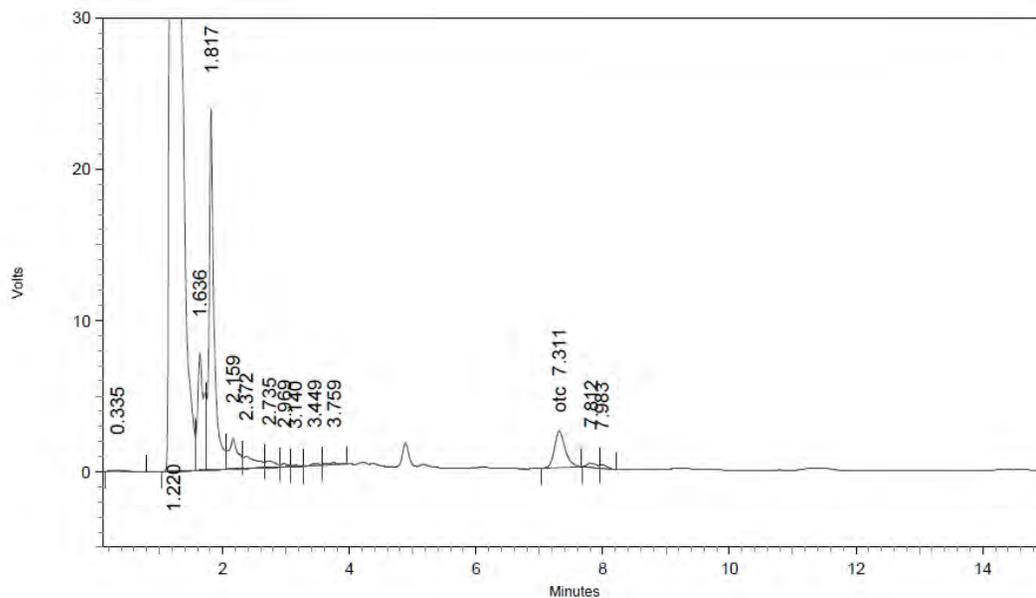


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.289	38452	9235.76



N-3 OTC 11-mayo-2016

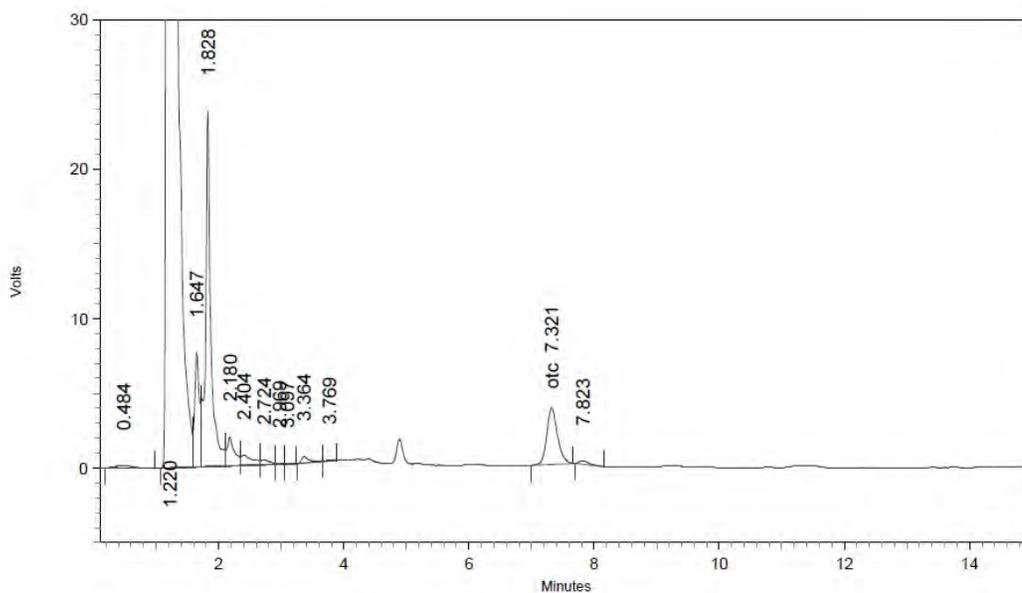


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.311	28650	8999.70



N-4 OTC 11-mayo-2016

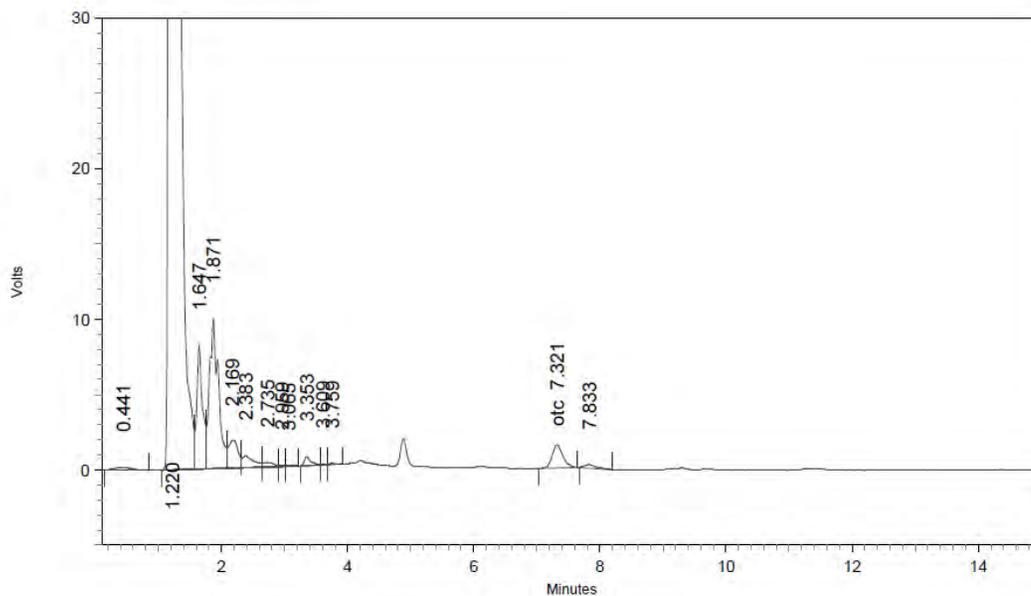


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.321	44882	8977.00



N-5 OTC 11-mayo-2016

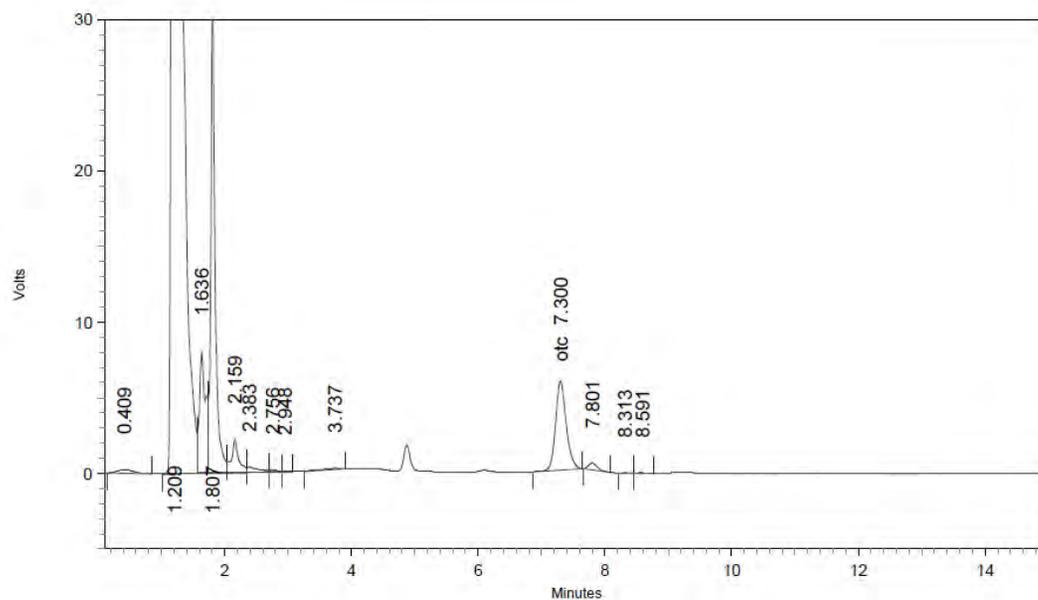


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.321	18289	8778.97



O-1 OTC 11-mayo-2016

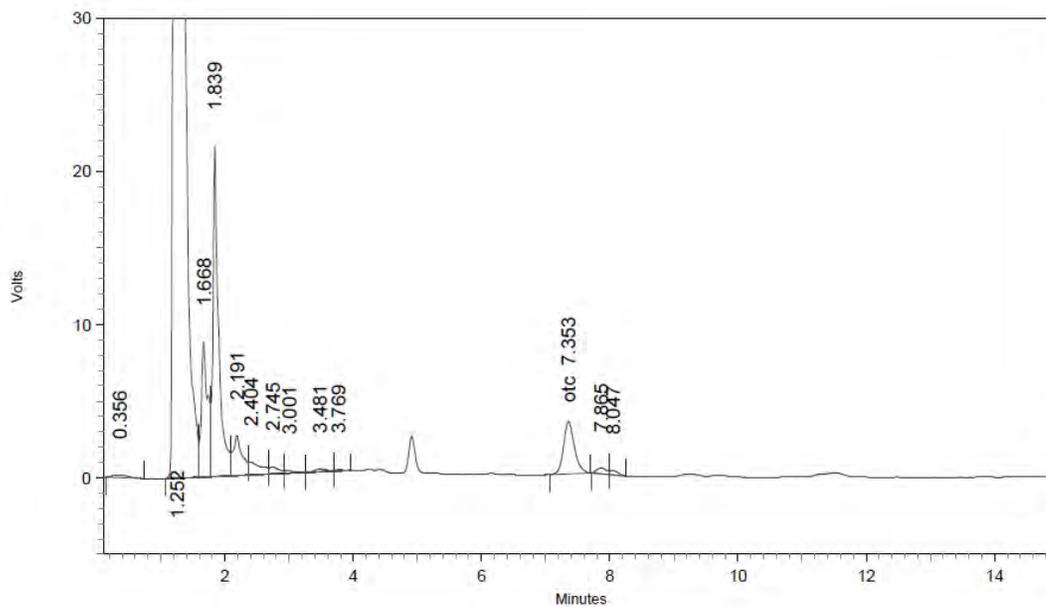


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.300	68869	9061.22



O-2 OTC 11-mayo-2016

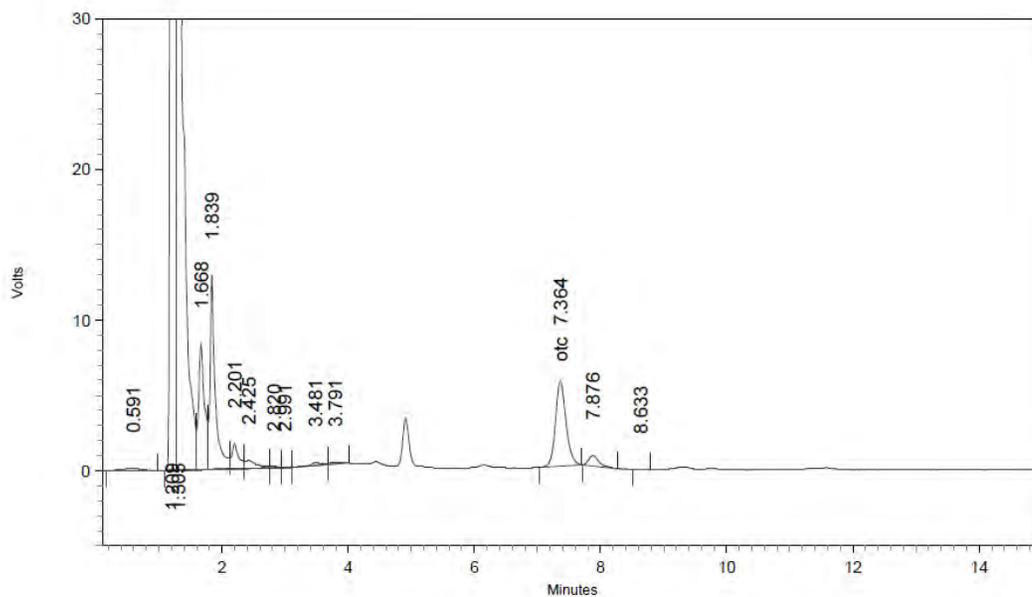


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.353	40002	9250.28



O-3 OTC 11-mayo-2016

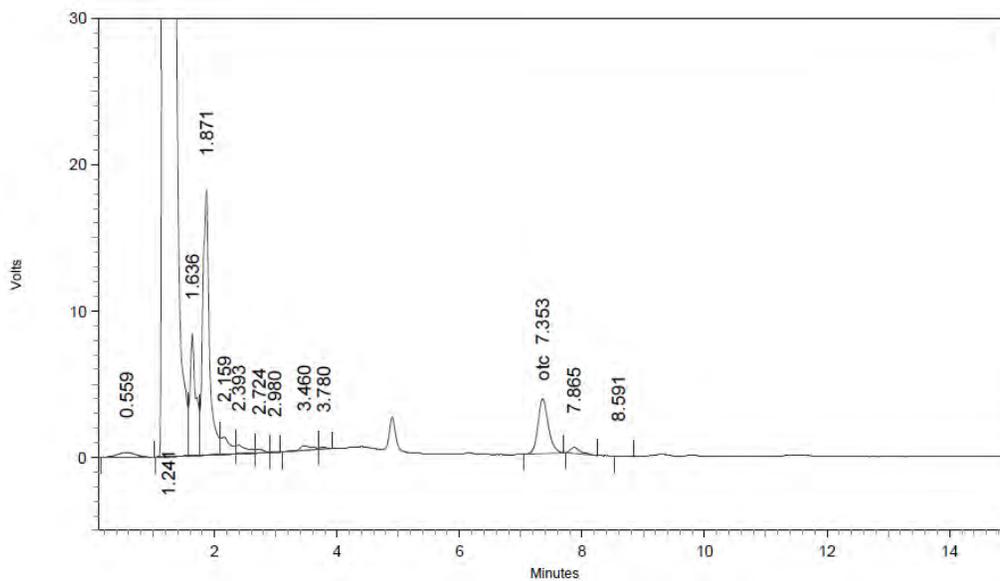


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.364	65328	9358.64



O-4 OTC 11-mayo-2016

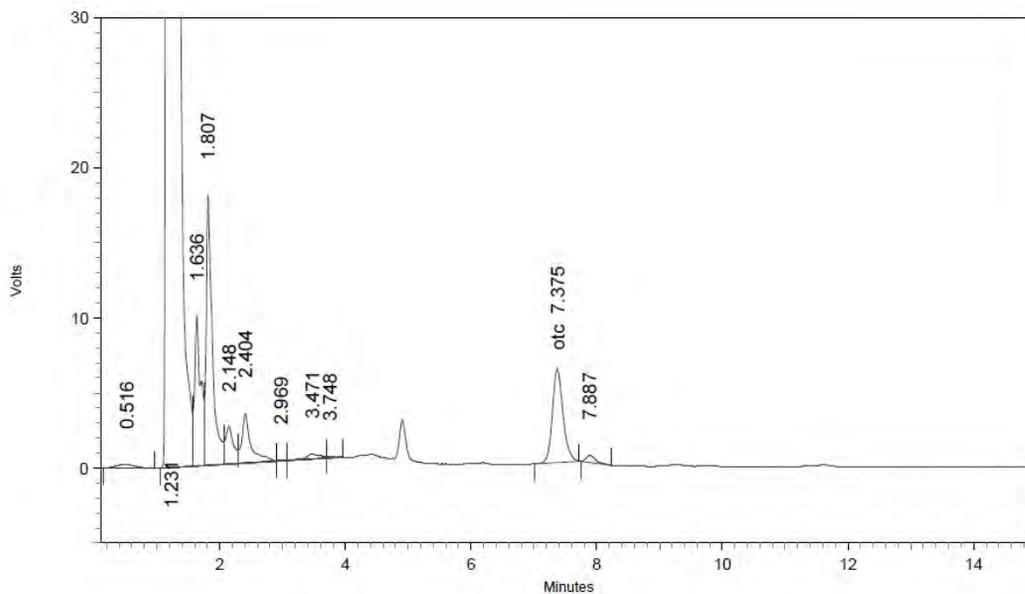


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.353	43895	9310.72



O-5 OTC 11-mayo-2016

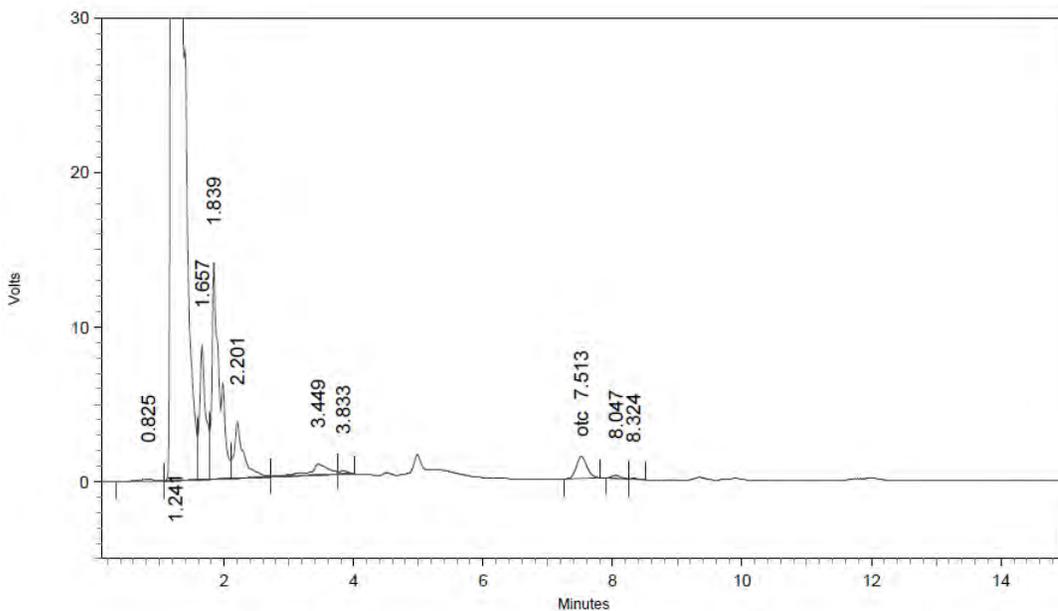


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.375	73467	9153.01



M-7 OTC 5-Mayo-2016

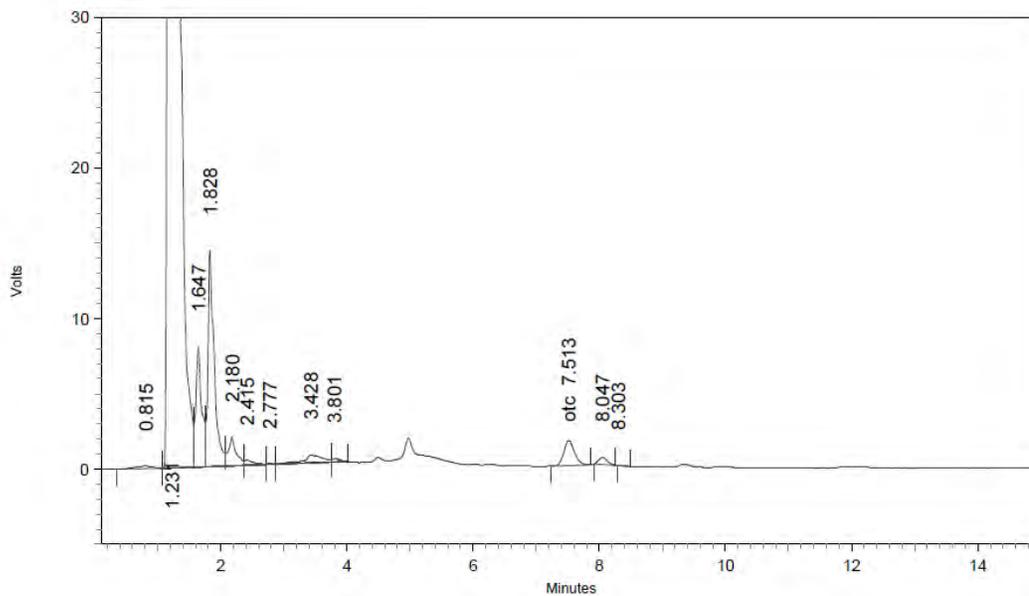


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.513	16449	9473.40



M-8 OTC 5-Mayo-2016

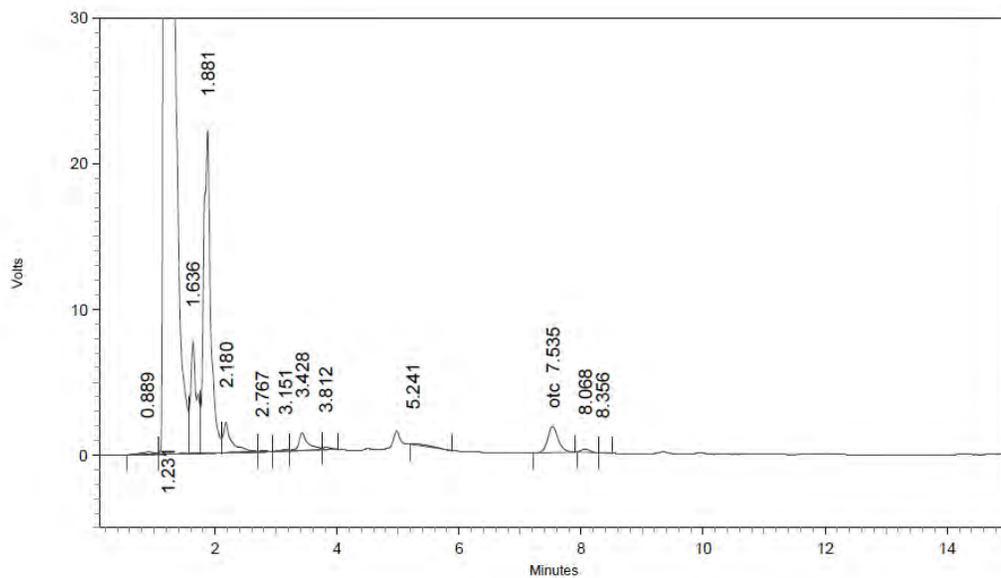


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.513	19800	9138.16



M-9 OTC 5-Mayo-2016

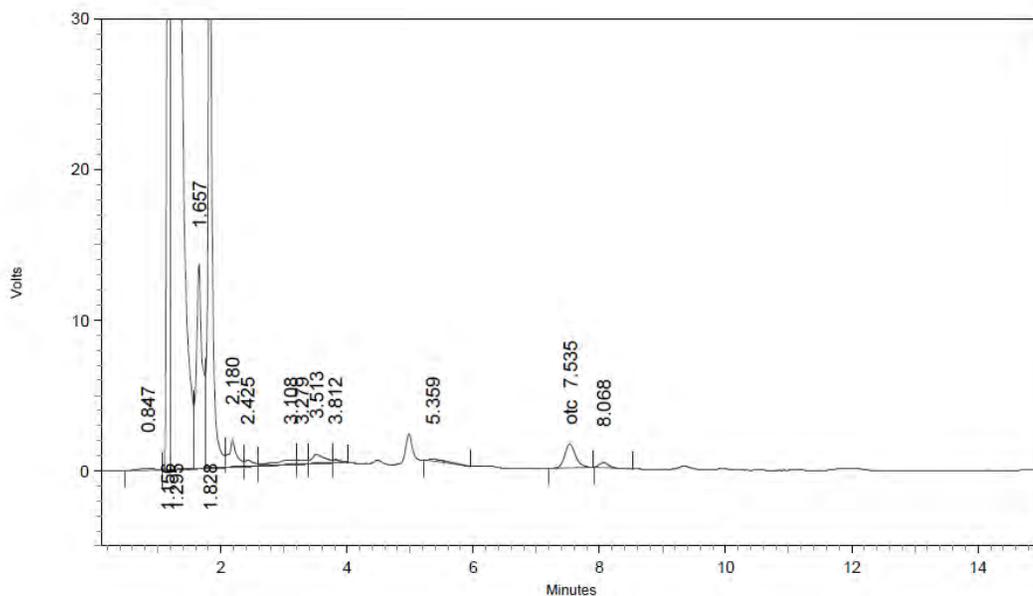


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.535	21592	9095.53



M-10 OTC 5-Mayo-2016

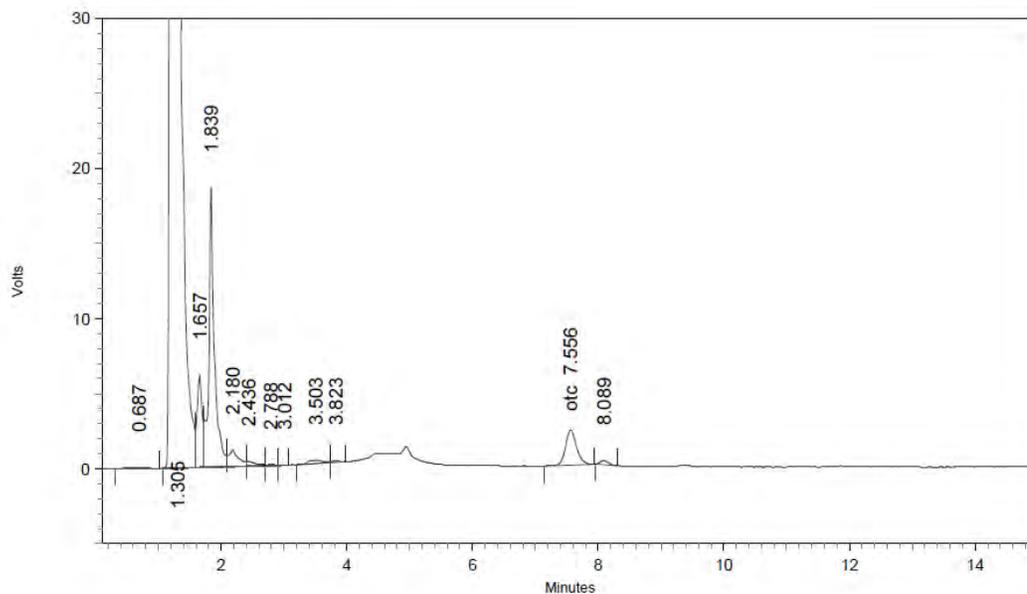


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.535	19017	9234.18



N-8 OTC 5-Mayo-2016

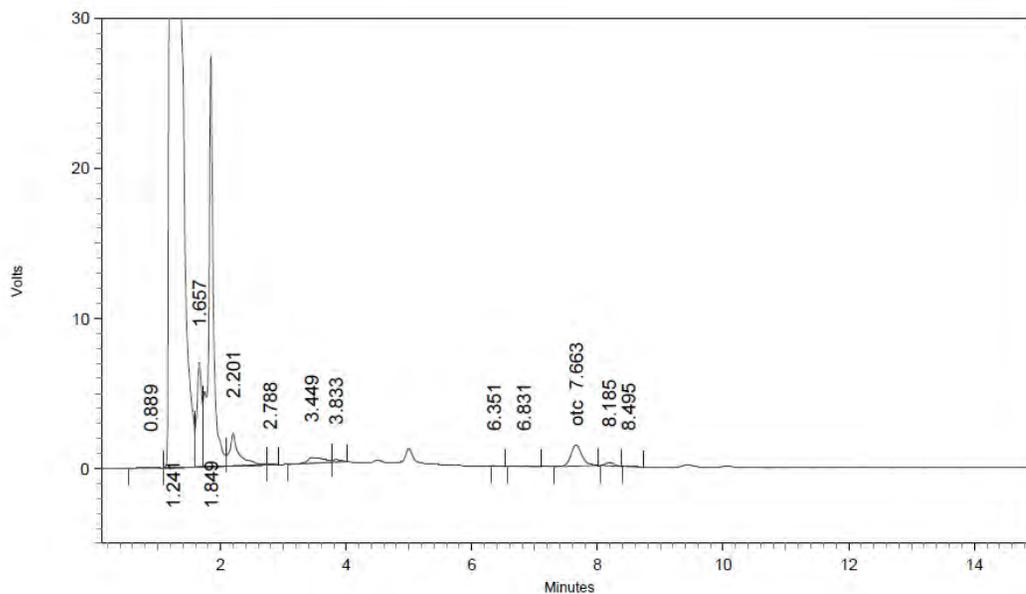


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.556	28628	8874.89



N-9 OTC 5-Mayo-2016

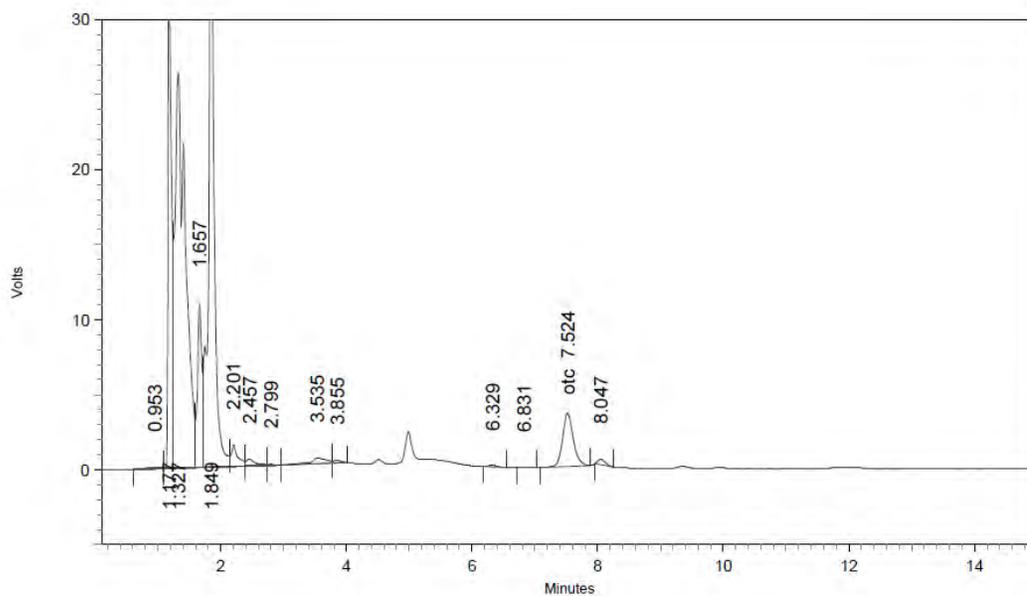


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.663	17335	9132,84



N-10 OTC 5-Mayo-2016

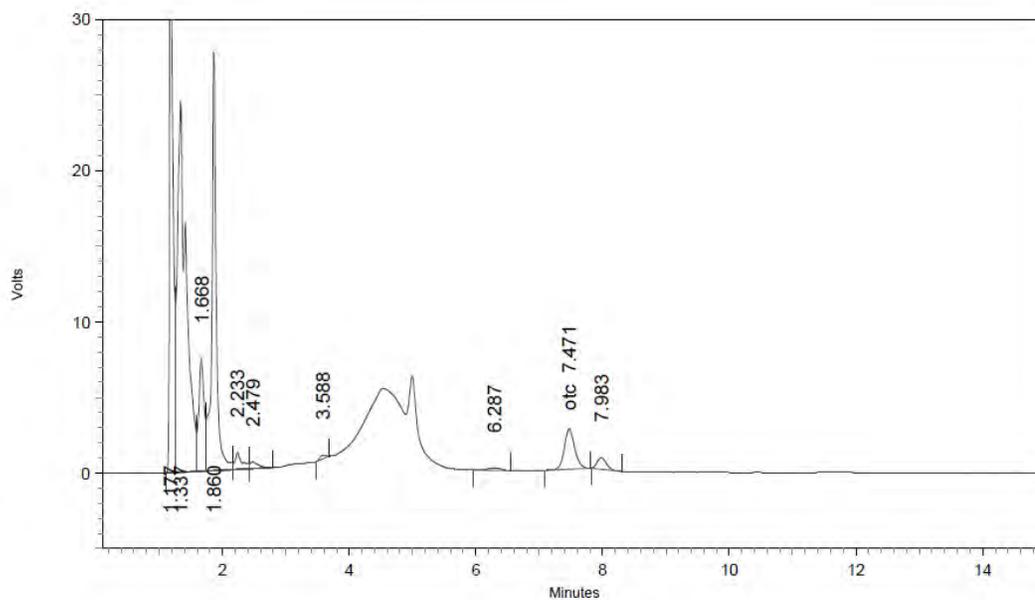


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.524	42063	9403.26



O-7 OTC 5-Mayo-2016

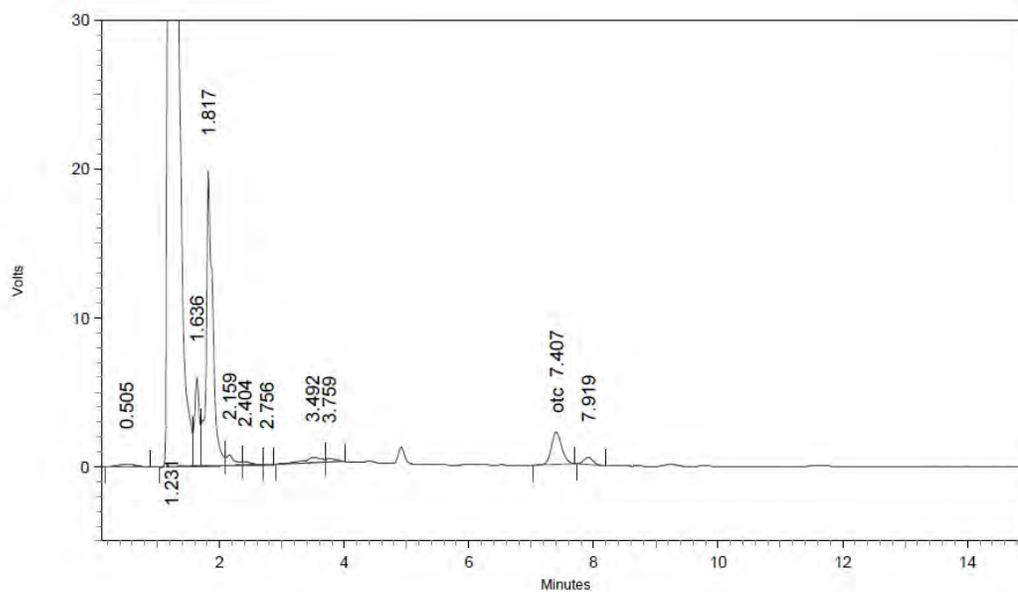


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.471	30581	9909.39



O-8 OTC 5-Mayo-2016

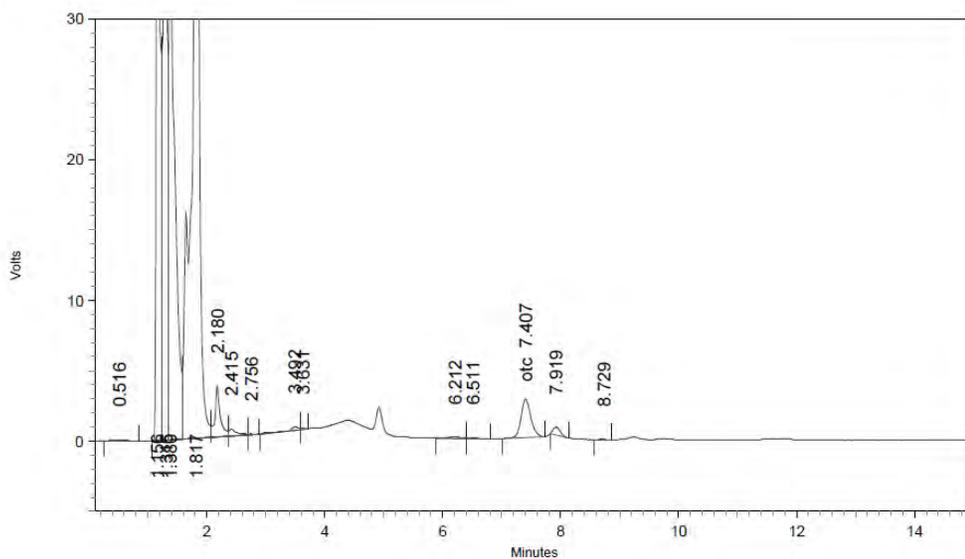


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.407	25218	9149.68



O-9 OTC 5-Mayo-2016

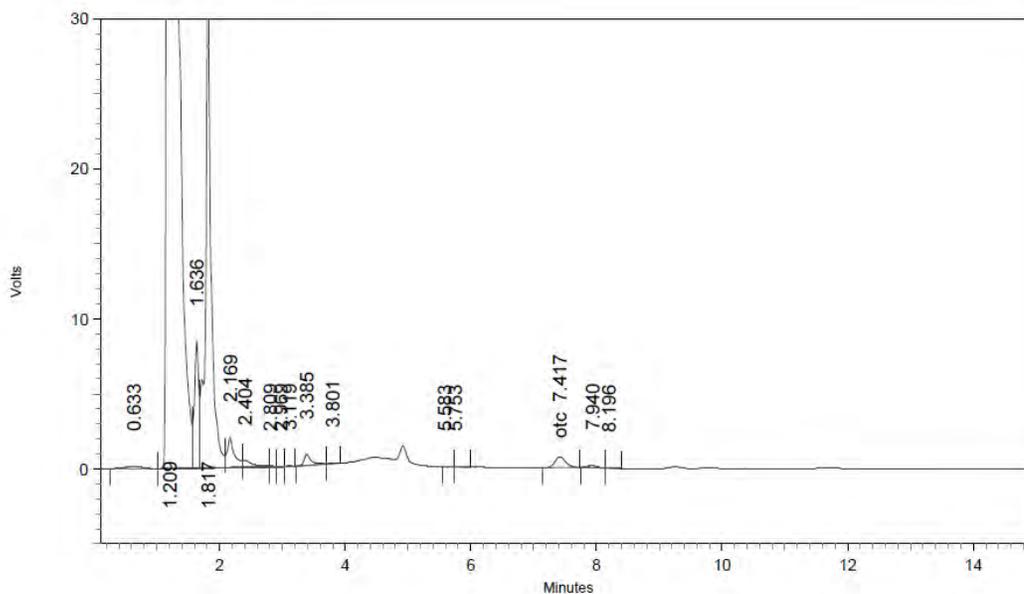


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.407	31484	9359.77



O-10 OTC 5-Mayo-2016

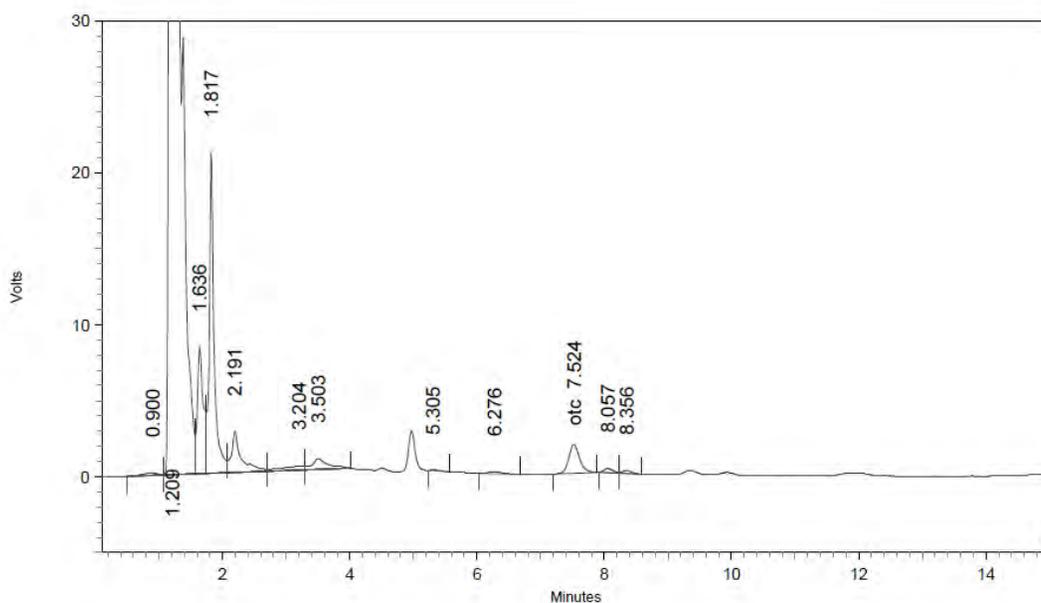


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.417	8519	9005.31



M-11 OTC 5-Mayo-2016

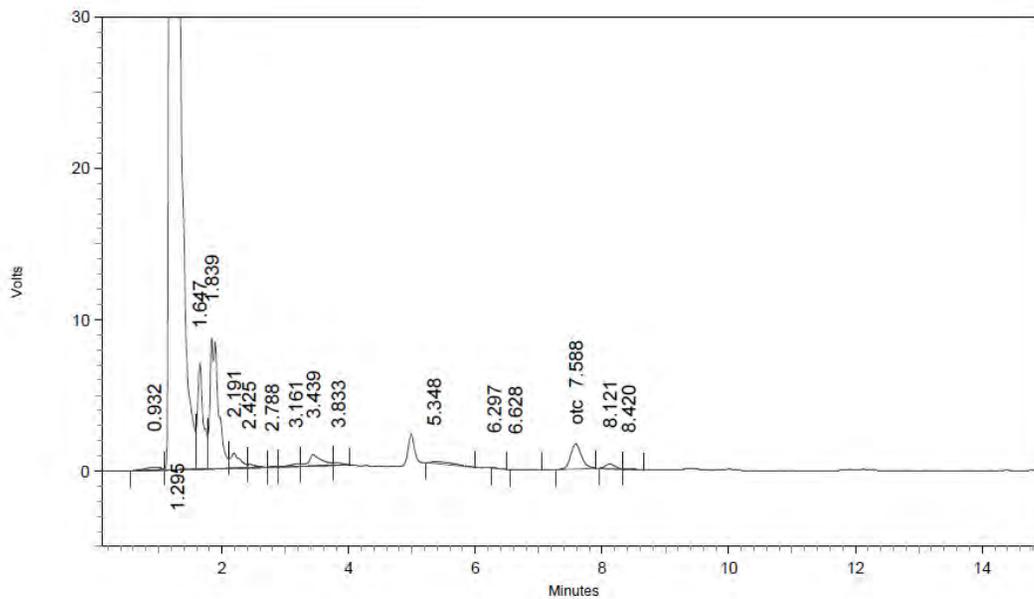


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.524	22659	9242.92



M-12 OTC 5-Mayo-2016

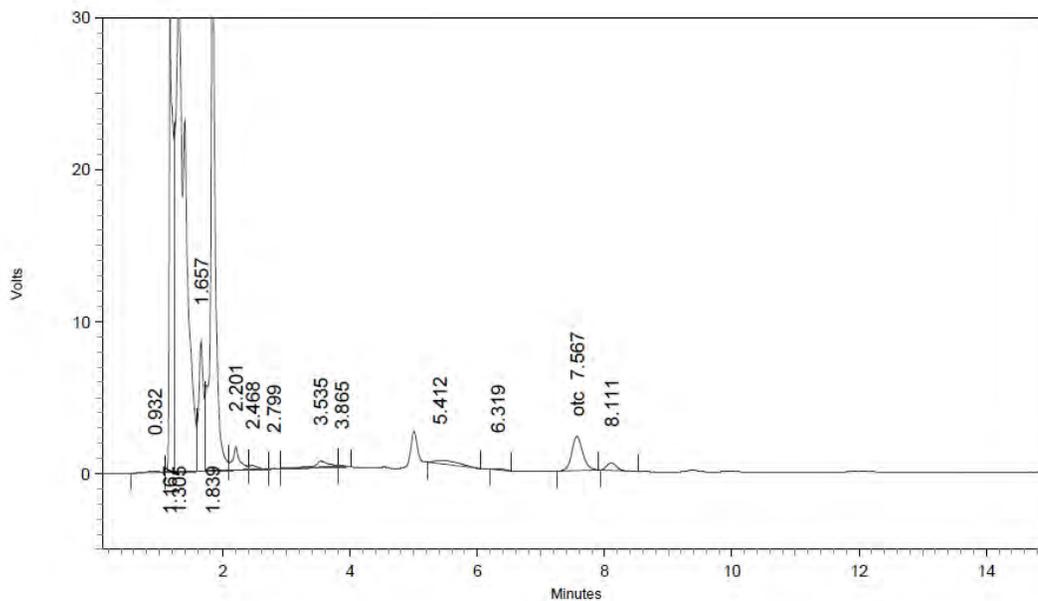


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.588	19567	9356.26



M-13 OTC 5-Mayo-2016

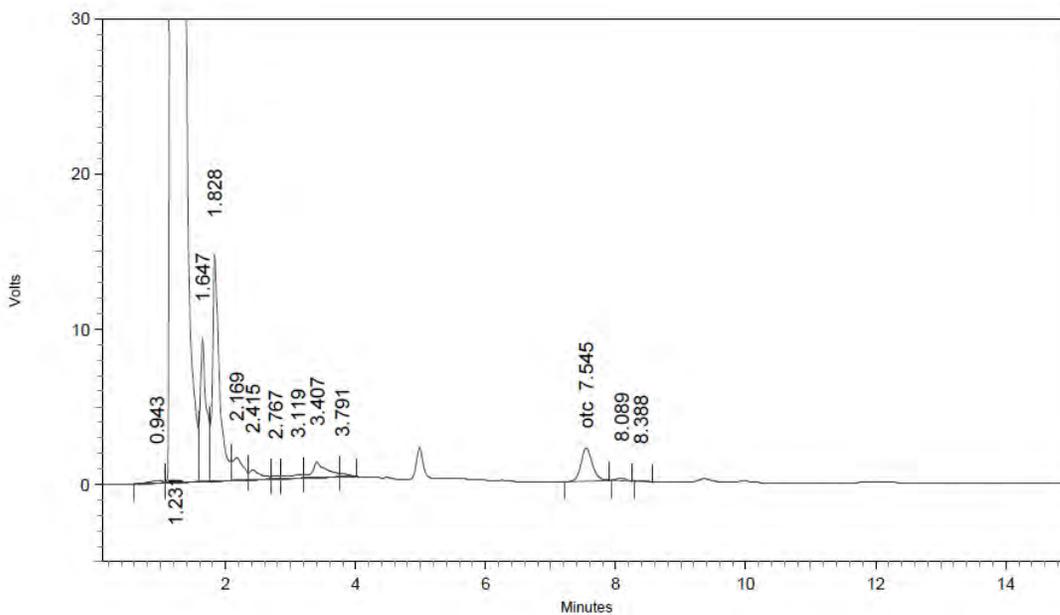


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.567	26992	9305.36



M-14 OTC 5-Mayo-2016

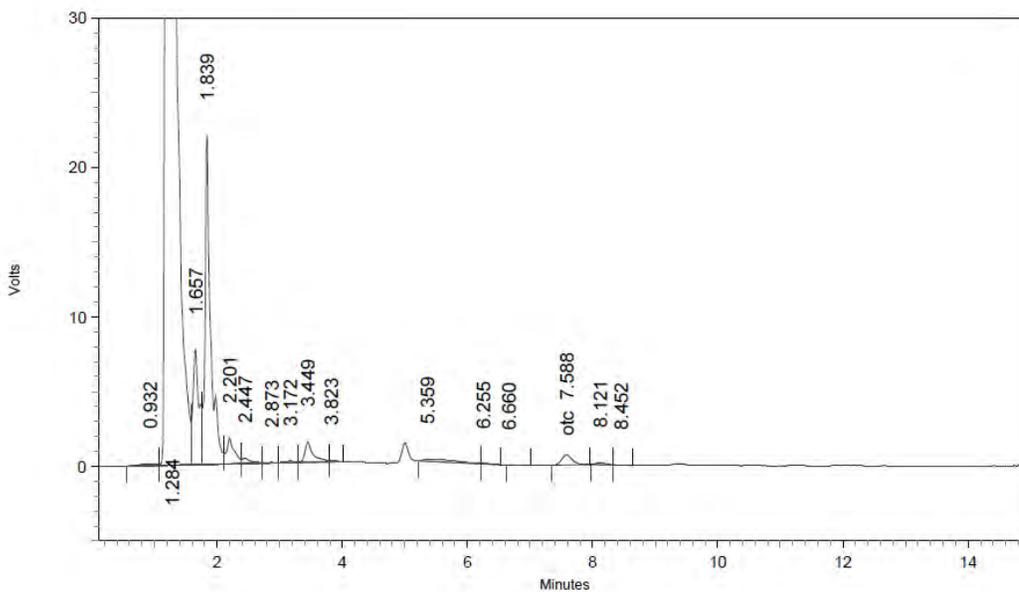


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.545	25825	8938.36



M-15 OTC 5-Mayo-2016

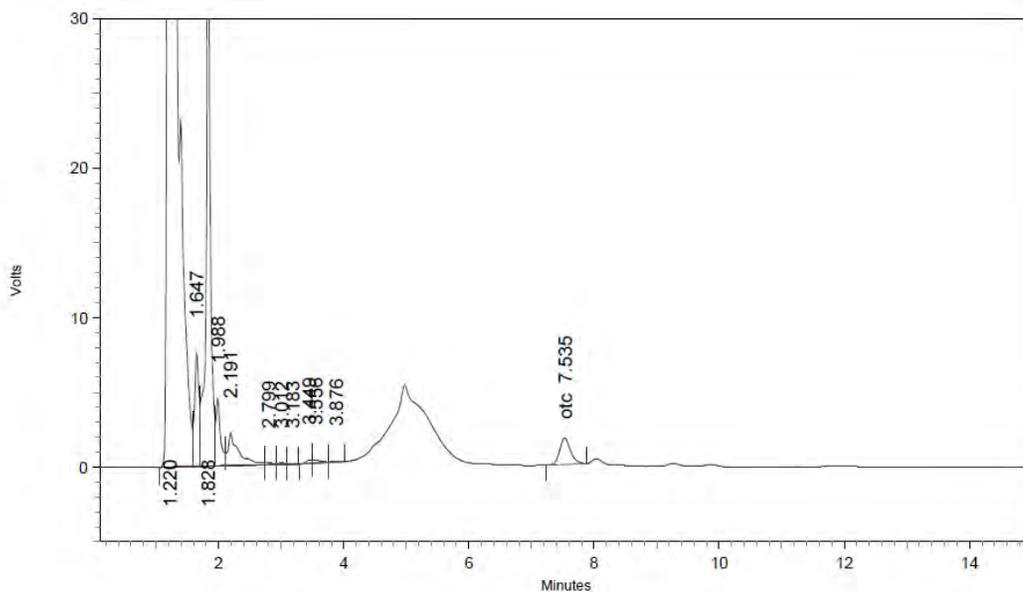


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.588	8120	9281.91



N-11 OTC 4-Mayo-2016

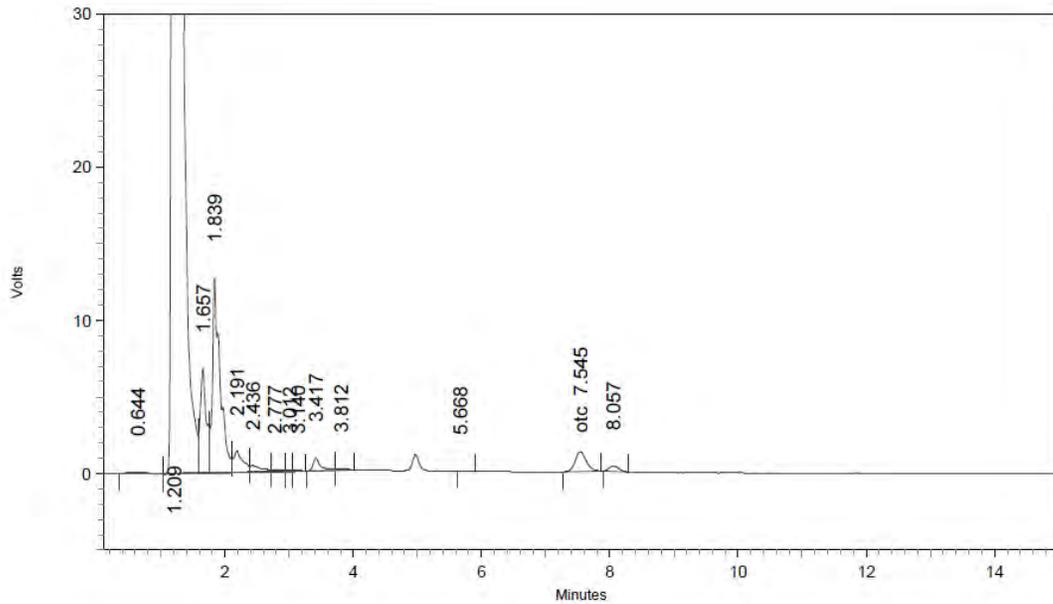


2: 355 mm, 8 mm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.535	21280	8953.43



N-12 OTC 4-Mayo-2016

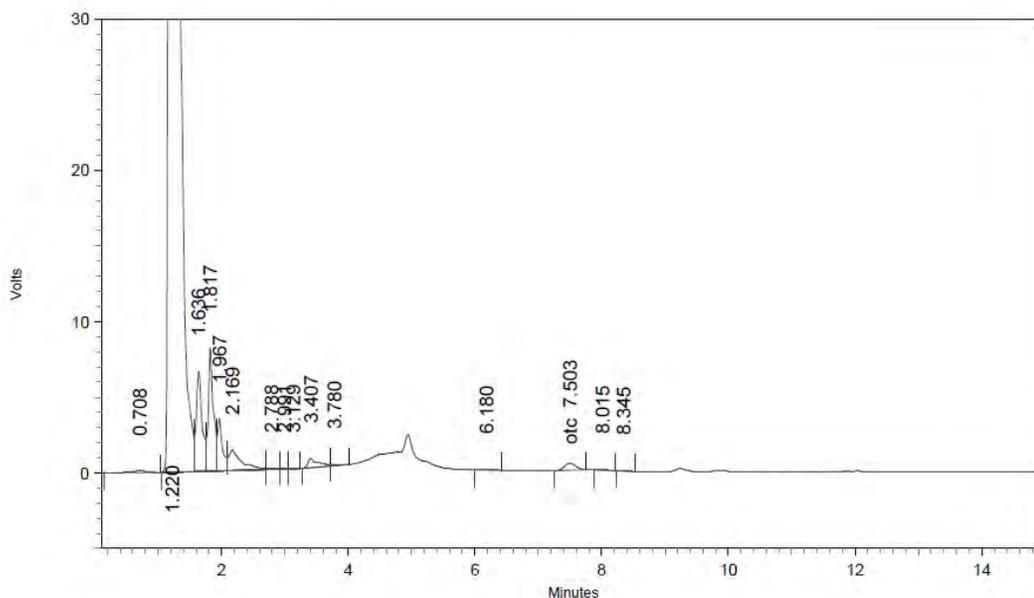


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.545	15584	8895.54



N-13 OTC 4-Mayo-2016

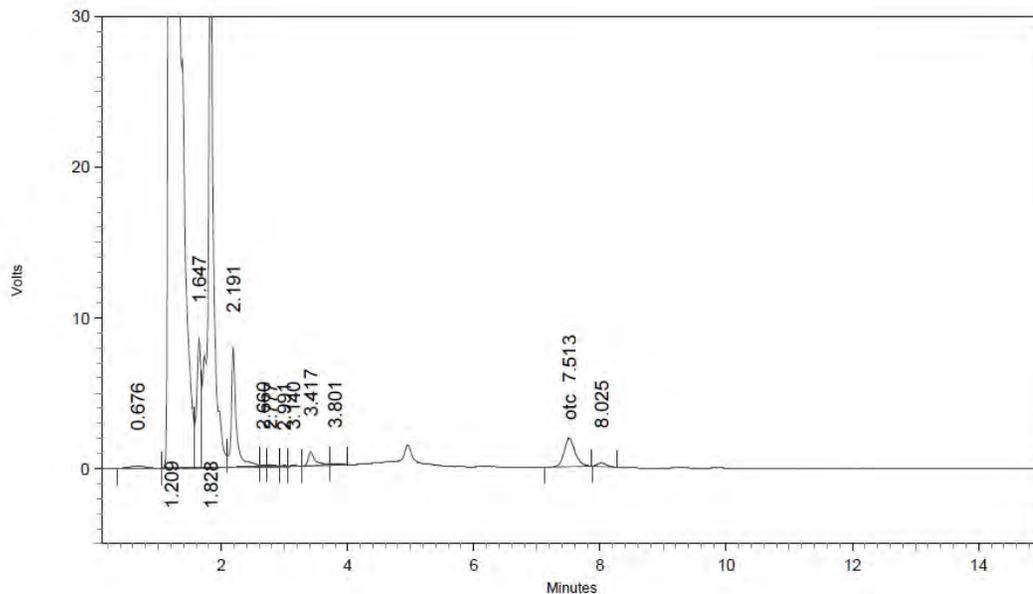


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.503	5817	8336.06



N-14 OTC 4-Mayo-2016

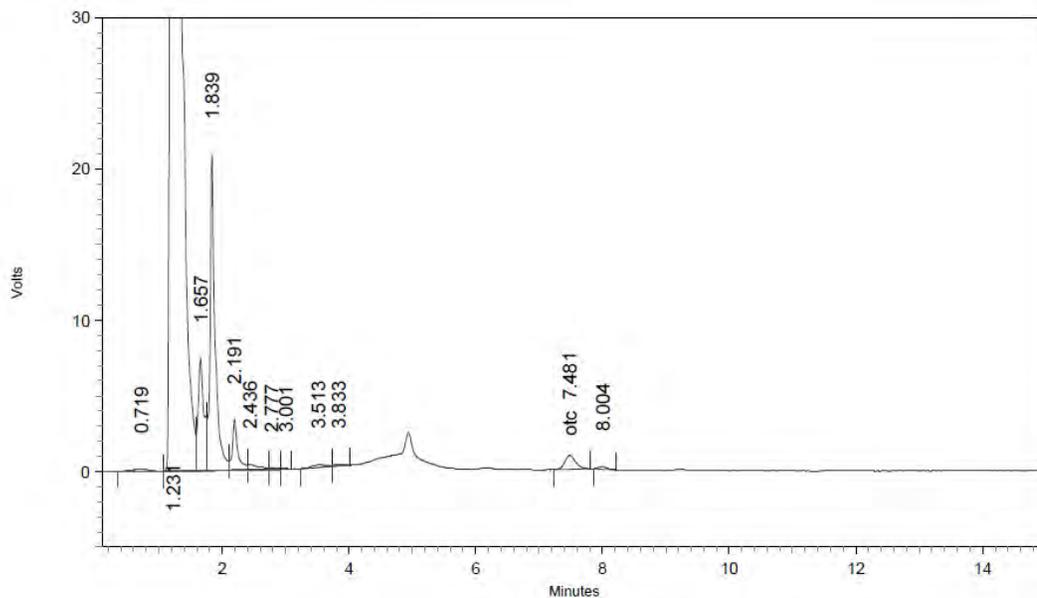


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.513	22828	8822.46



N-15 OTC 4-Mayo-2016

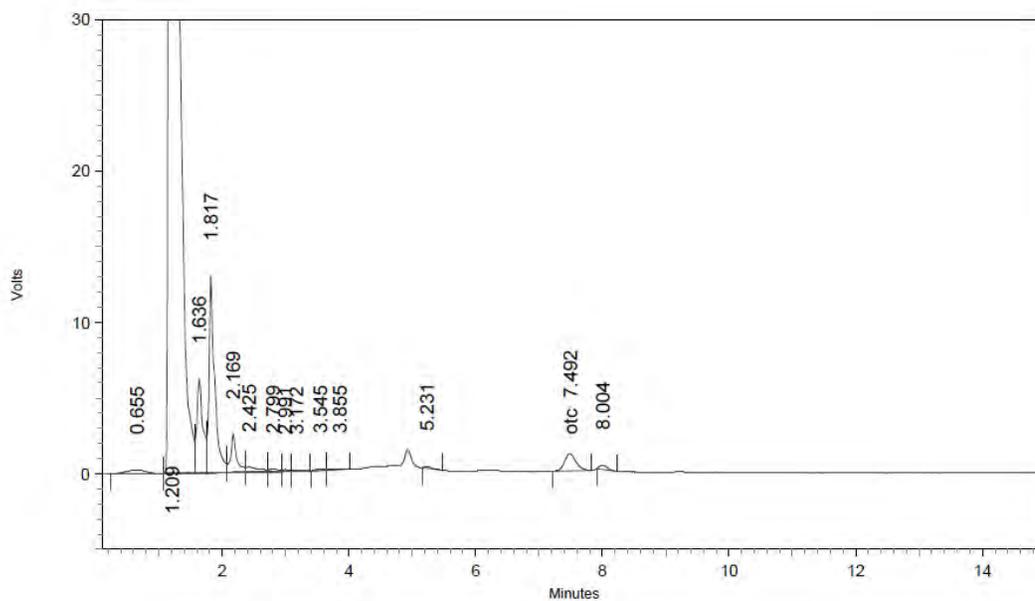


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.481	10867	9035.01



O-11 OTC 4-Mayo-2016

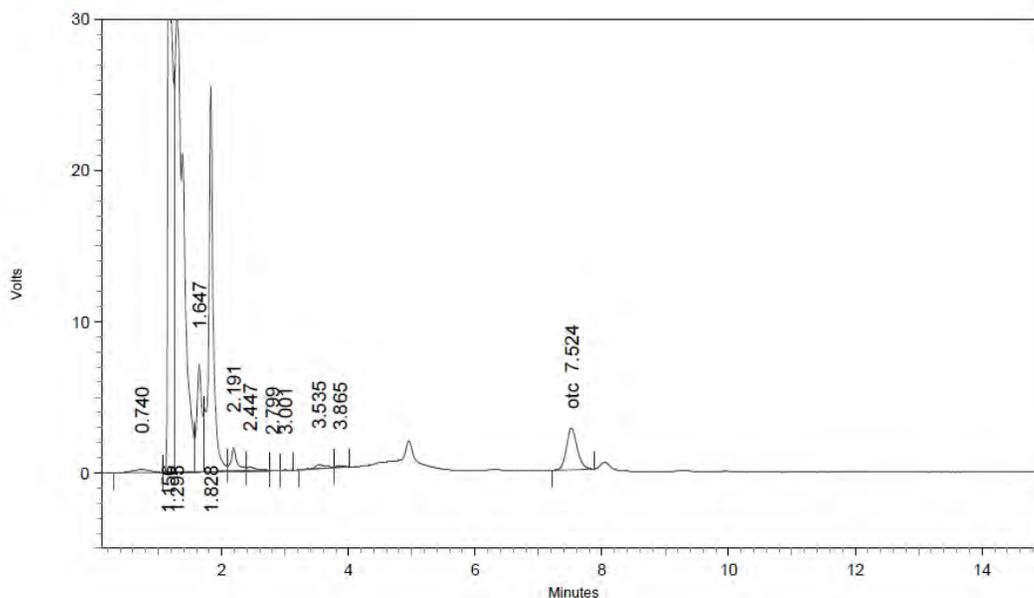


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.492	14250	8230.28



O-12 OTC 4-Mayo-2016

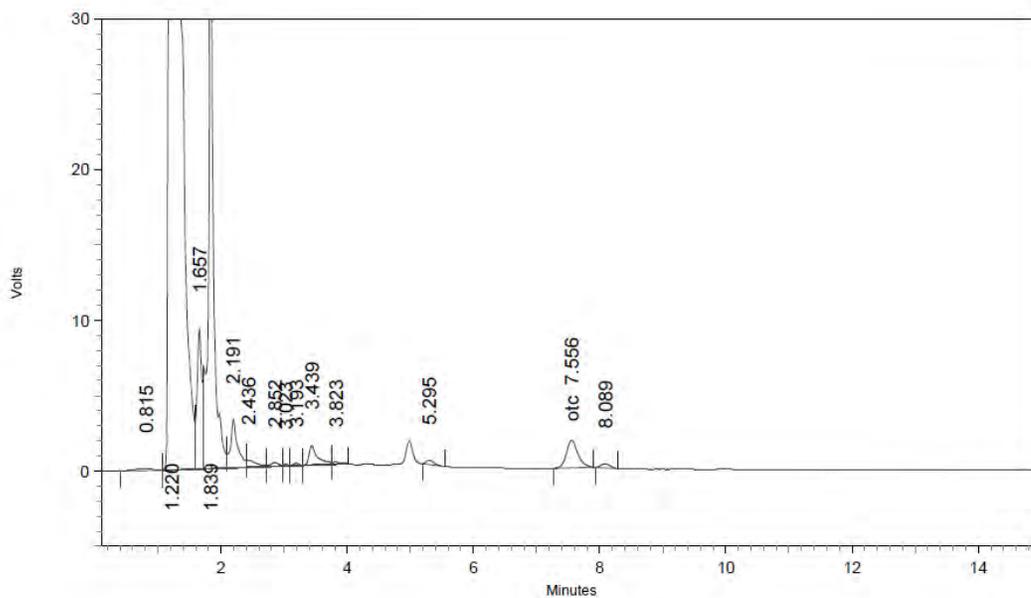


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.524	32888	9115.52



O-13 OTC 4-Mayo-2016

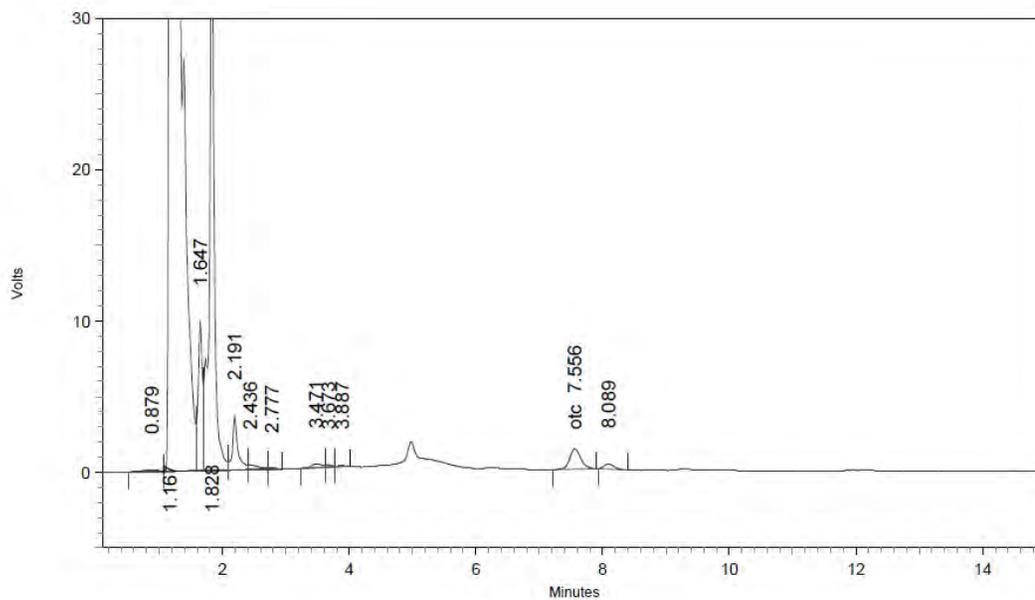


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.556	23135	8511.66



O-14 OTC 4-Mayo-2016

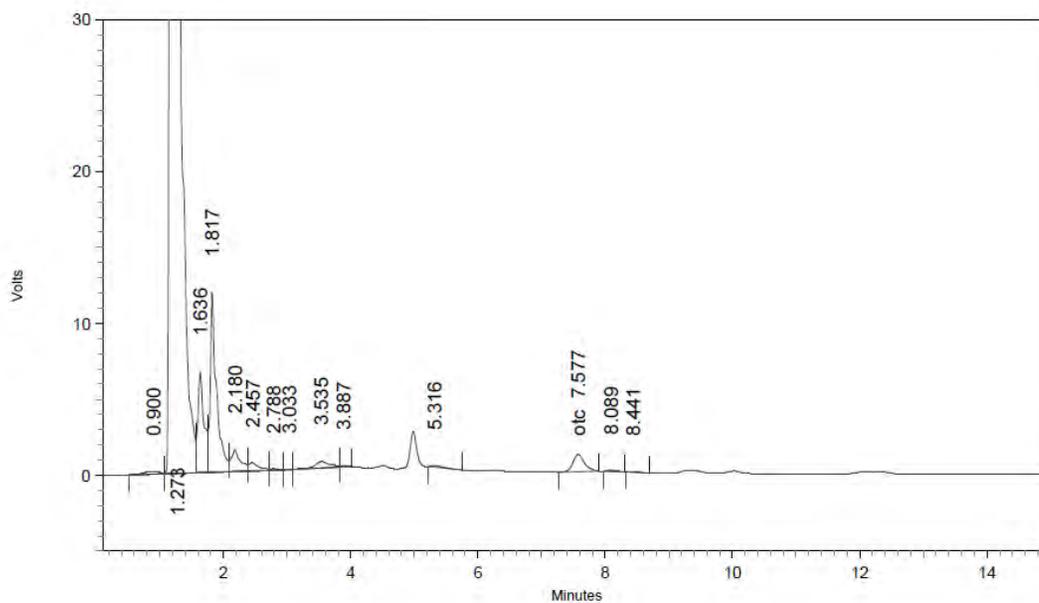


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.556	16410	8735.13



O-15 OTC 4-Mayo-2016

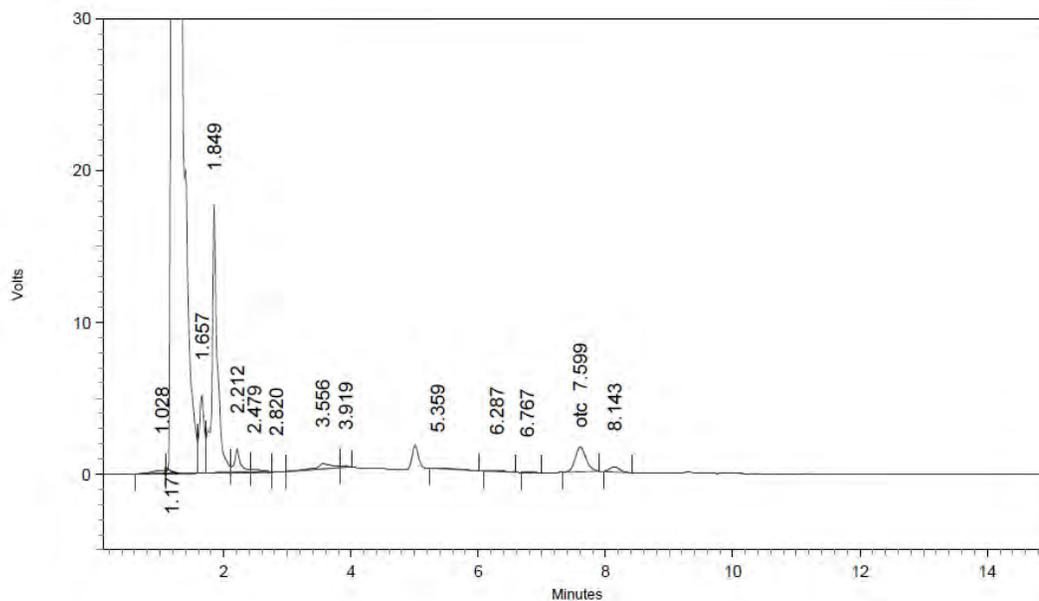


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.577	14338	8594.05



M-16 OTC 4-Mayo-2016

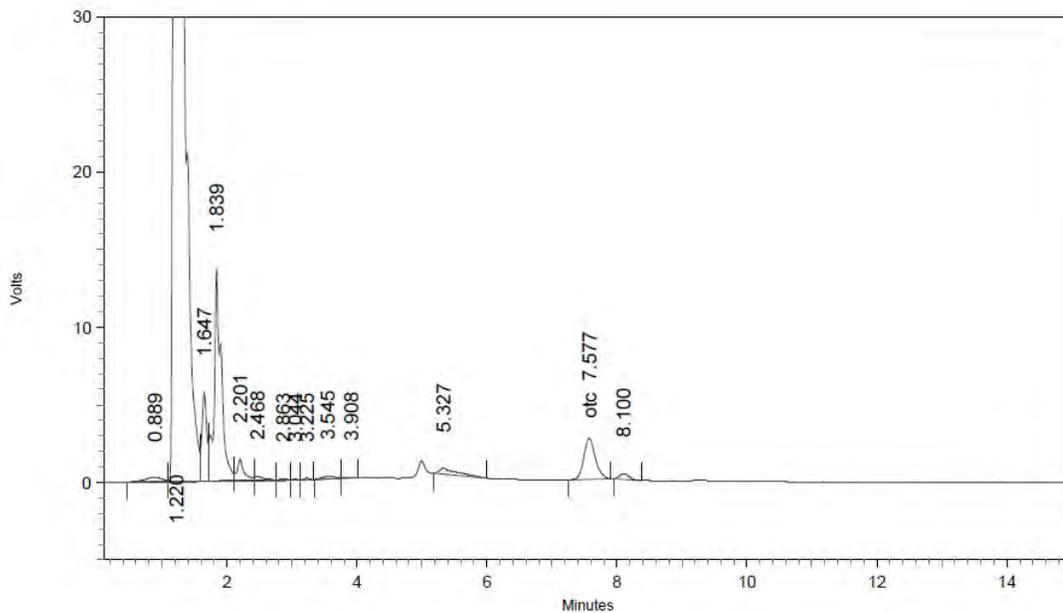


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.599	19473	9107.64



N-16 OTC 4-Mayo-2016

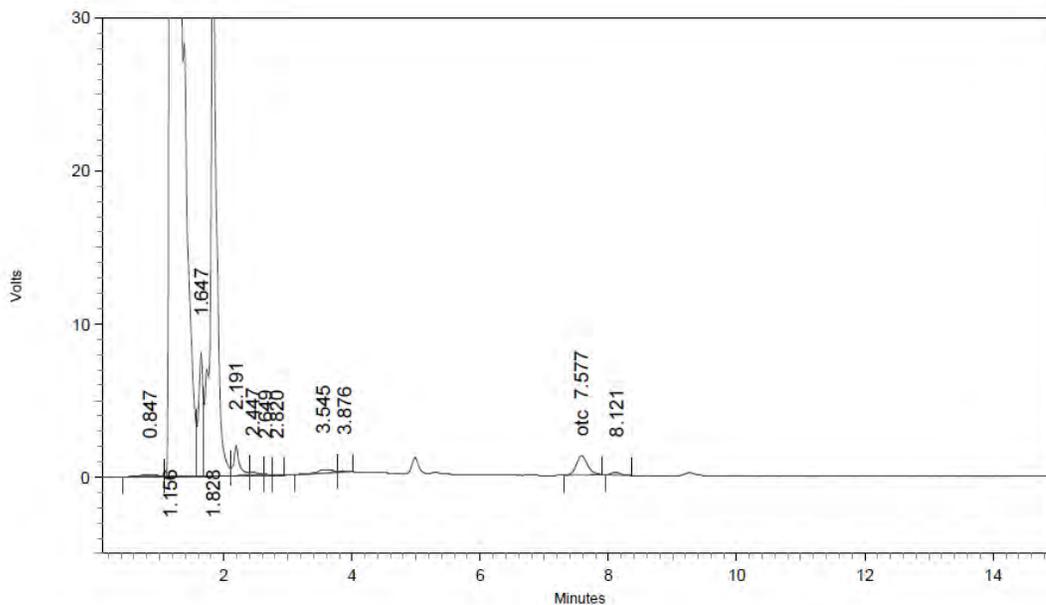


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.577	32763	8723.39



N-17 OTC 4-Mayo-2016

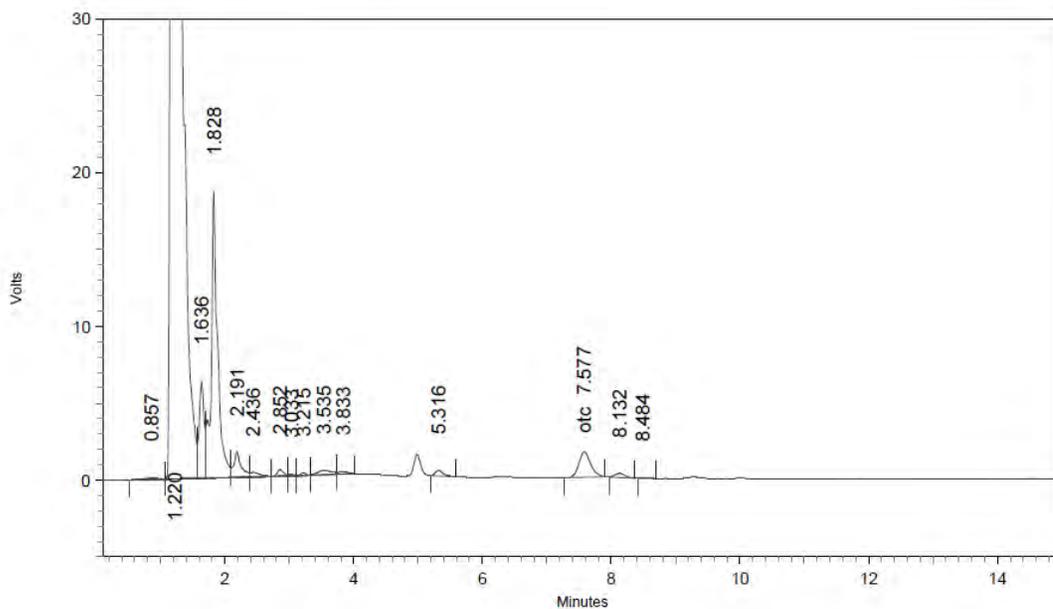


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.577	15338	8705.01



N-18 OTC 4-Mayo-2016

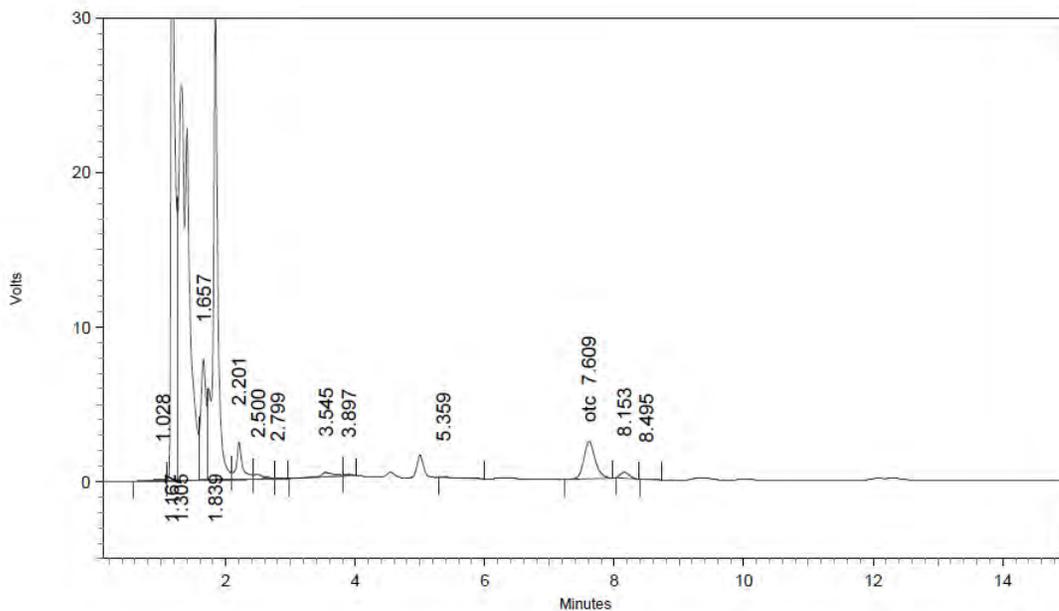


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.577	20982	8245.69



N-19 OTC 4-Mayo-2016

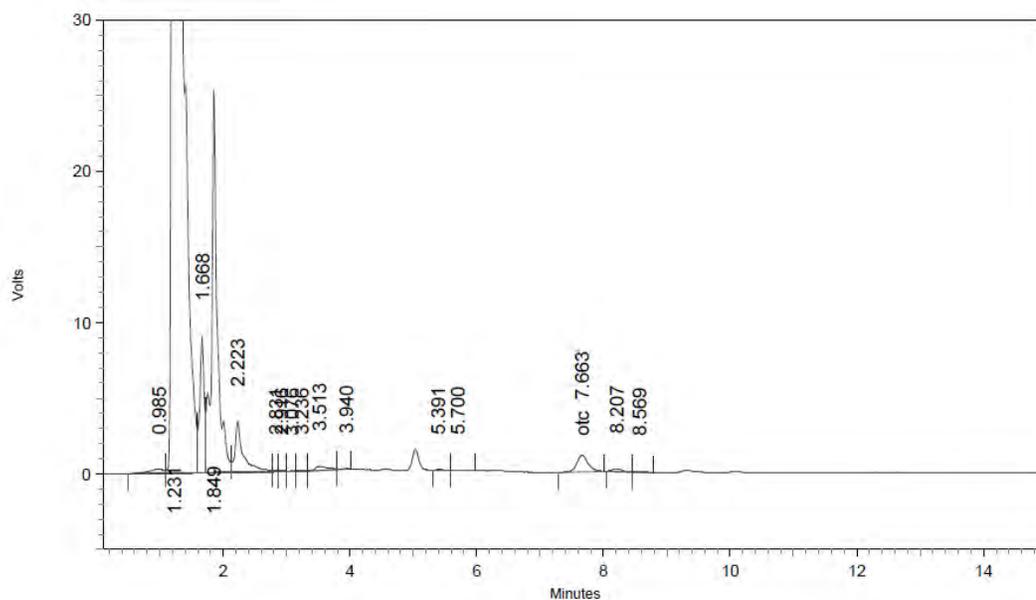


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.609	29604	8992.06



N-20 OTC 4-Mayo-2016



2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.663	13766	9145.11





Anexo 8.11. Resultados de OTC en piel-músculo de Trucha para el cálculo de la curva de depleción de Terrivet en condiciones controladas

Fecha análisis	Nº Mx	Días post-inyección	área	Conc obtenida ng/g
23/06/2016	AP-1	30	141.396	1097,0
23/06/2016	AP-2	30	28.015	222,2
23/06/2016	AP-3	30	38.699	305,5
23/06/2016	AP-4	30	106.088	830,4
23/06/2016	AP-5	30	85.874	653,9
29/06/2016	AQ-1	30	989	12,5
29/06/2016	AQ-2	30	49.567	386,7
29/06/2016	AQ-3	30	30.868	238,5
29/06/2016	AQ-4	30	27.666	214,3
29/06/2016	AQ-5	30	61.389	473,1
23/06/2016	AP-6	38	39.016	303,8
23/06/2016	AP-7	38	33.645	258,2
23/06/2016	AP-8	38	30.585	240,5
23/06/2016	AP-9	38	27.336	208,5
23/06/2016	AP-10	38	17.028	131,5
29/06/2016	AQ-6	38	45.100	348,2
29/06/2016	AQ-7	38	72.036	550,2
29/06/2016	AQ-8	38	42.031	318,2
29/06/2016	AQ-9	38	41.086	314,0
29/06/2016	AQ-10	38	27.986	212,3
29/06/2016	AP-11	44	43.118	331,5
29/06/2016	AP-12	44	23.397	177,1
29/06/2016	AP-13	44	46.225	353,6
29/06/2016	AP-14	44	24.193	182,8
29/06/2016	AP-15	44	76.241	581,4
29/06/2016	AQ-11	44	70.813	551,3

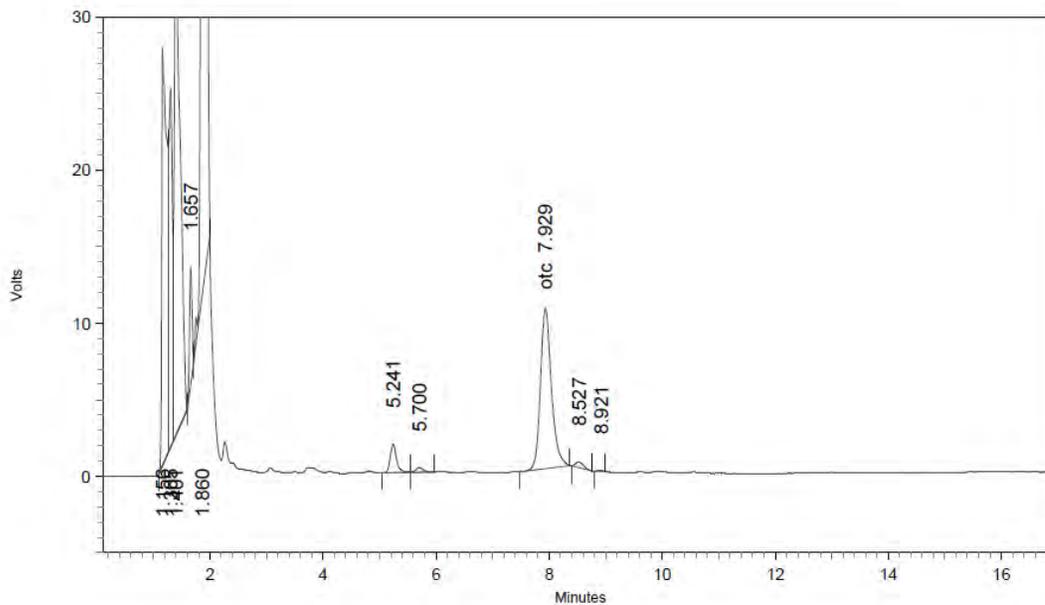


29/06/2016	AQ-12	44	79.358	621,8
29/06/2016	AQ-13	44	40.287	310,2
29/06/2016	AQ-14	44	25.976	205,9
29/06/2016	AQ-15	44	23.382	179,0
23/06/2016	AP-16	55	29.900	237,3
23/06/2016	AP-17	55	20.941	161,6
23/06/2016	AP-18	55	15.668	122,0
23/06/2016	AP-19	55	20.094	159,3
23/06/2016	AP-20	55	14.577	109,0
29/06/2016	AQ-16	55	32.691	253,2
30/06/2016	AQ-17	55	21.773	168,8
30/06/2016	AQ-18	55	3.088	12,5
30/06/2016	AQ-19	55	6.449	25,0
30/06/2016	AQ-20	55	21.780	167,2



Anexo 8.12. Cromatogramas de curva de depleci3n Terrivet trucha, condiciones controladas

AP-1 OTC 23-Junio-2016

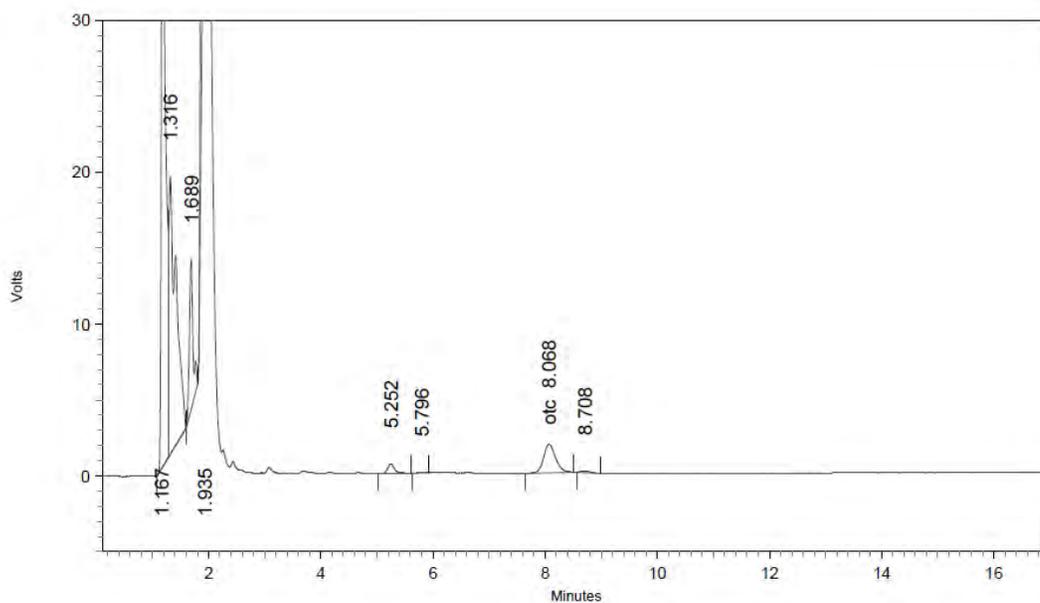


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.929	141396	8270.29



AP-2 OTC 23-Junio-2016

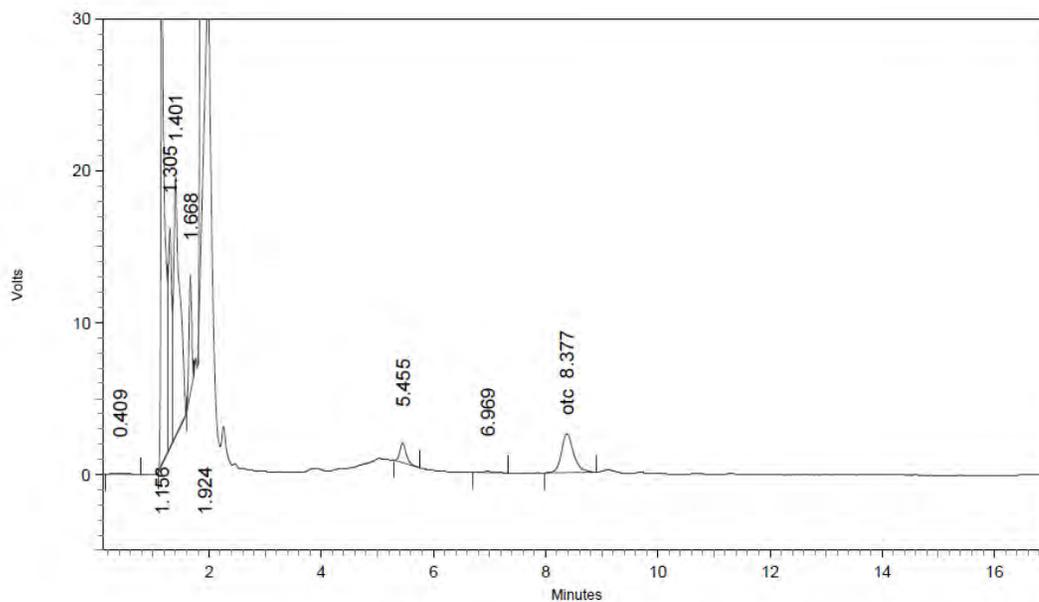


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.068	28015	6889.30



AP-3 OTC 23-Junio-2016

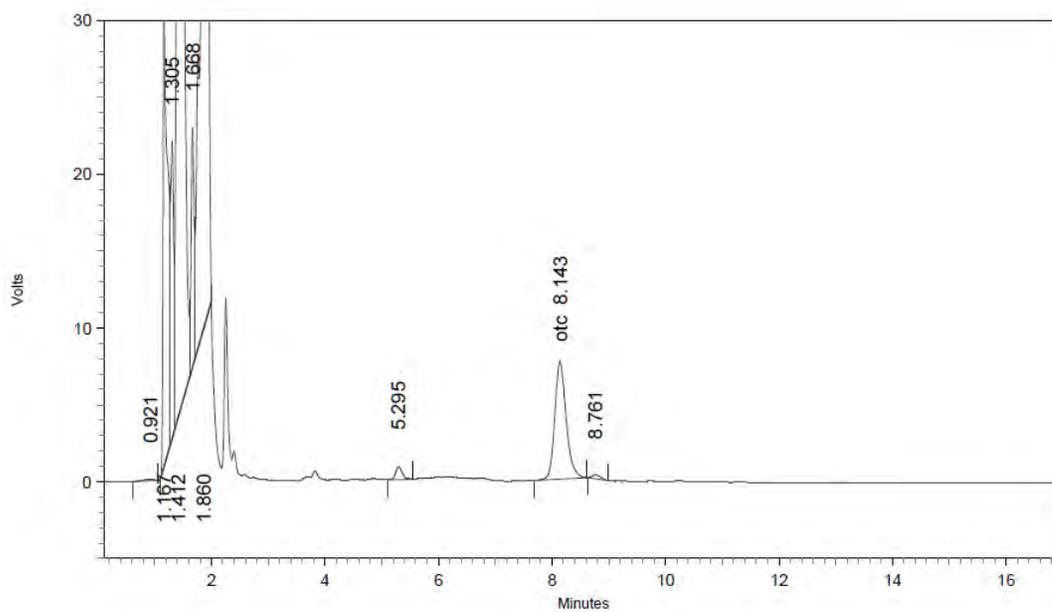


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.377	38699	7364.88



AP-4 OTC 23-Junio-2016

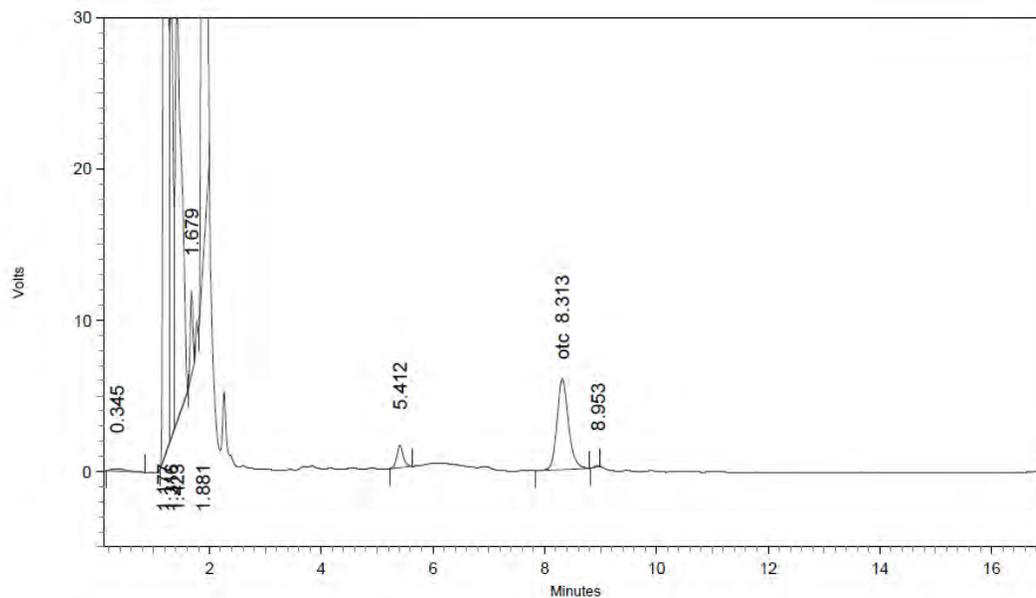


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.143	106088	8252.15



AP-5 OTC 23-Junio-2016

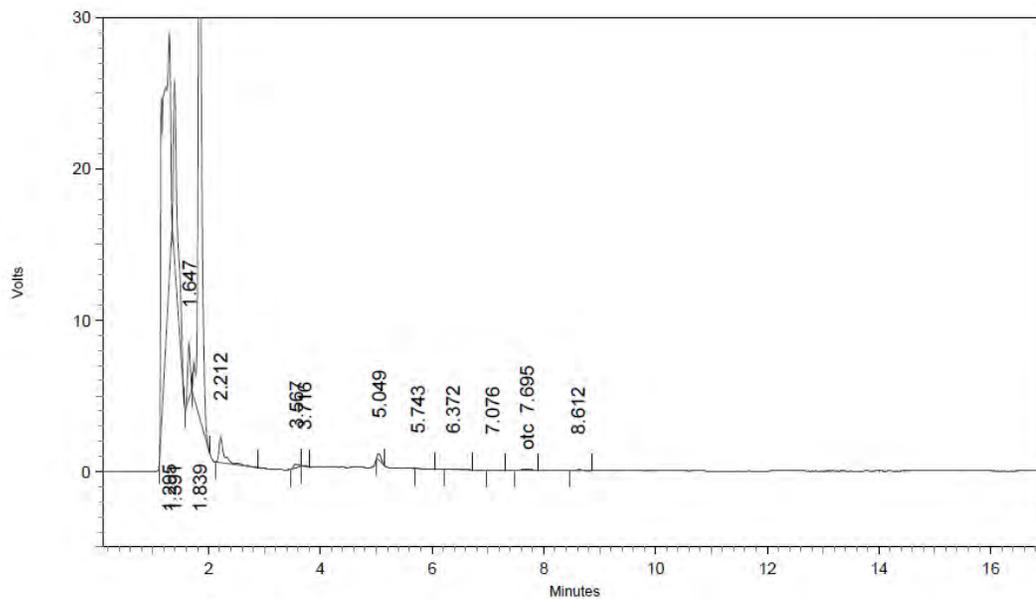


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.313	85874	8053.02



AQ-1 OTC 29-Junio-2016

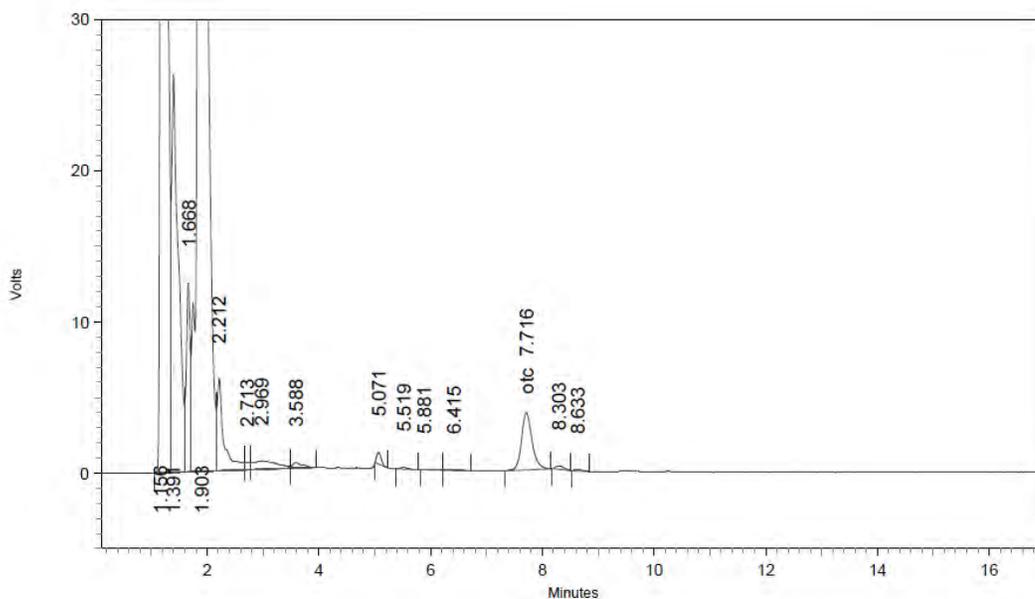


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.695	989	7991.32



AQ-2 OTC 29-Junio-2016

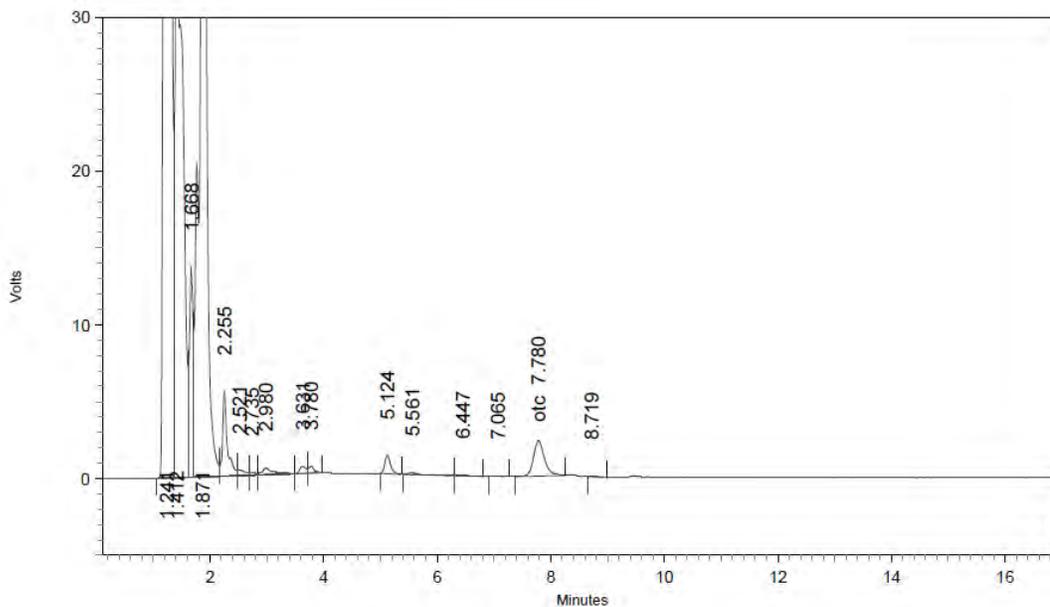


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.716	49567	8338.83



AQ-3 OTC 29-Junio-2016

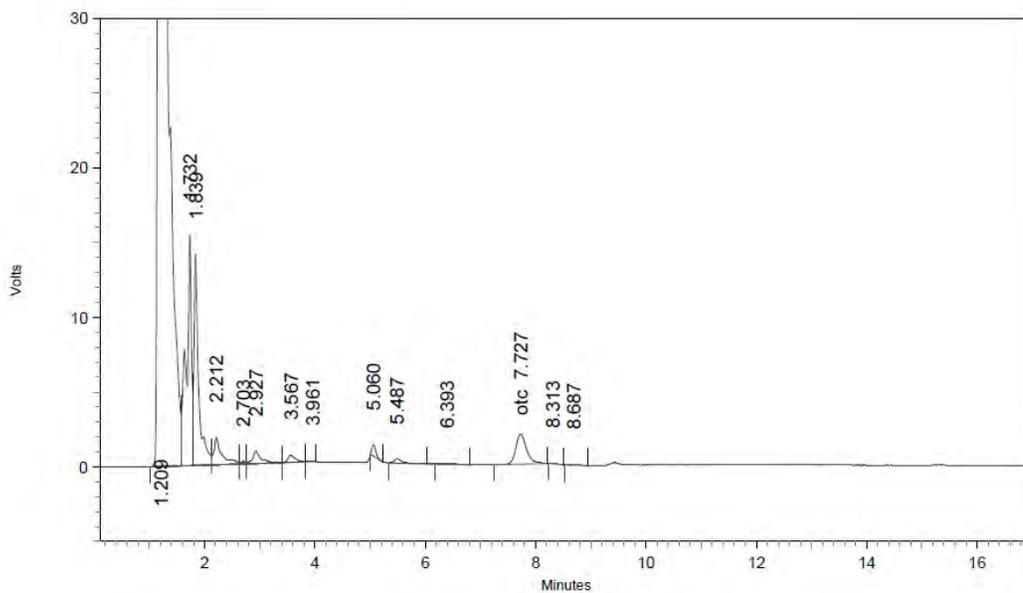


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.780	30868	8101.50



AQ-4 OTC 29-Junio-2016

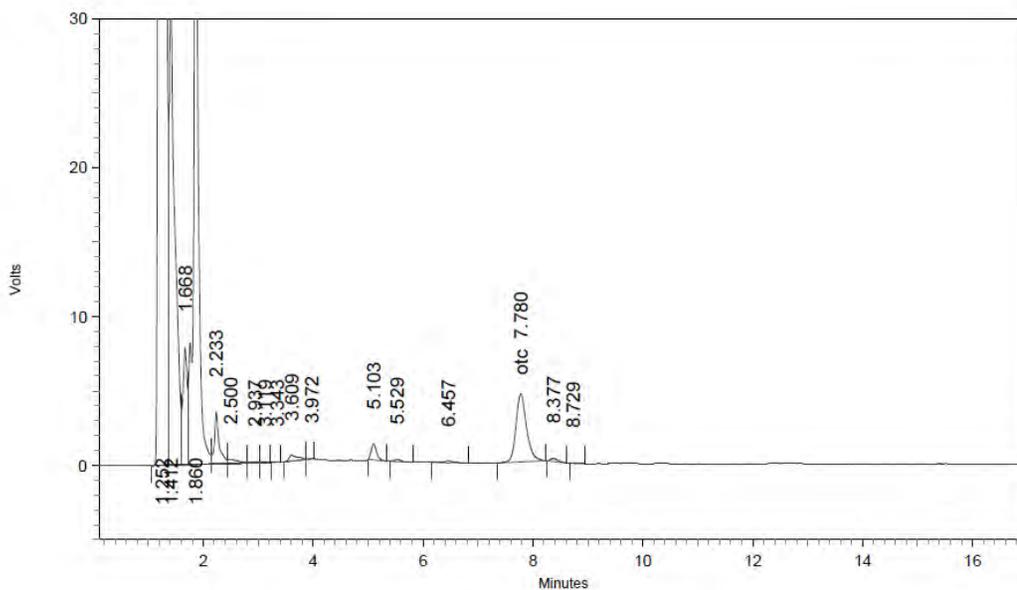


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.727	27666	7713.70



AQ-5 OTC 29-Junio-2016

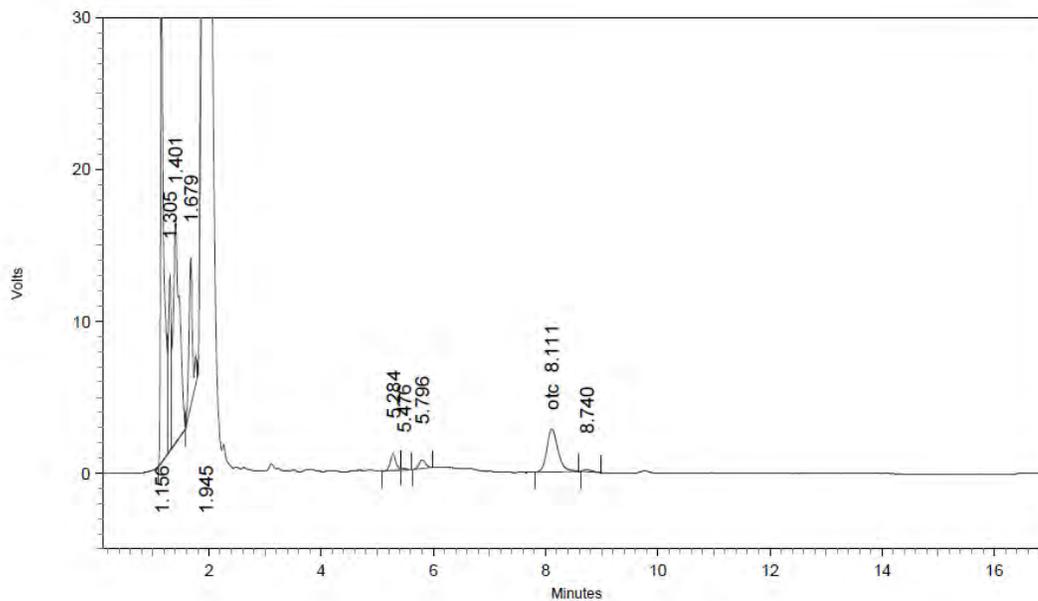


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.780	61389	8002.61



AP-6 OTC 23-Junio-2016

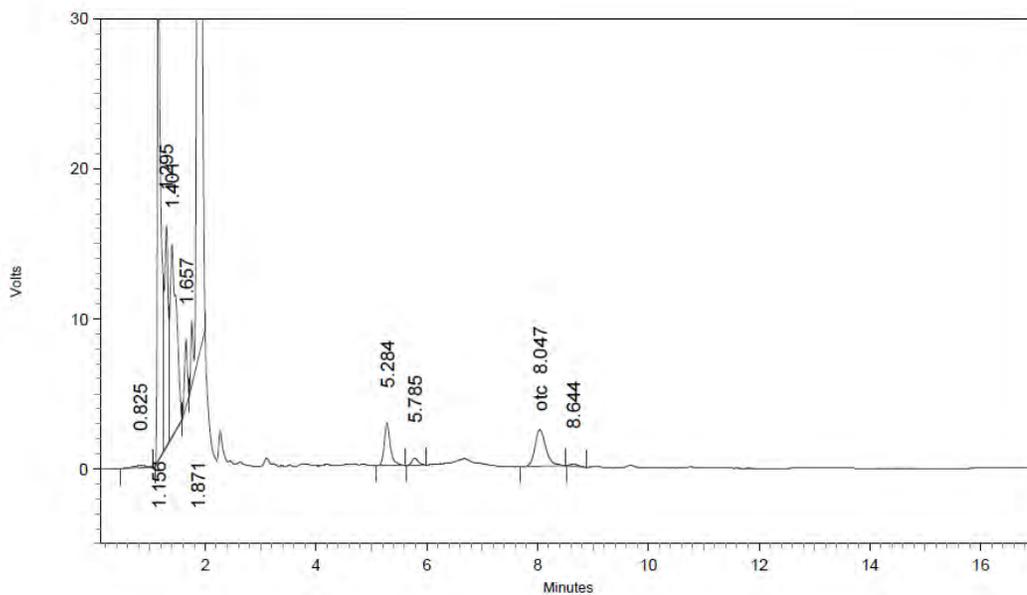


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.111	39016	8208.41



AP-7 OTC 23-Junio-2016

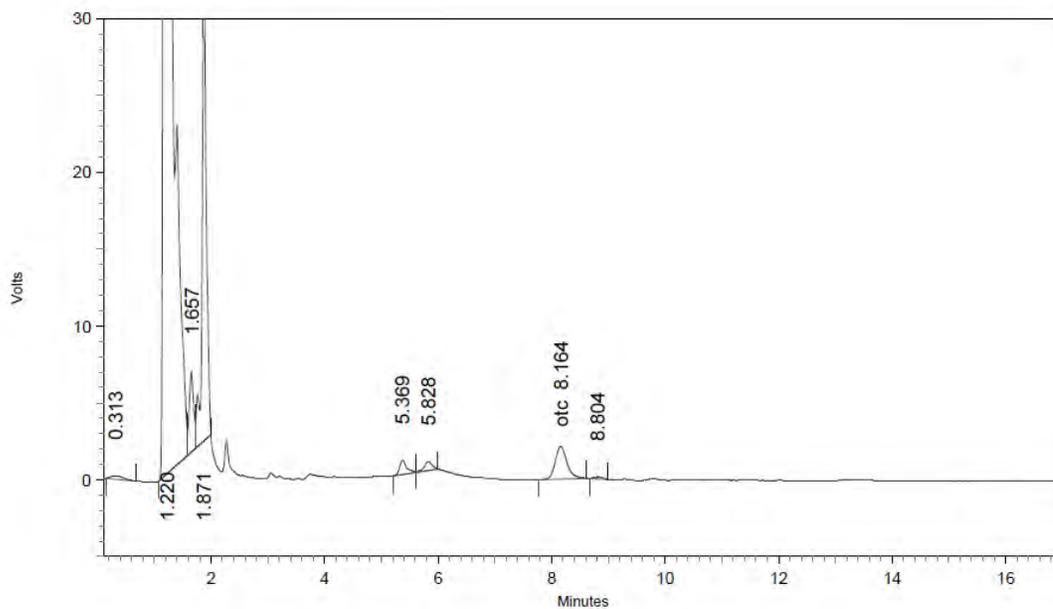


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.047	33645	8129.63



AP-8 OTC 23-Junio-2016

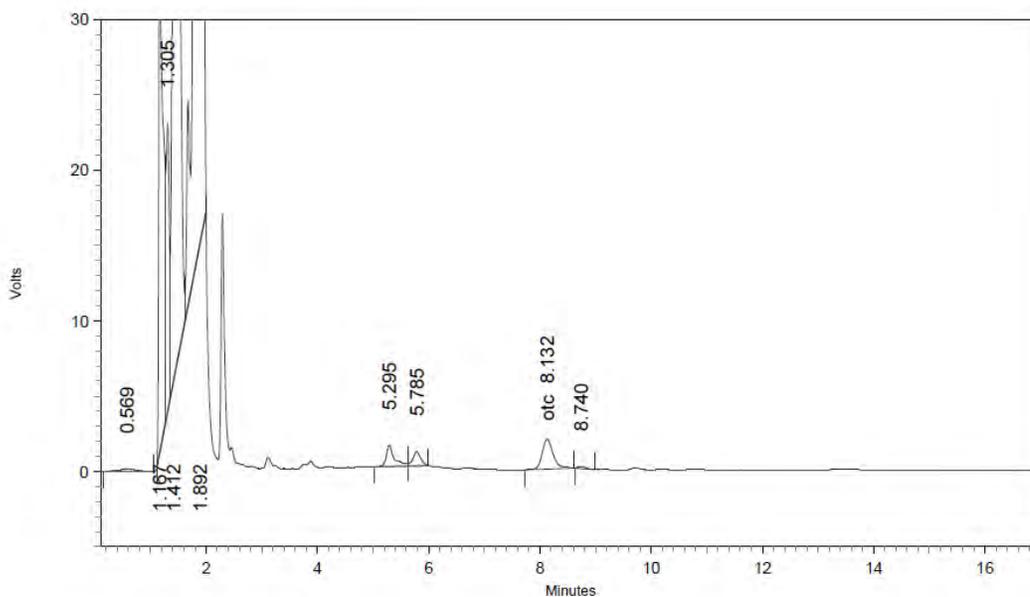


2: 355 mm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.164	30585	7752.08



AP-9 OTC 23-Junio-2016

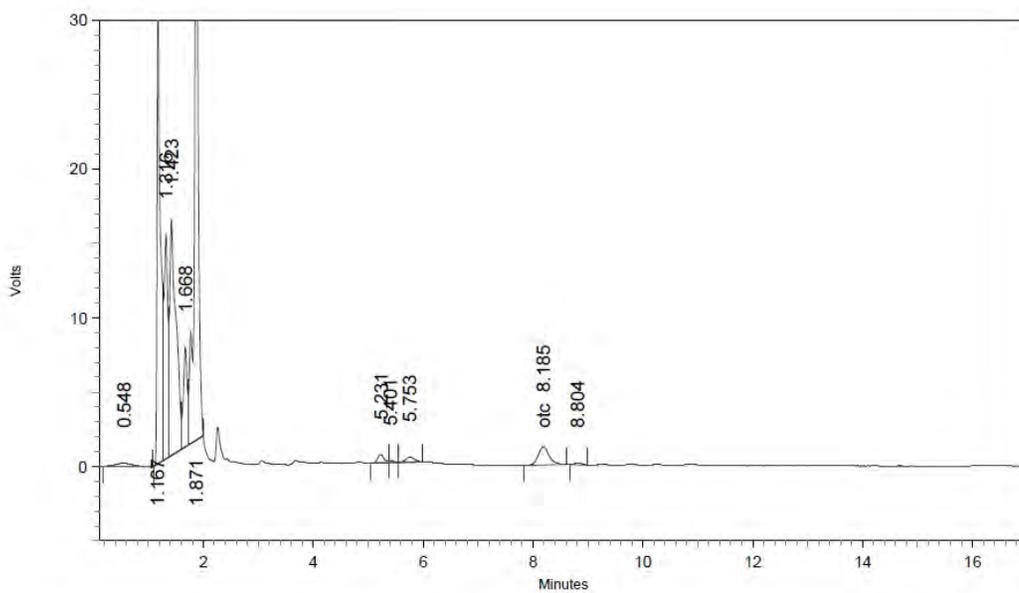


2: 355 mm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.132	27336	8598.88



AP-10 OTC 23-Junio-2016

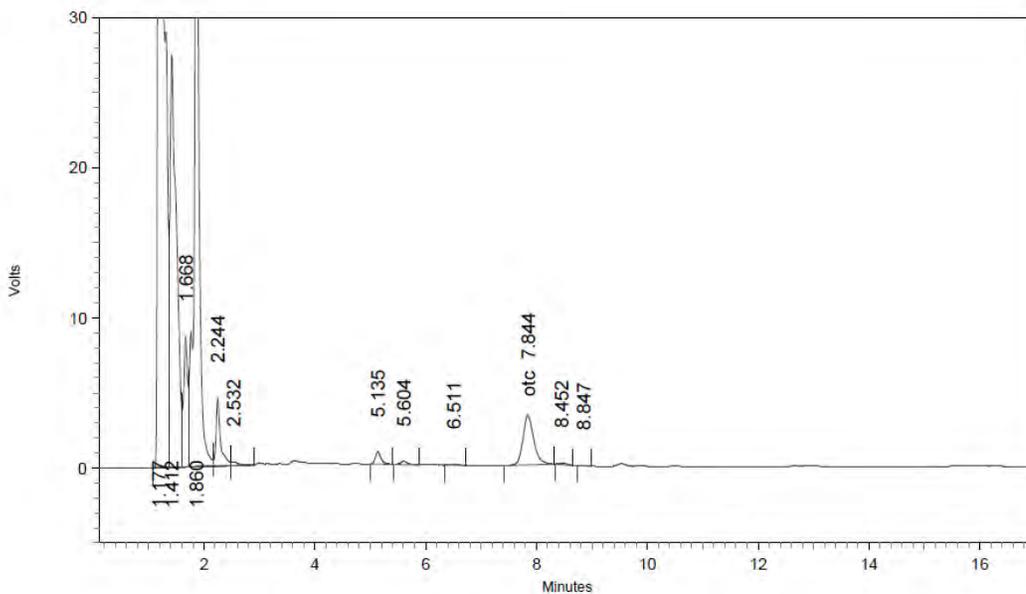


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.185	17028	8101.66



AQ-6 OTC 29-Junio-2016

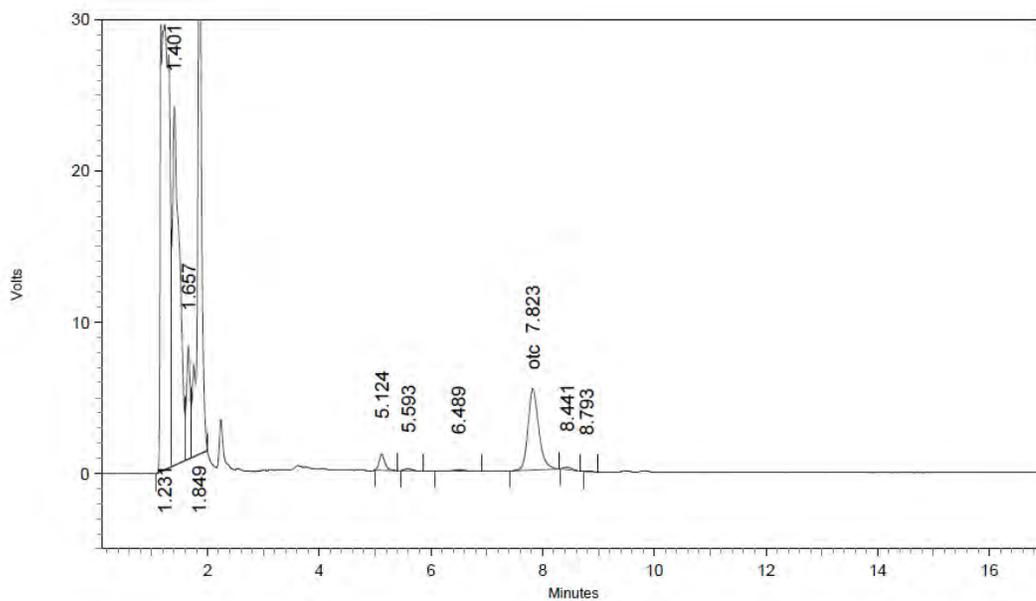


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.844	45100	8028.84



AQ-7 OTC 29-Junio-2016

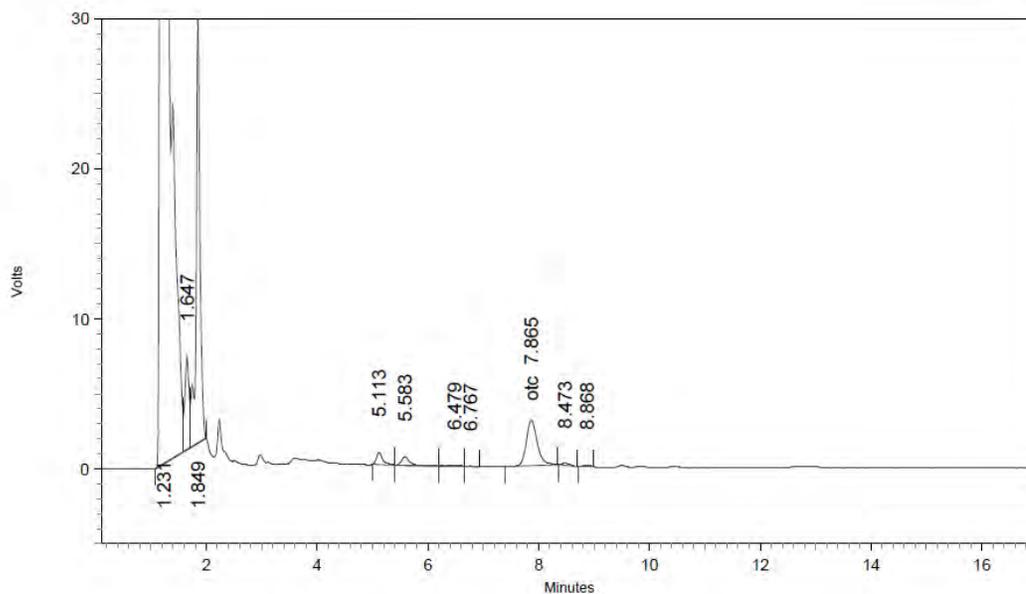


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.823	72036	8197.81



AQ-8 OTC 29-Junio-2016

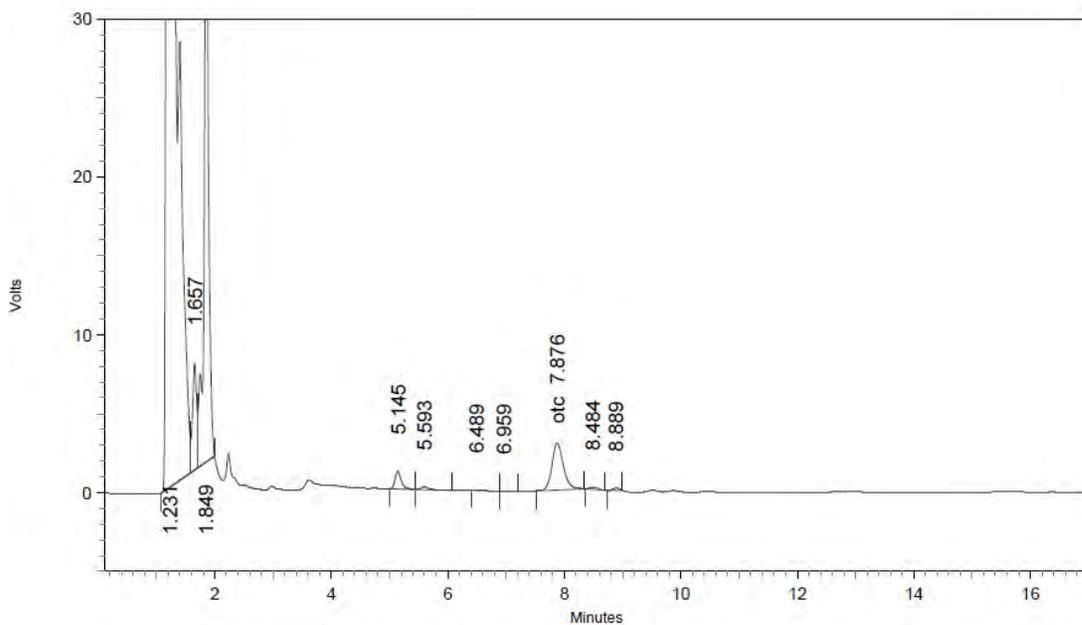


2: 355 mm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.865	42031	7934.84



AQ-9 OTC 29-Junio-2016

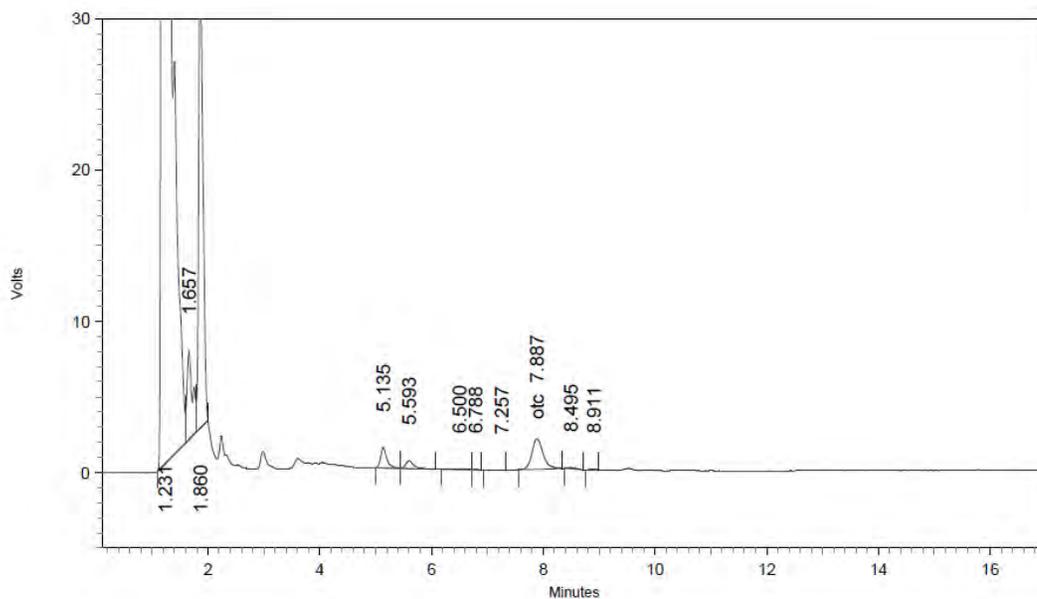


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.876	41086	7809.78



AQ-10 OTC 29-Junio-2016

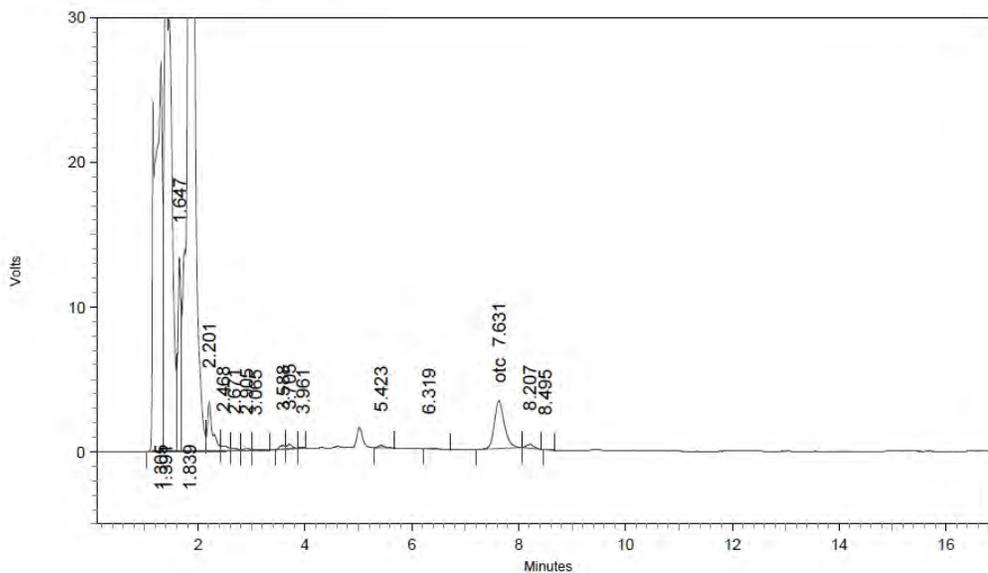


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.887	27986	7531.35



AP-11 OTC 29-Junio-2016

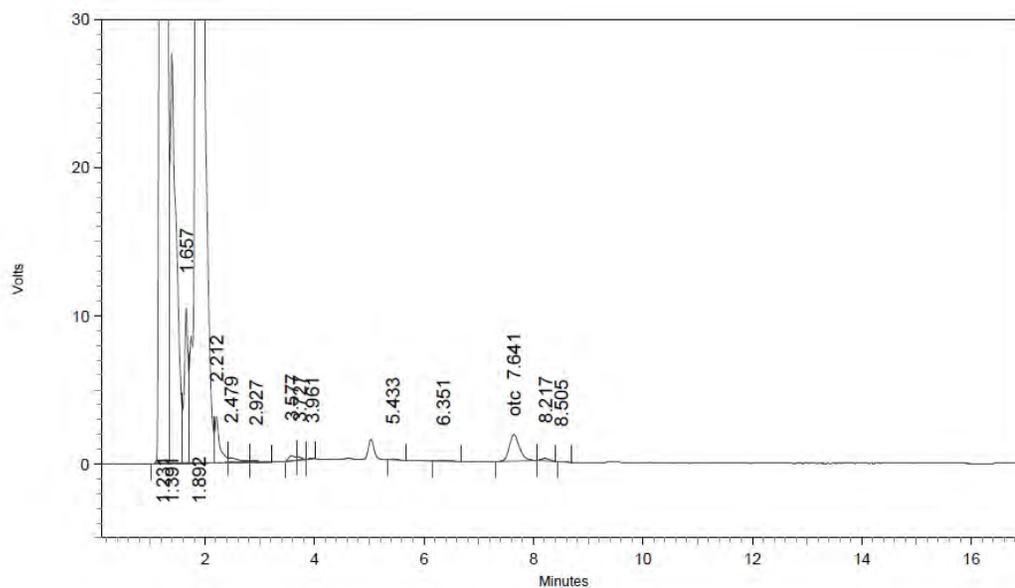


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.631	43118	8121.22



AP-12 OTC 29-Junio-2016

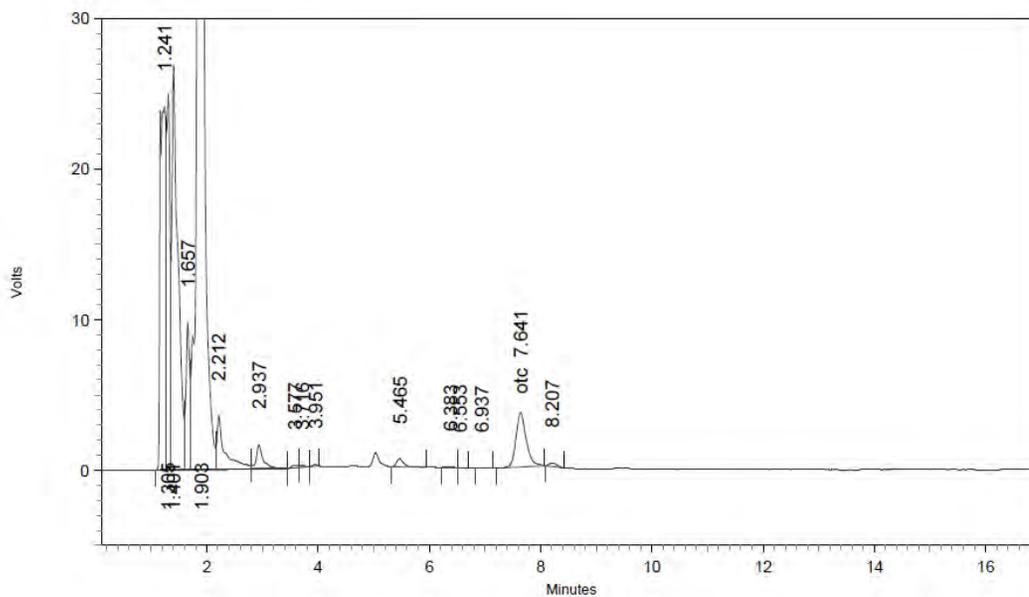


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.641	23397	8198.96



AP-13 OTC 29-Junio-2016

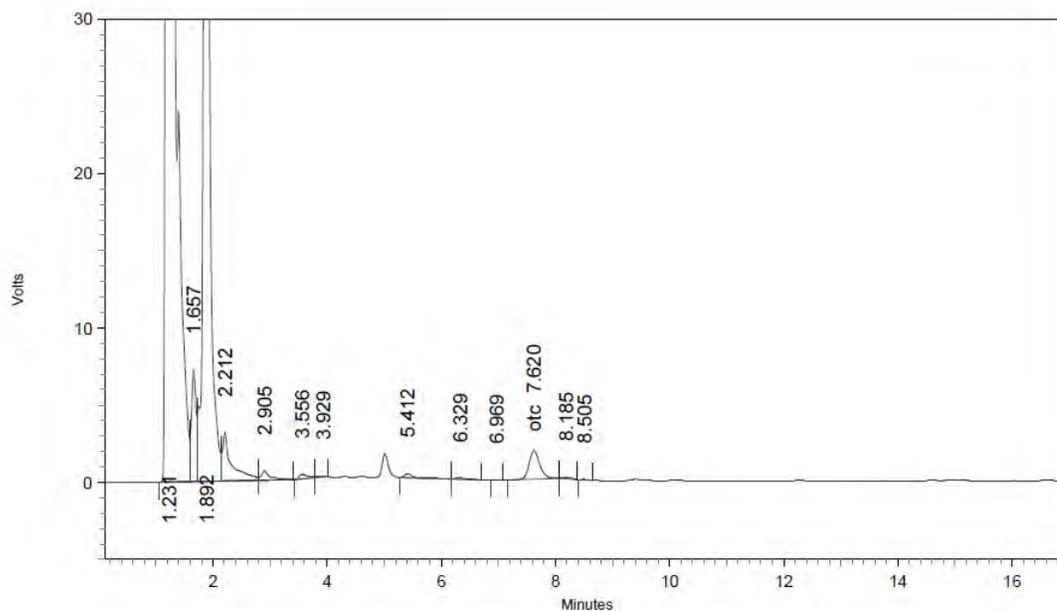


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.641	46225	8542.61



AP-14 OTC 29-Junio-2016

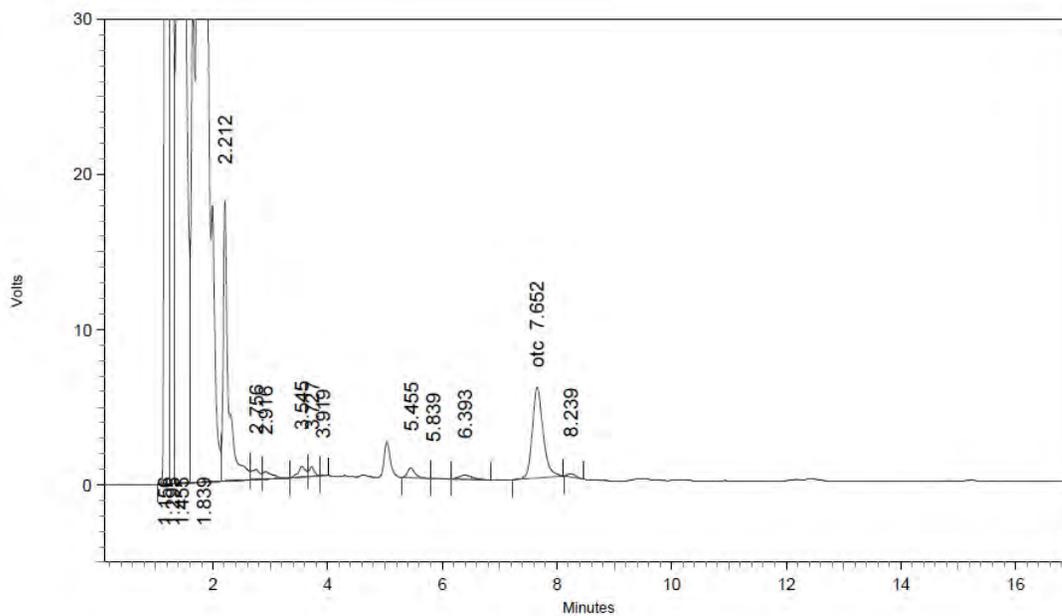


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.620	24193	8145.36



AP-15 OTC 29-Junio-2016

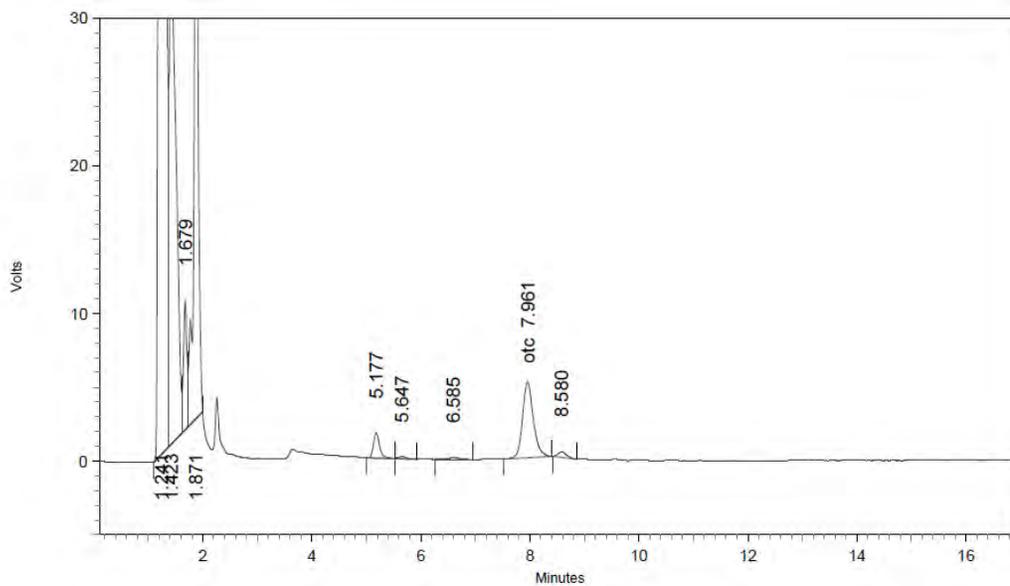


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.652	76241	8291.21



AQ-11 OTC 29-Junio-2016

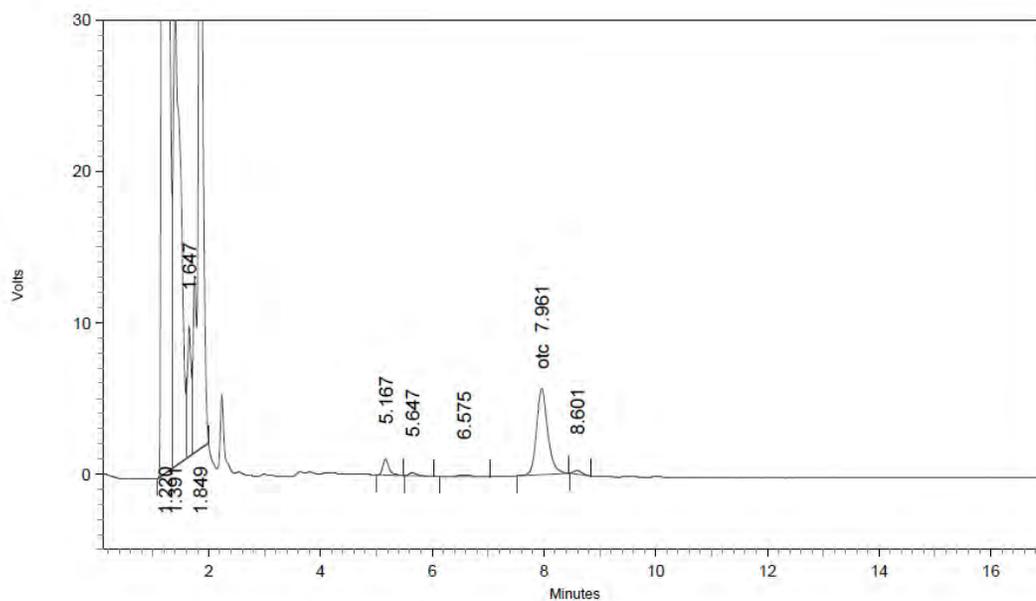


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.961	70813	7889.17



AQ-12 OTC 29-Junio-2016

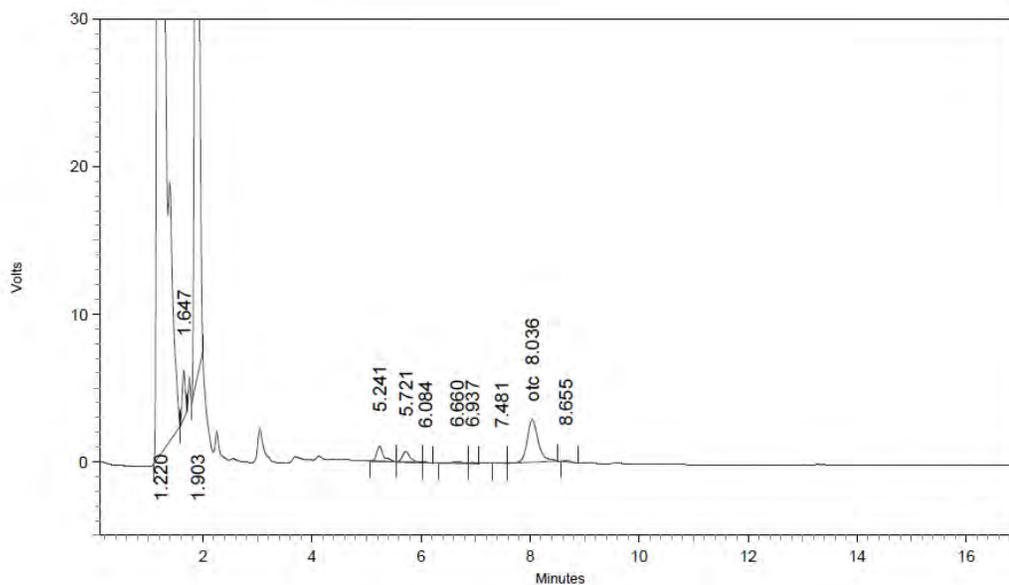


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.961	79358	7891.93



AQ-13 OTC 29-Junio-2016

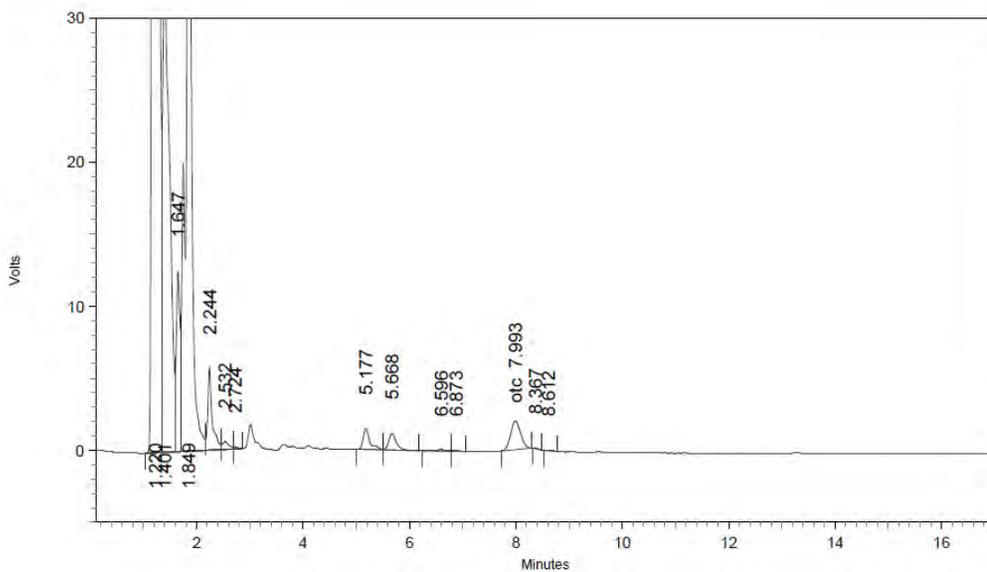


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.036	40287	8008.03



AQ-14 OTC 29-Junio-2016

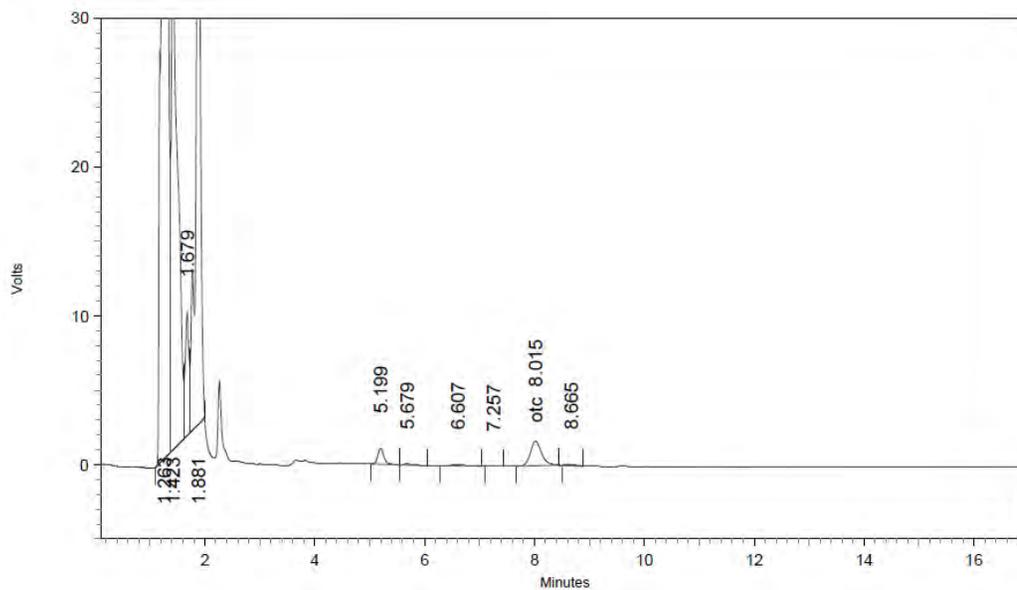


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.993	25976	8223.08



AQ-15 OTC 29-Junio-2016

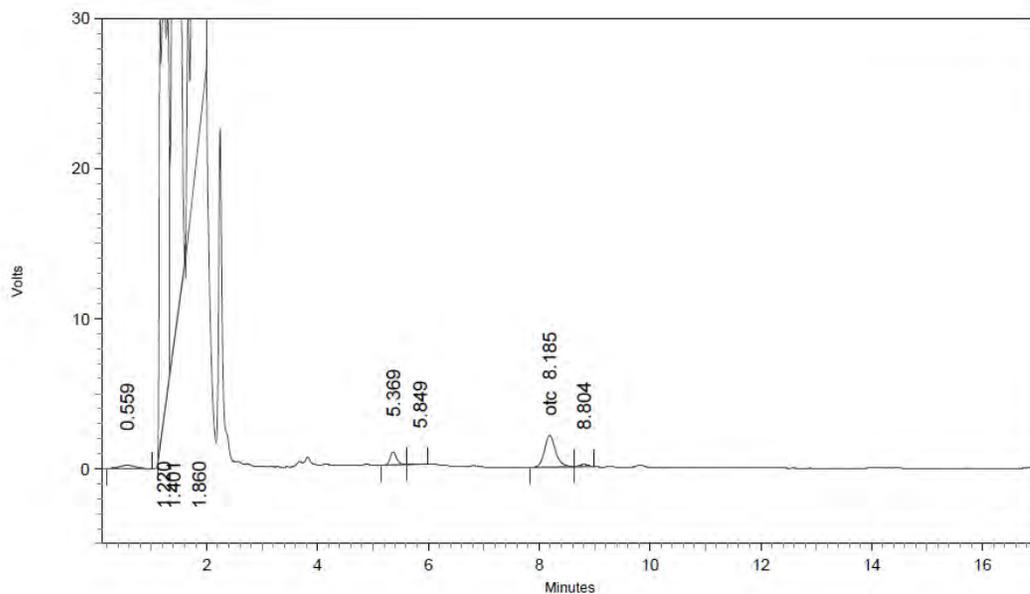


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.015	23382	7666.61



AP-16 OTC 23-Junio-2016

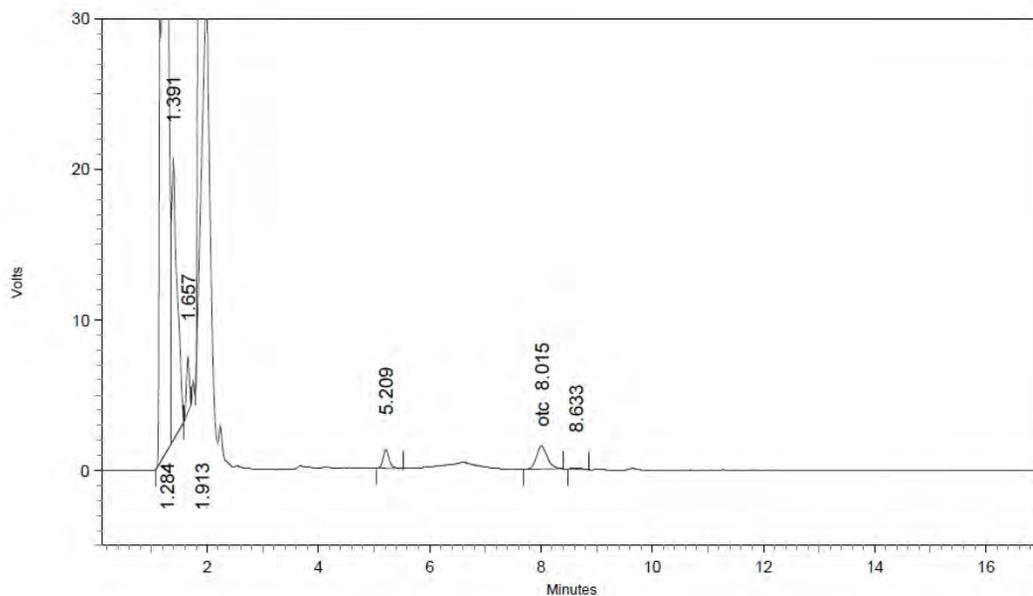


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.185	29900	8345.06



AP-17 OTC 23-Junio-2016

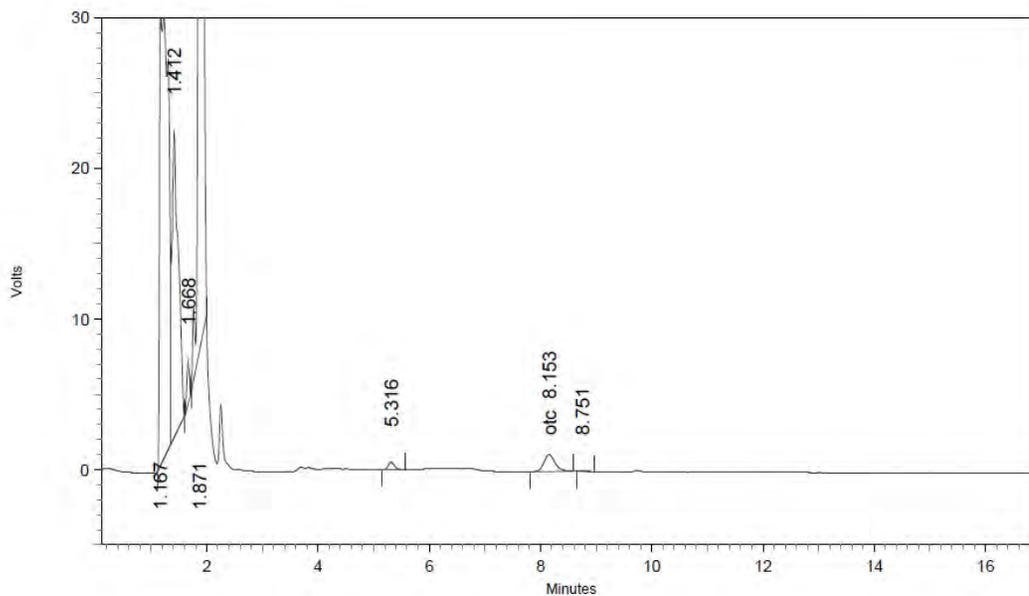


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.015	20941	7982.70



AP-18 OTC 23-Junio-2016

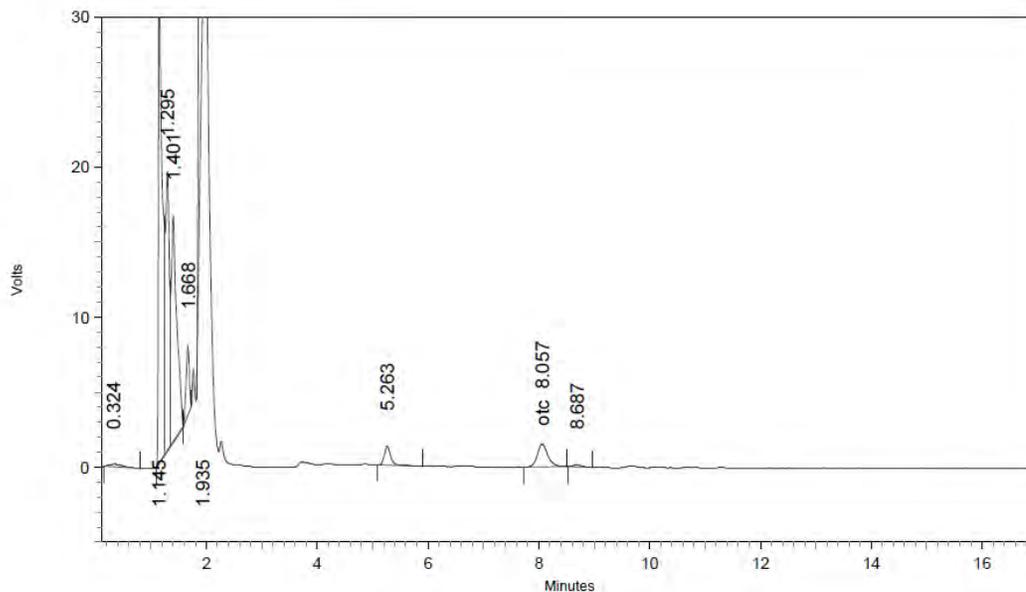


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.153	15668	8107.08



AP-19 OTC 23-Junio-2016

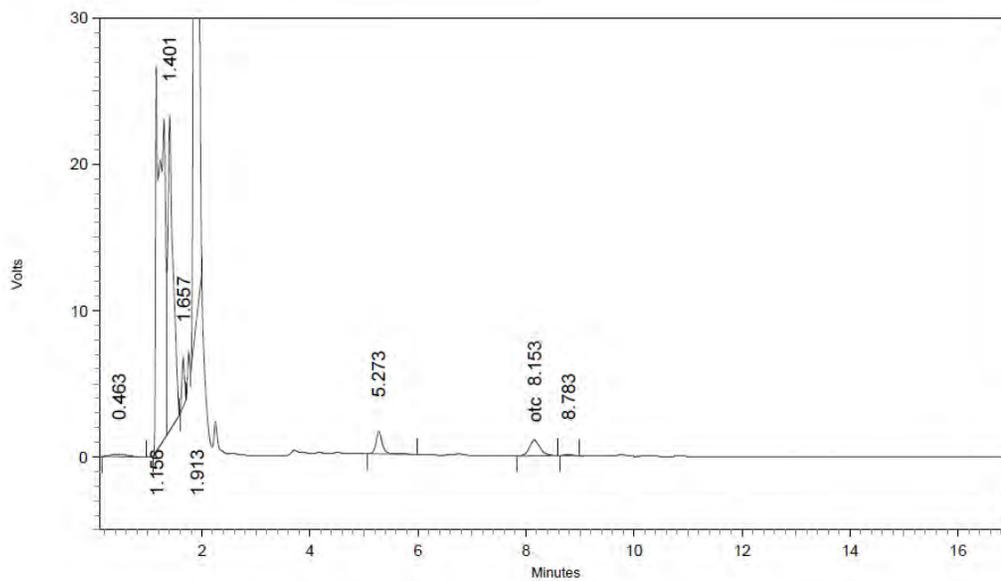


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.057	20094	8672.10



AP-20 OTC 23-Junio-2016

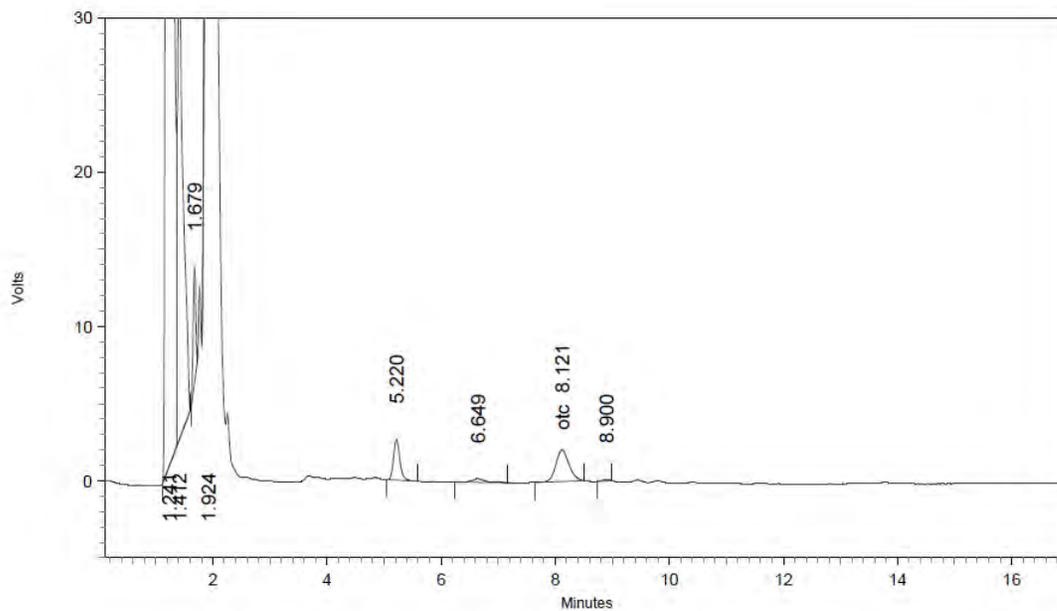


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.153	14577	8225.71



AQ-16 OTC 29-Junio-2016

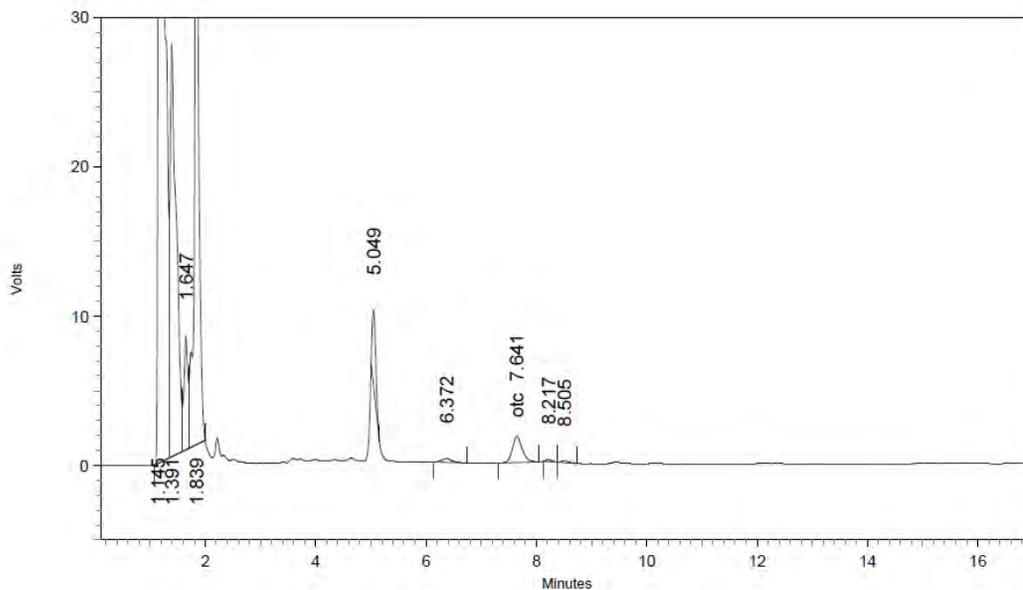


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.121	32691	5923.26



AQ-17 OTC 30-JUNIO-2016

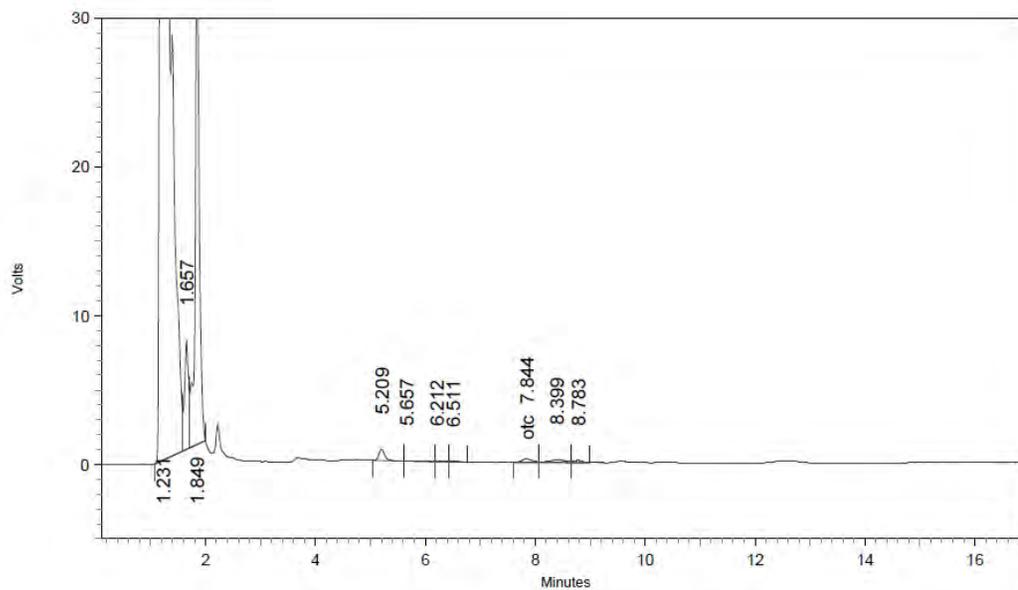


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.641	21773	8669.24



AQ-18 OTC 30-JUNIO-2016

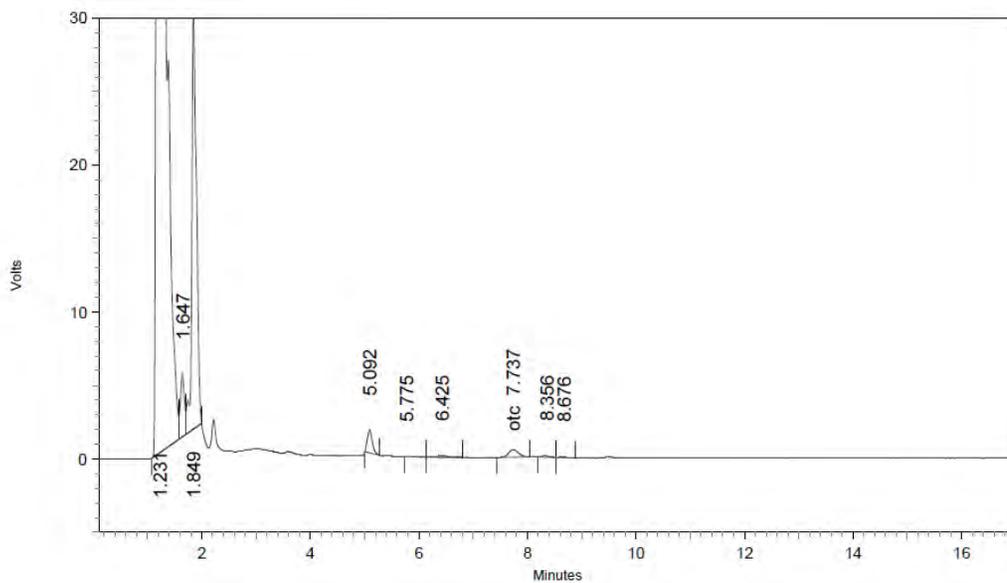


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.844	3088	7995.87



AQ-19 OTC 30-JUNIO-2016

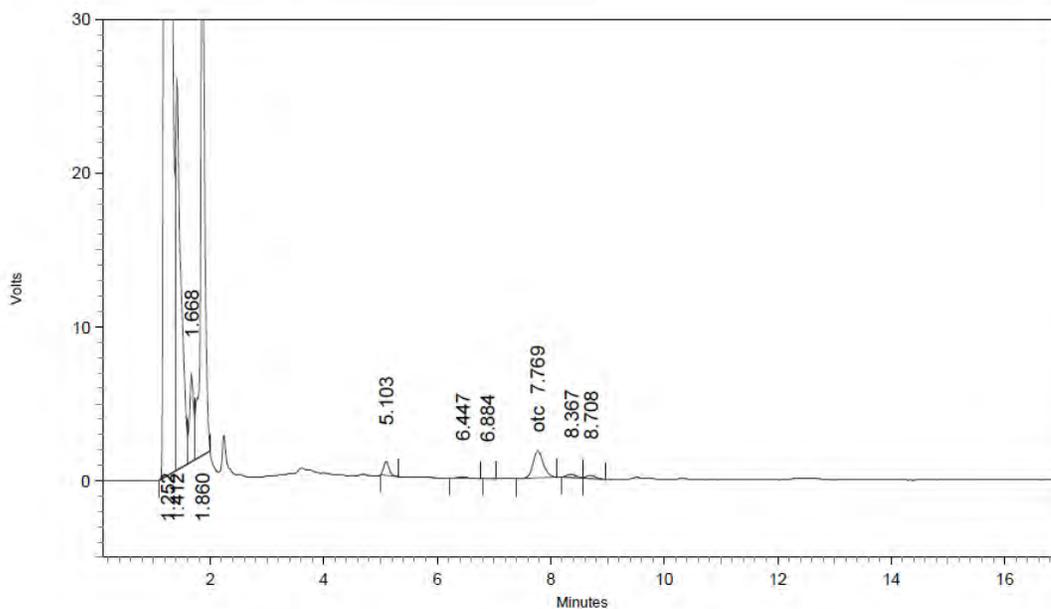


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.737	6449	8791.71



AQ-20 OTC 30-JUNIO-2016



2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.769	21780	8529.07



Anexo 8.13. Resultados de OTC en piel-músculo de Salar para el cálculo de la curva de depleción de Liquamicina en condiciones controladas

Fecha	Nº Mx	Días	área	conc obtenida
 analisis		post- inyección		ng/g
30/06/2016	S-1	29	213.932	1670,6
30/06/2016	S-2	29	155.057	1219,6
30/06/2016	S-3	29	185.158	1471,3
30/06/2016	S-4	29	78.598	623,1
30/06/2016	S-5	29	130.330	1014,8
30/06/2016	T-1	29	112.255	896,3
30/06/2016	T-2	29	227.925	1769,8
05/07/2016	T-3	29	88.931	683,8
05/07/2016	T-4	29	109.876	884,3
05/07/2016	T-5	29	68.520	539,7
05/07/2016	U-1	29	178.789	1423,4
05/07/2016	U-2	29	444.696	3516,3
05/07/2016	U-3	29	218.132	1696,9
06/07/2016	U-4	29	72.580	563,0
06/07/2016	U-5	29	81.313	635,9
16/06/2016	S-6	38	197.905	1527,5
16/06/2016	S-7	38	131.608	1011,1
16/06/2016	S-8	38	70.290	554,8
16/06/2016	S-9	38	42.934	334,6
16/06/2016	S-10	38	63.231	498,8
16/06/2016	T-6	38	117.721	914,7
16/06/2016	T-7	38	102.828	800,2
16/06/2016	T-8	38	106.445	854,9
16/06/2016	T-9	38	67.754	533,6
16/06/2016	T-10	38	40.019	302,9
16/06/2016	U-6	38	226.118	1765,9
16/06/2016	U-7	38	70.883	561,7
16/06/2016	U-8	38	90.913	721,1
16/06/2016	U-9	38	5.148	25,0

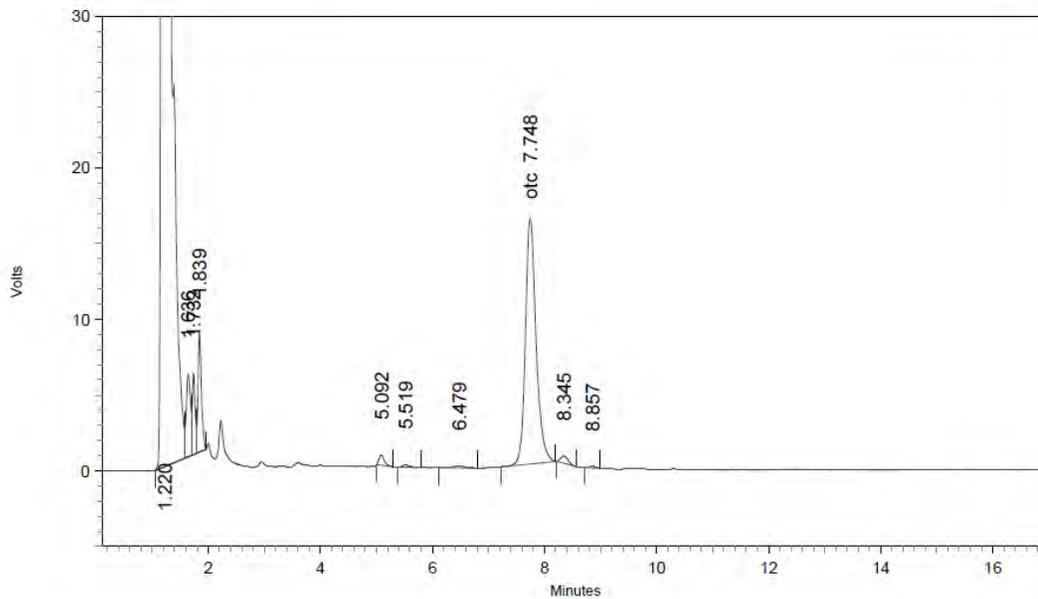


16/06/2016	U-10	38	123.619	975,7
30/06/2016	S-11	44	40.656	312,5
30/06/2016	S-12	44	6.604	25,0
30/06/2016	S-13	44	39.902	310,2
30/06/2016	S-14	44	90.927	727,0
30/06/2016	S-15	44	100.059	790,8
05/07/2016	T-11	44	121.949	935,0
05/07/2016	T-12	44	13.630	105,8
05/07/2016	T-13	44	30.861	235,2
05/07/2016	T-14	44	103.140	821,7
05/07/2016	T-15	44	80.774	618,5
12/07/2016	U-11	44	74.550	593,2
12/07/2016	U-12	44	58.270	452,4
12/07/2016	U-13	44	41.912	328,5
12/07/2016	U-14	44	127.720	1016,1
12/07/2016	U-15	44	79.382	638,1
30/06/2016	S-16	56	21.994	170,5
30/06/2016	S-17	56	18.783	149,0
30/06/2016	S-18	56	62.841	478,8
30/06/2016	S-19	56	21.677	172,1
30/06/2016	S-20	56	77.429	600,8
05/07/2016	T-16	56	40.512	315,6
05/07/2016	T-17	56	42.452	325,1
05/07/2016	T-18	56	25.584	196,9
05/07/2016	T-19	56	38.806	298,1
05/07/2016	T-20	56	83.154	636,8
05/07/2016	U-16	56	69.719	550,2
05/07/2016	U-17	56	118.613	918,1
05/07/2016	U-18	56	79.209	631,7
05/07/2016	U-19	56	50.885	394,0
05/07/2016	U-20	56	142.772	1088,8



Anexo 8.14. Cromatogramas de curva de depleci3n Liquamicina Salar, condiciones controladas

S-1 OTC 30-JUNIO-2016

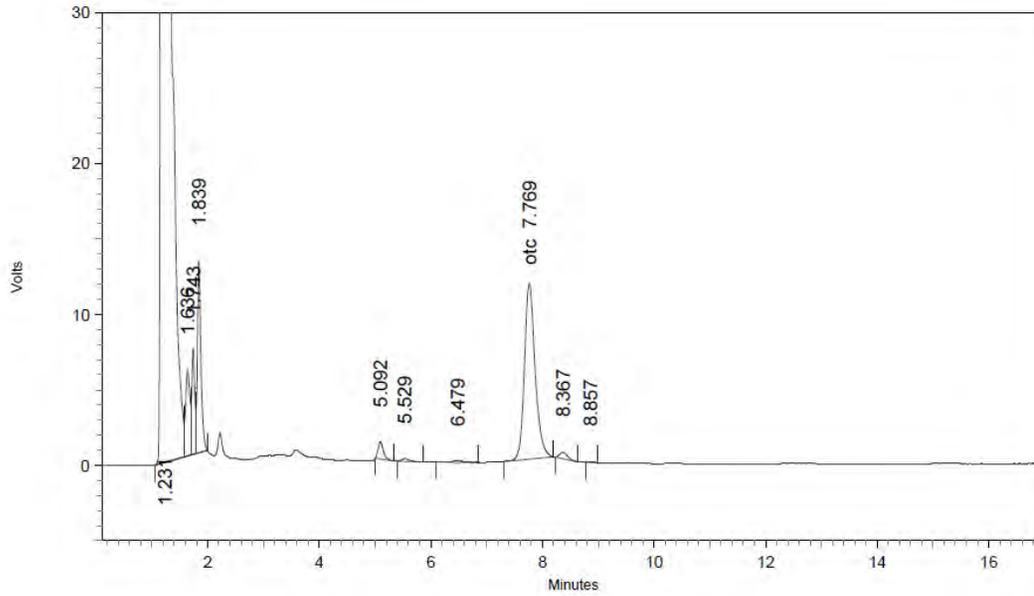


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.748	213932	8367.89



S-2 OTC 30-JUNIO-2016

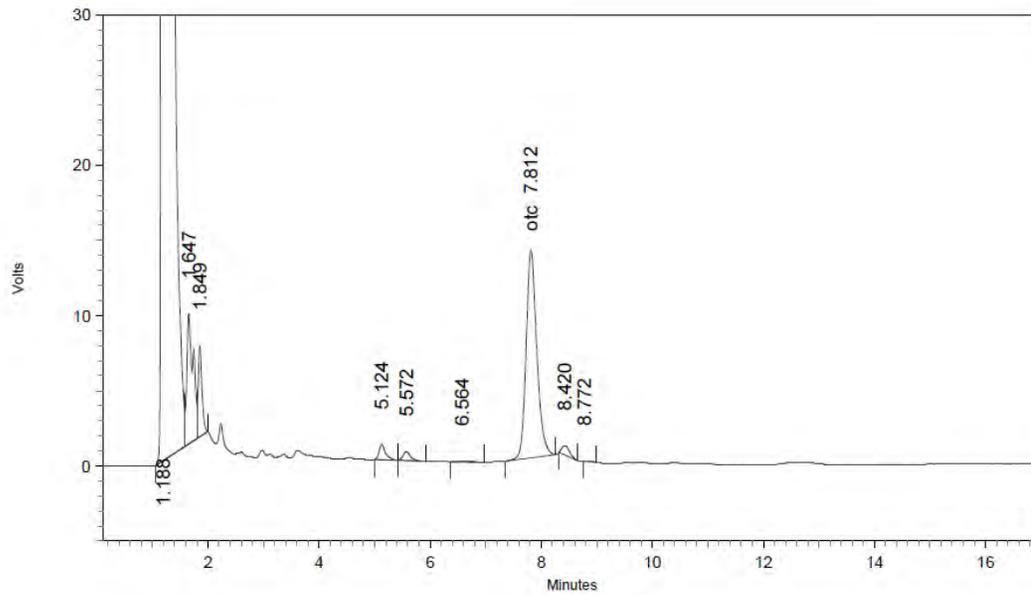


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.769	155057	8124.99



S-3 OTC 30-JUNIO-2016

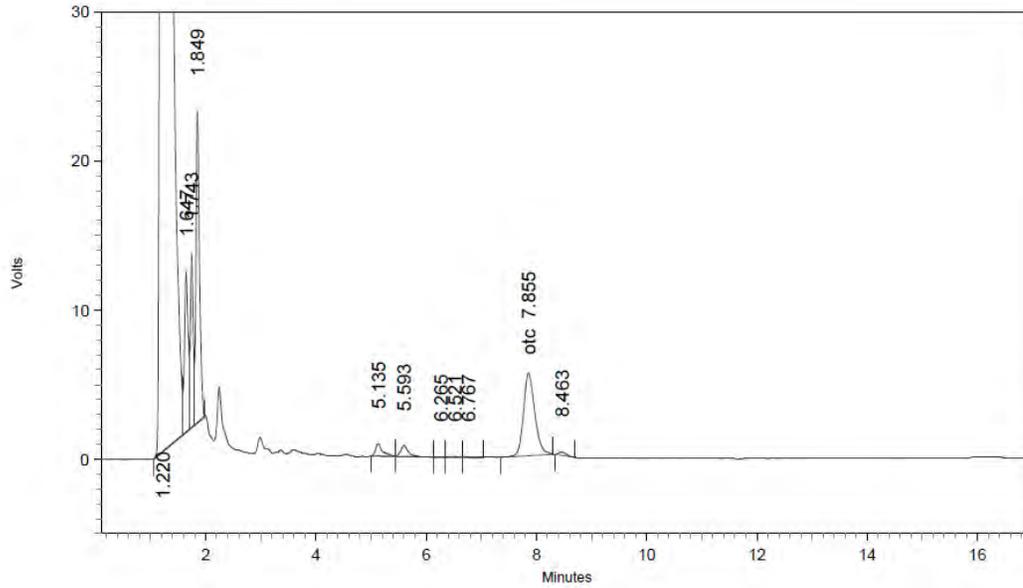


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.812	185158	8105.91



S-4 OTC 30-JUNIO-2016

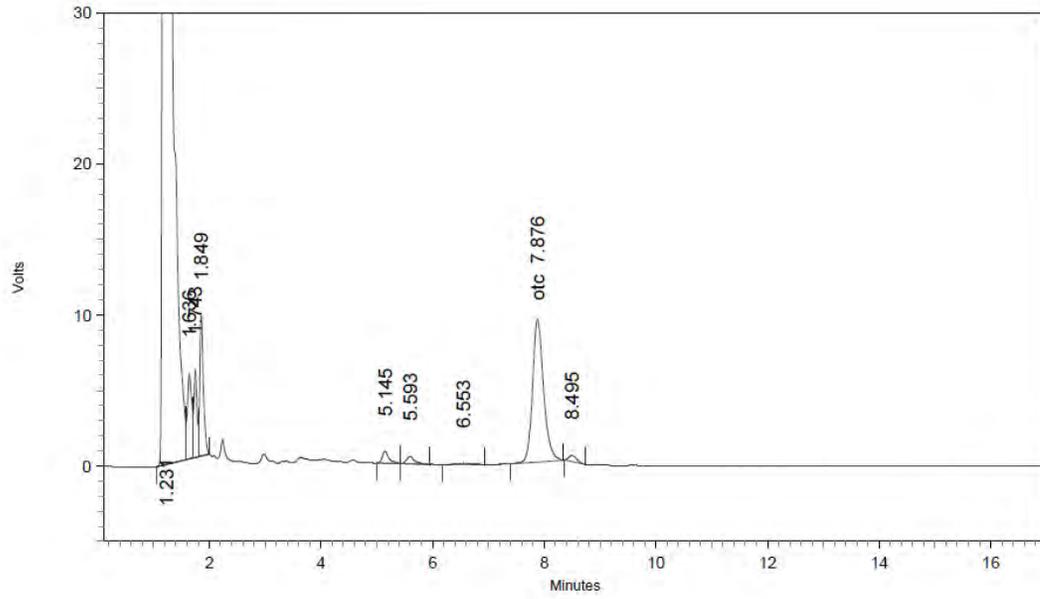


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.855	78598	6982.15



S-5 OTC 30-JUNIO-2016

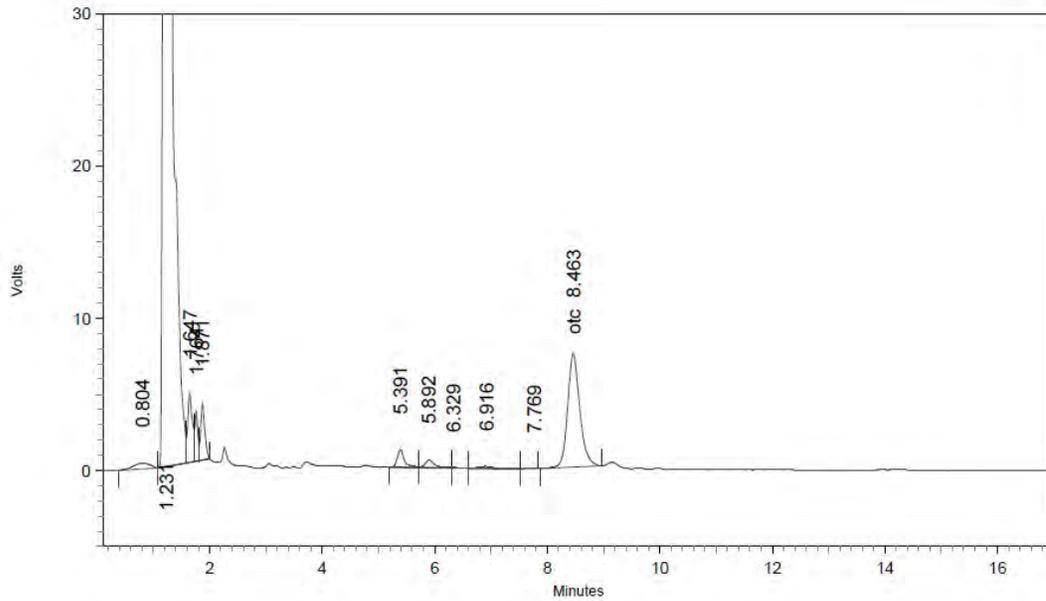


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.876	130330	7801.30



T-1 OTC 30-JUNIO-2016

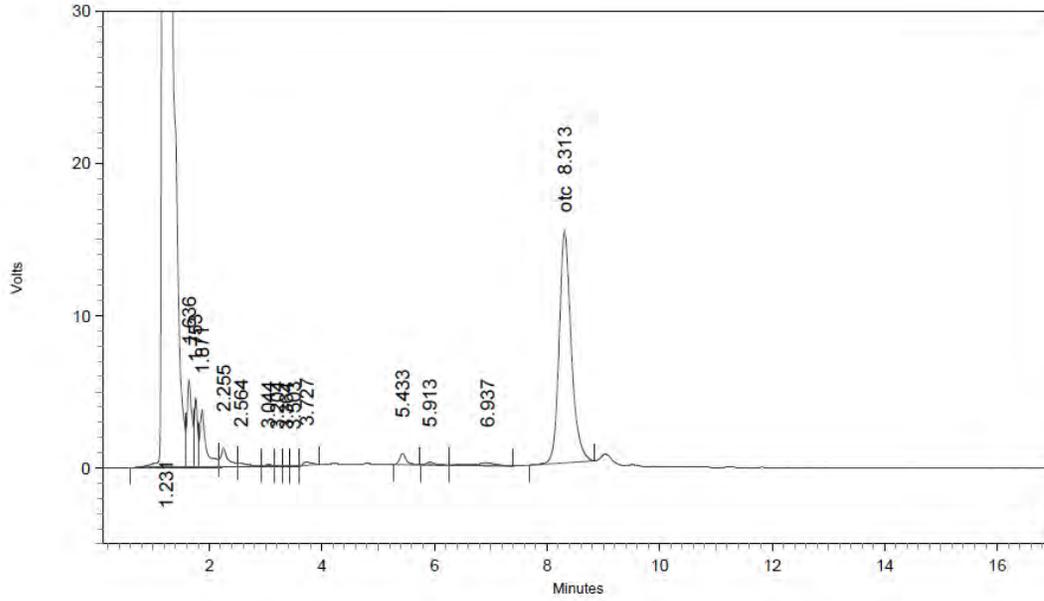


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.463	112255	7661.97



T-2 OTC 30-JUNIO-2016

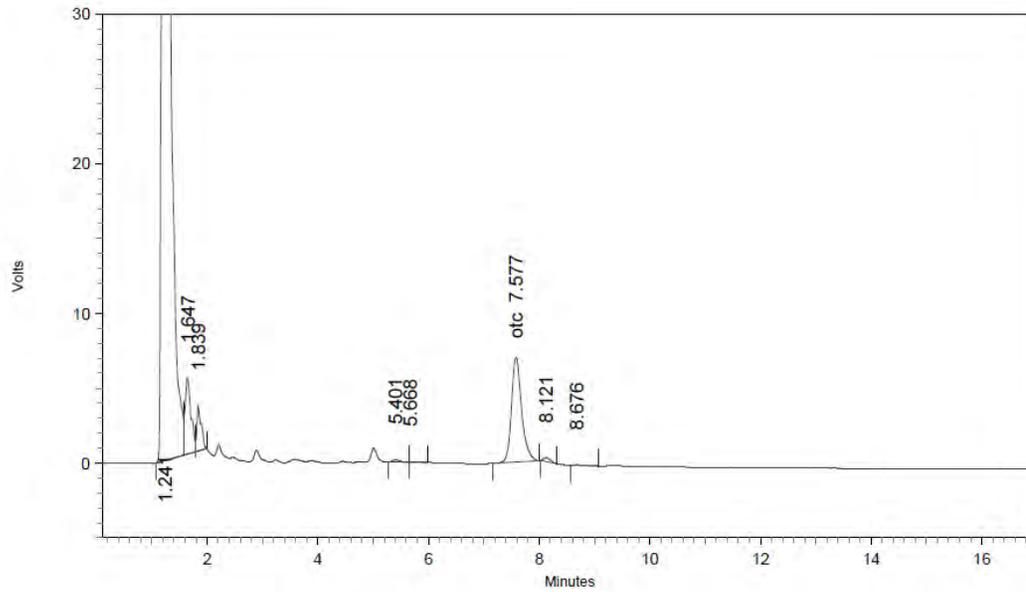


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.313	227925	7565.02



T-3 OTC 5-JULIO-2016

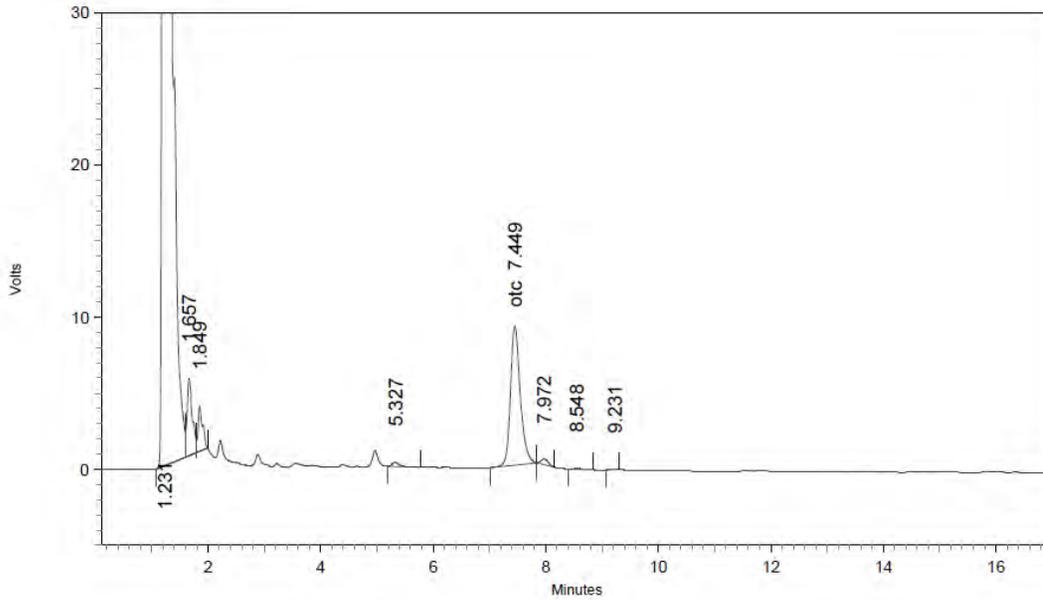


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.577	88931	8461.53



T-4 OTC 5-JULIO-2016

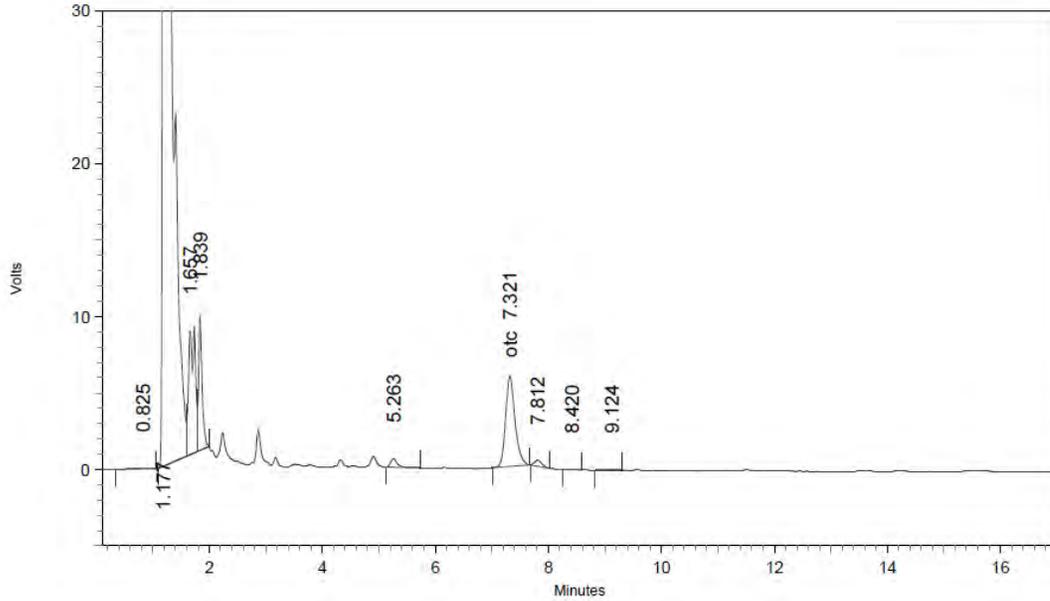


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.449	109876	9186.75



T-5 OTC 5-JULIO-2016

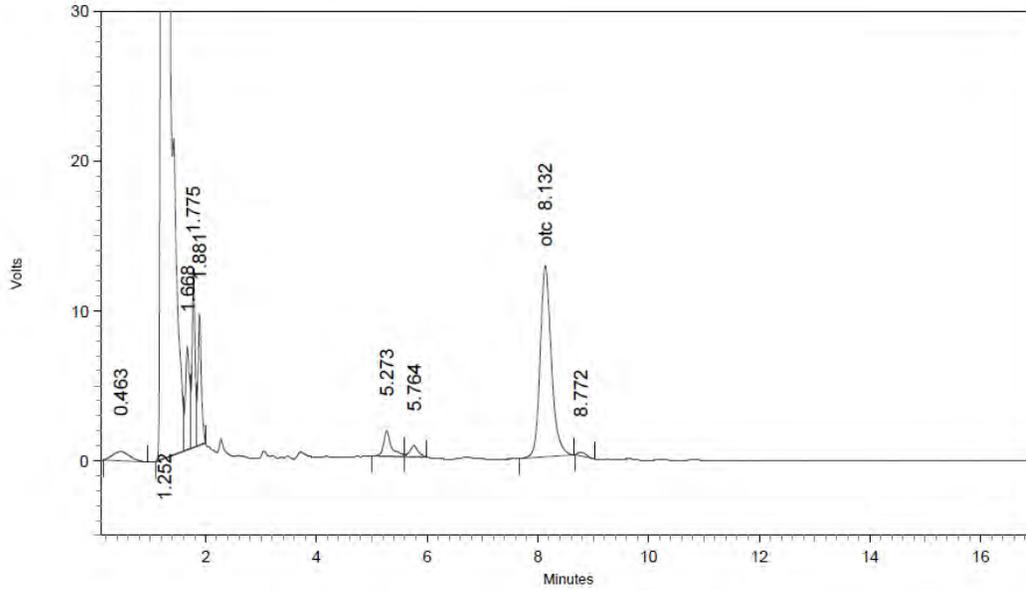


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.321	68520	9197.64



U-1 OTC 5-JULIO-2016

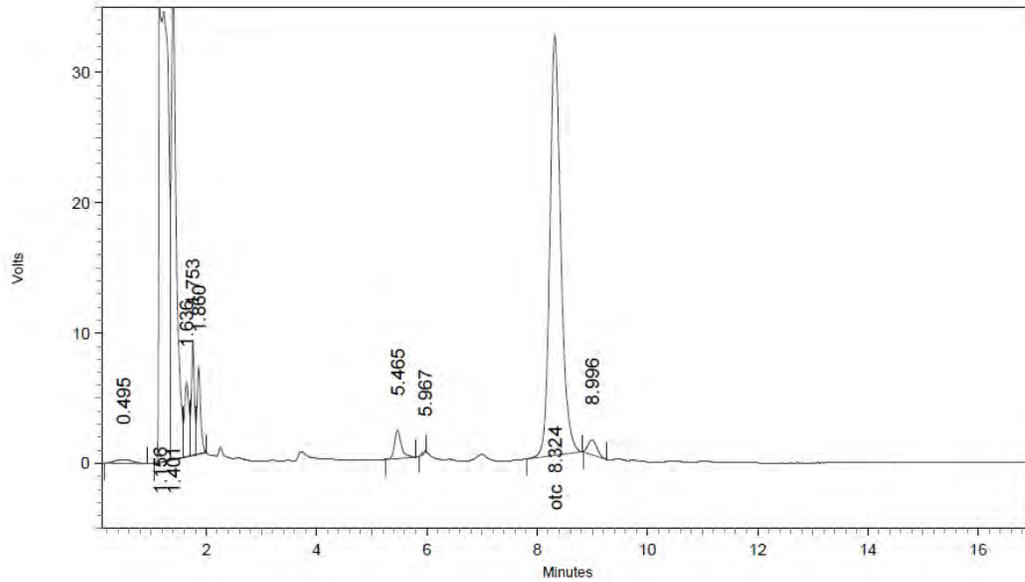


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.132	178789	8125.07



U-2 OTC 5-JULIO-2016

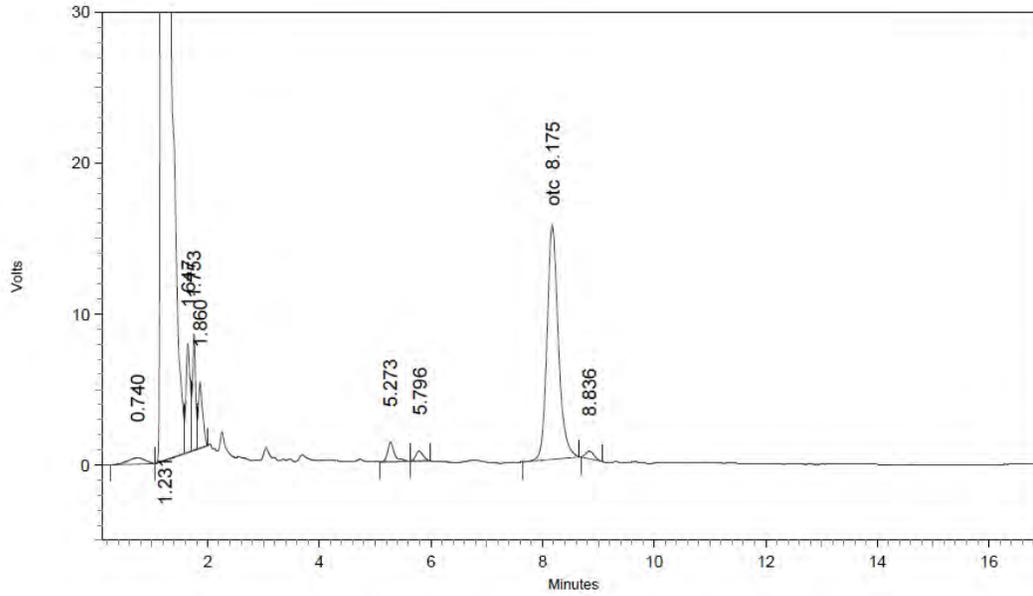


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.324	444696	8751.44



U-3 OTC 5-JULIO-2016

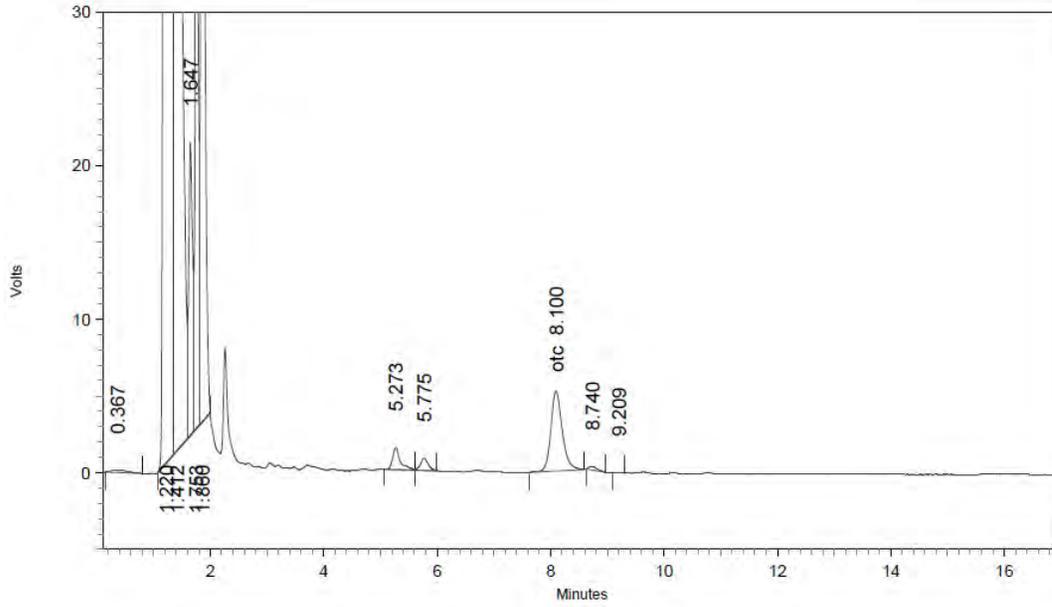


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.175	218132	8195.09



U-4 OTC 6-JULIO-2016

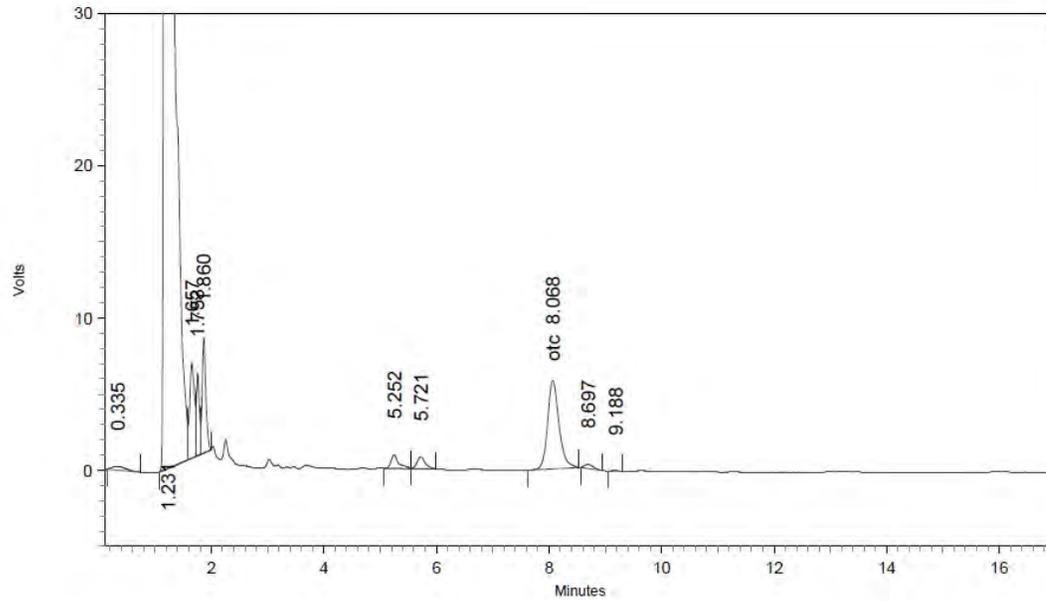


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.100	72580	8063.98



U-5 OTC 6-JULIO-2016

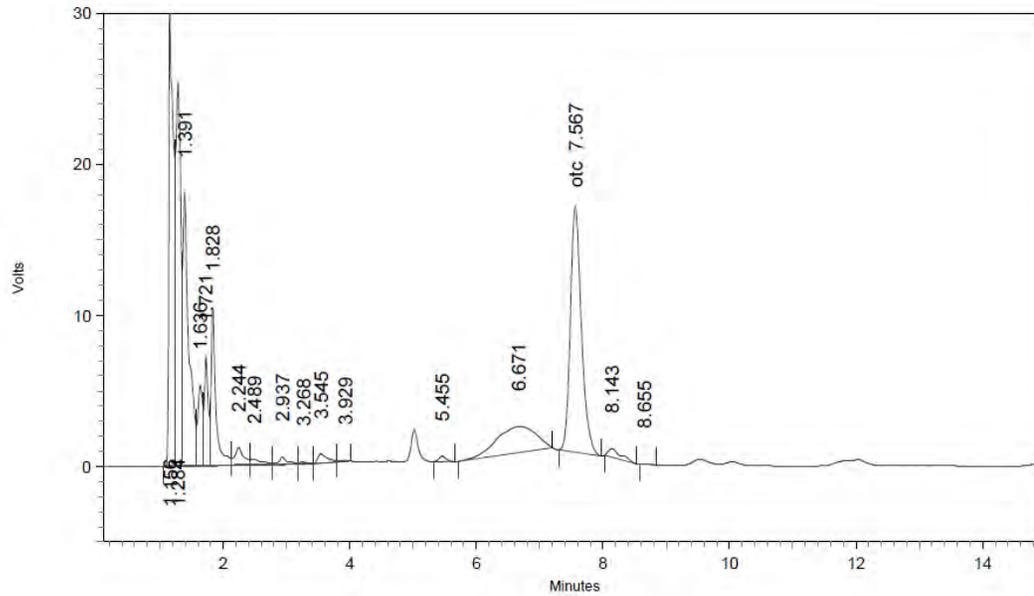


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.068	81313	7950.01



S-6 OTC 16 junio-2016

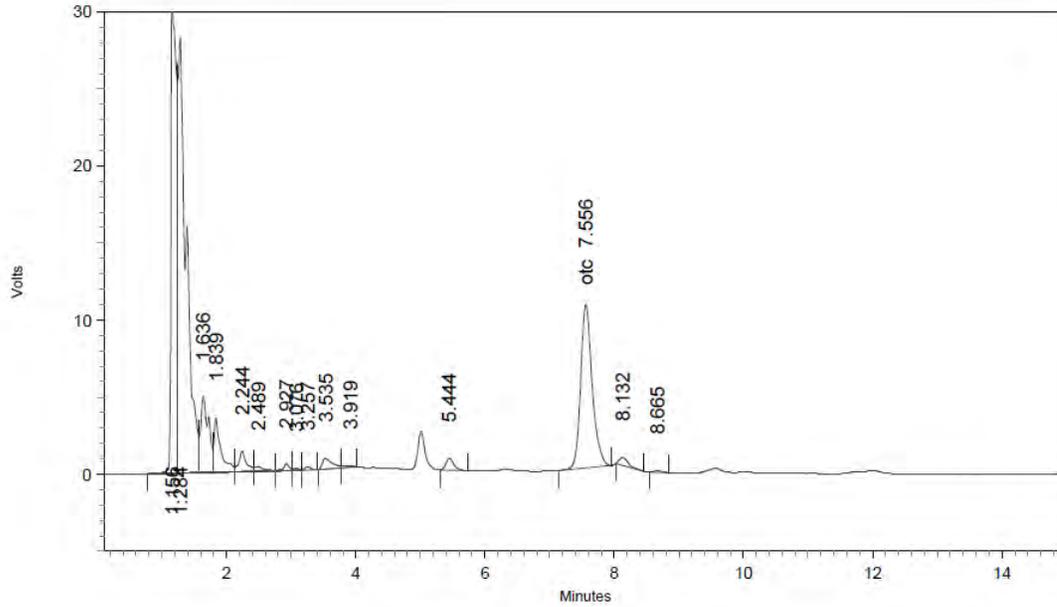


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.567	197905	9025.03



S-7 OTC 16 junio-2016

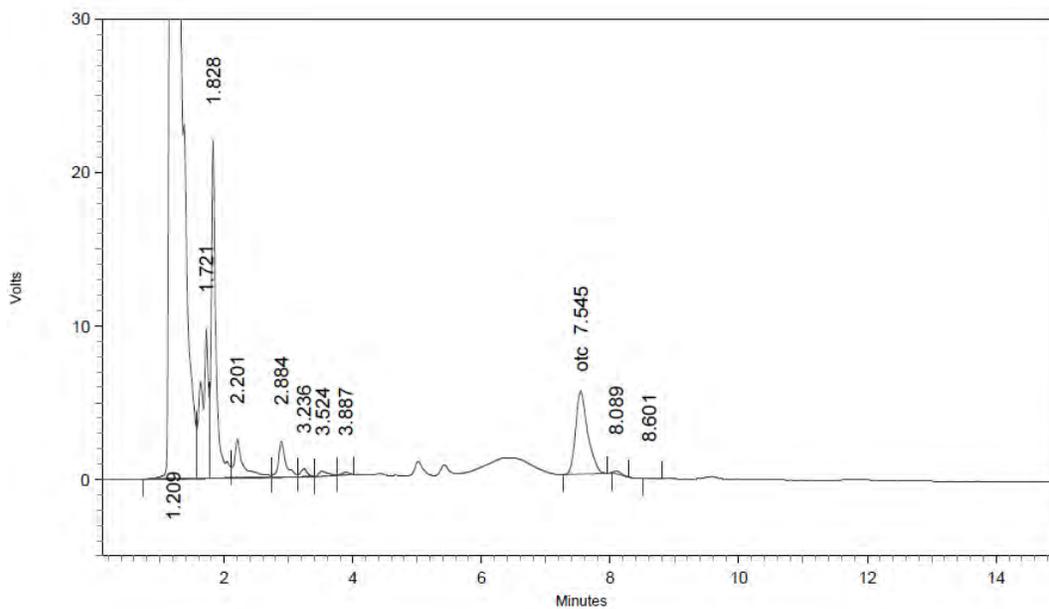


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.556	131608	8686.39



S-8 OTC 16 junio-2016

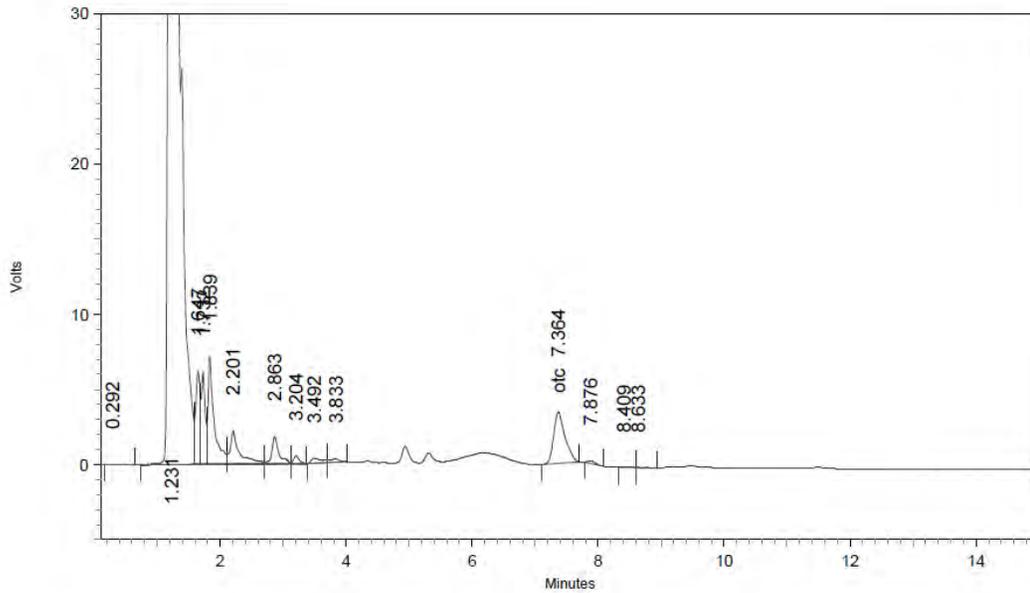


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.545	70290	7724.65



S-9 OTC 16 junio-2016

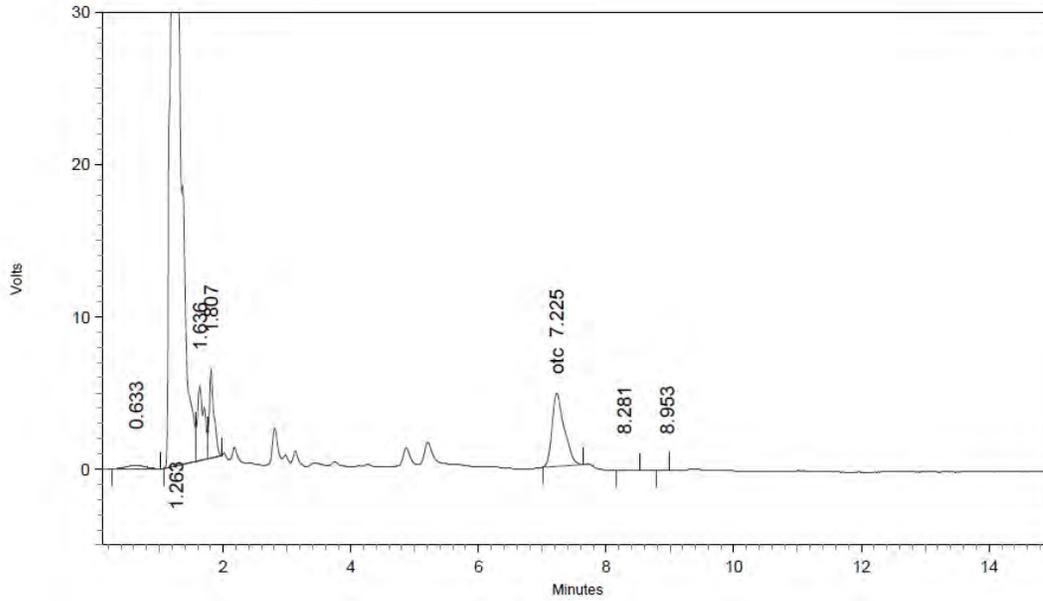


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.364	42934	7879.03



S-10 OTC 16 junio-2016

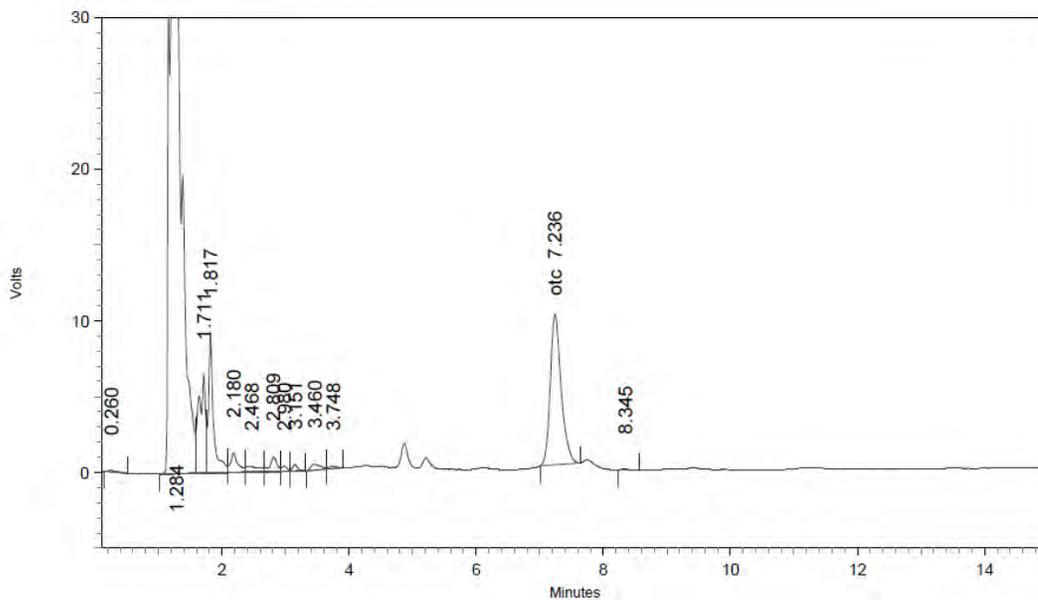


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.225	63231	7189.17



T-6 OTC 16 junio-2016

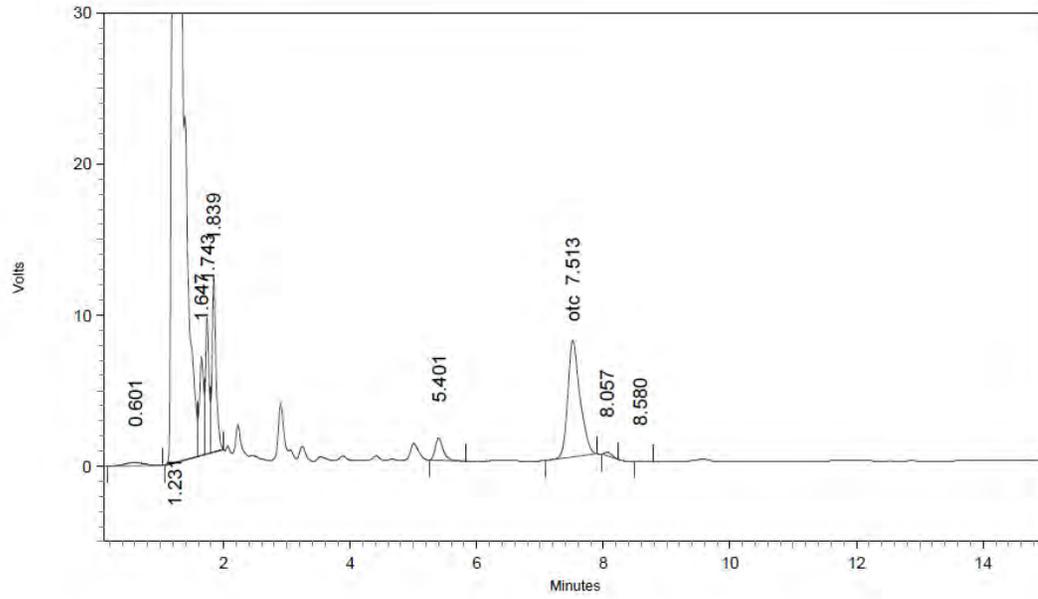


2: 355 mm, 8 mm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.236	117721	8792.38



T-7 OTC 16 junio-2016

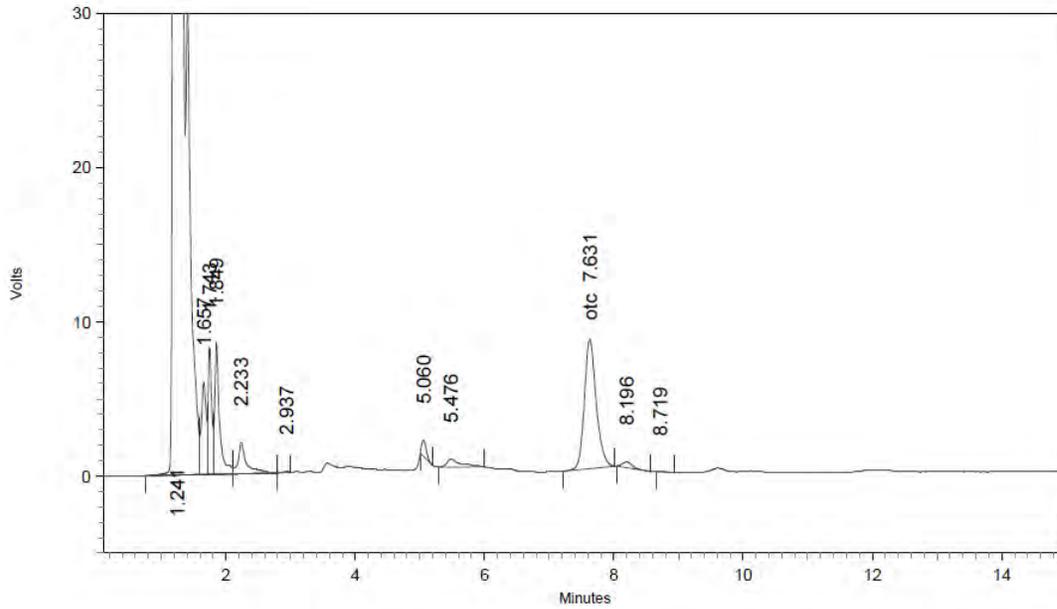


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.513	102828	7440.86



T-8 OTC 16 junio-2016

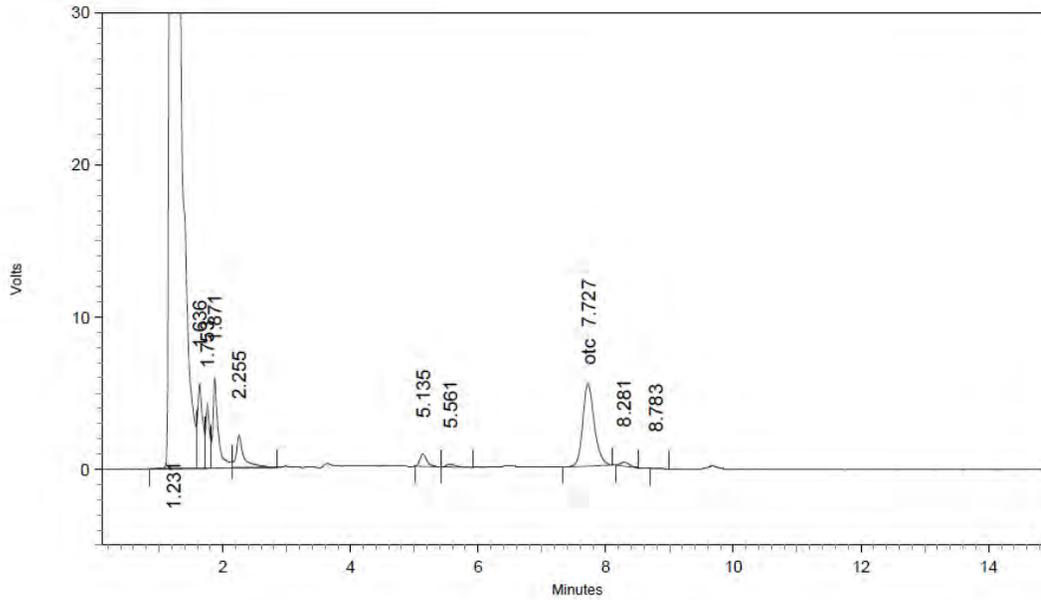


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.631	106445	8542.68



T-9 OTC 16 junio-2016

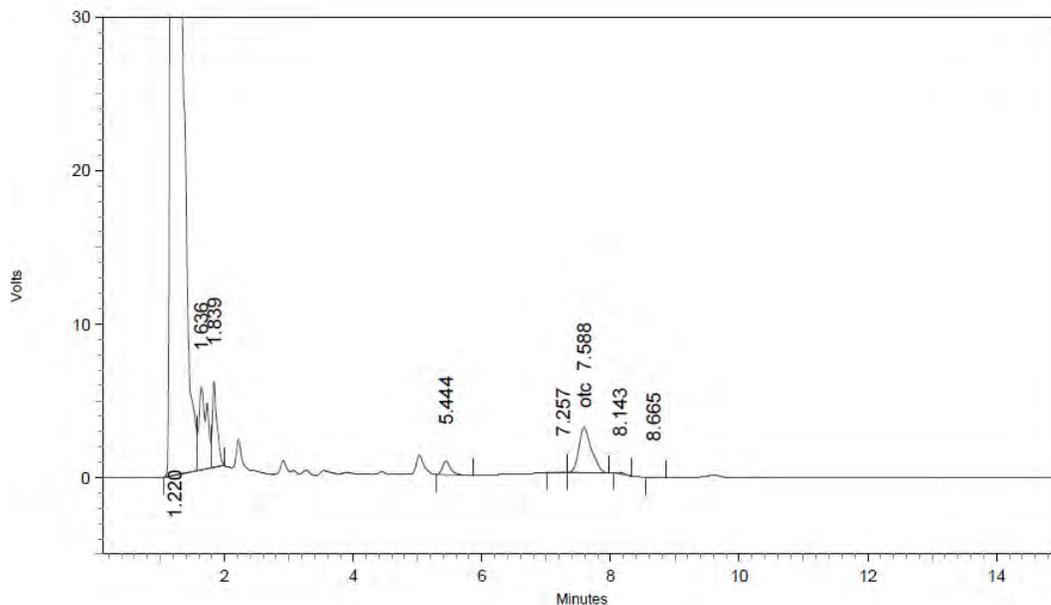


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.727	67754	8918.22



T-10 OTC 16 junio-2016

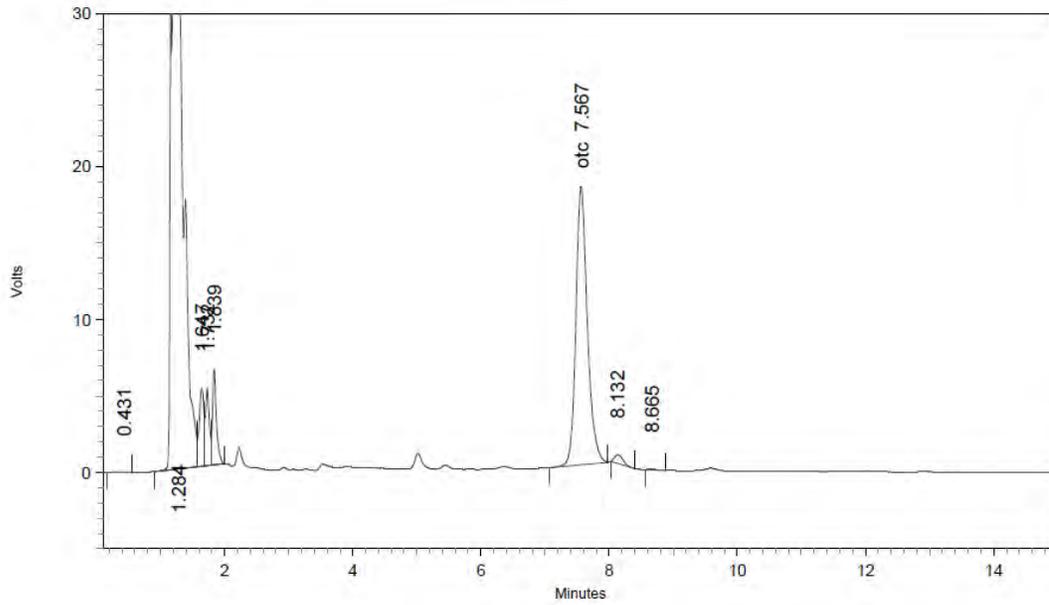


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.588	40019	6947.73



U-6 OTC 16 junio-2016

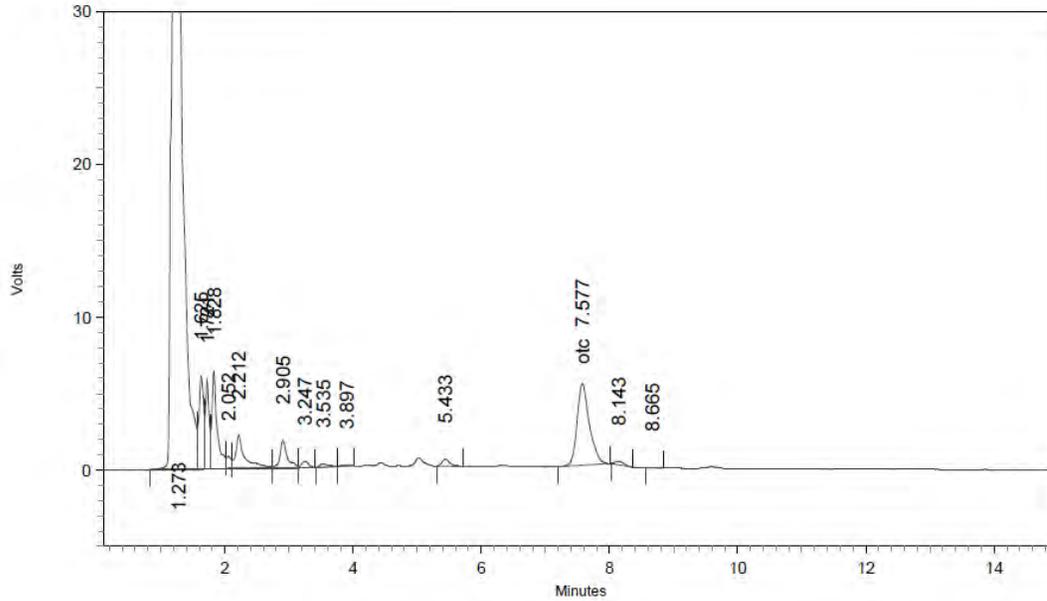


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.567	226118	8778.44



U-7 OTC 16 junio-2016

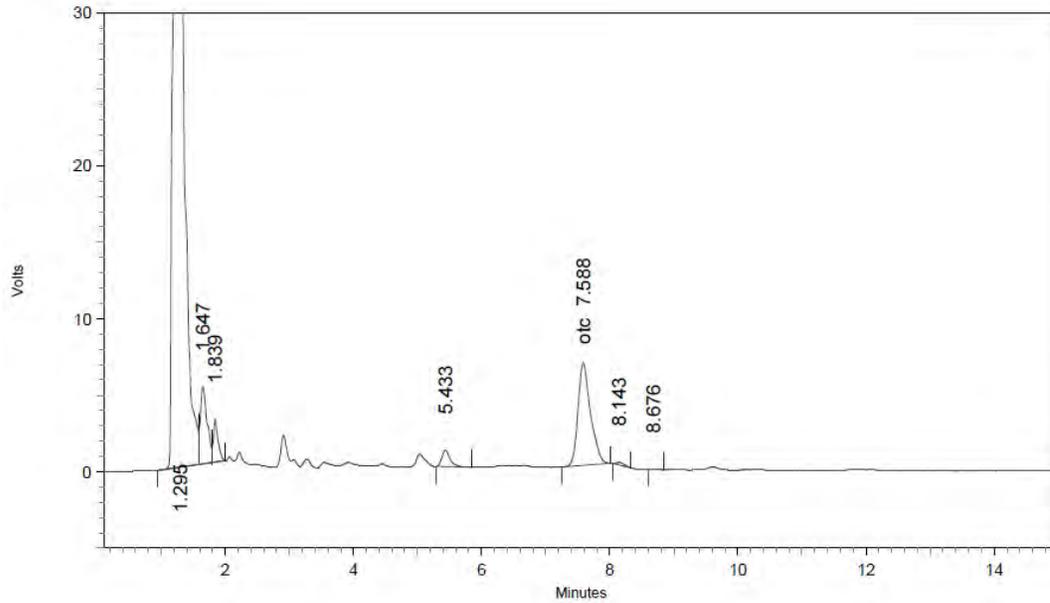


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.577	70883	7719.48



U-8 OTC 16 junio-2016

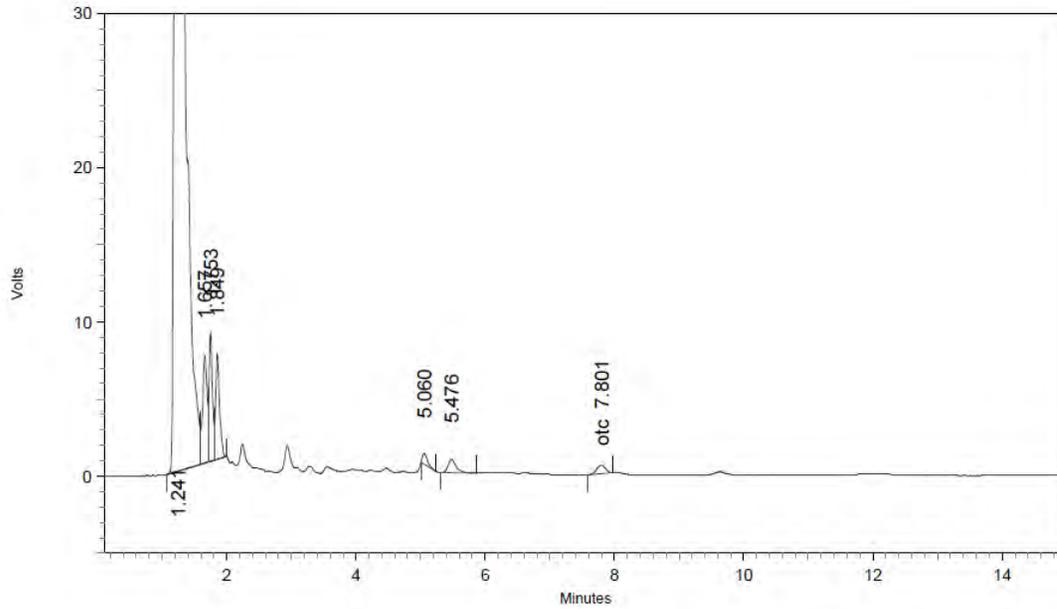


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.588	90913	7315.82



U-9 OTC 16 junio-2016

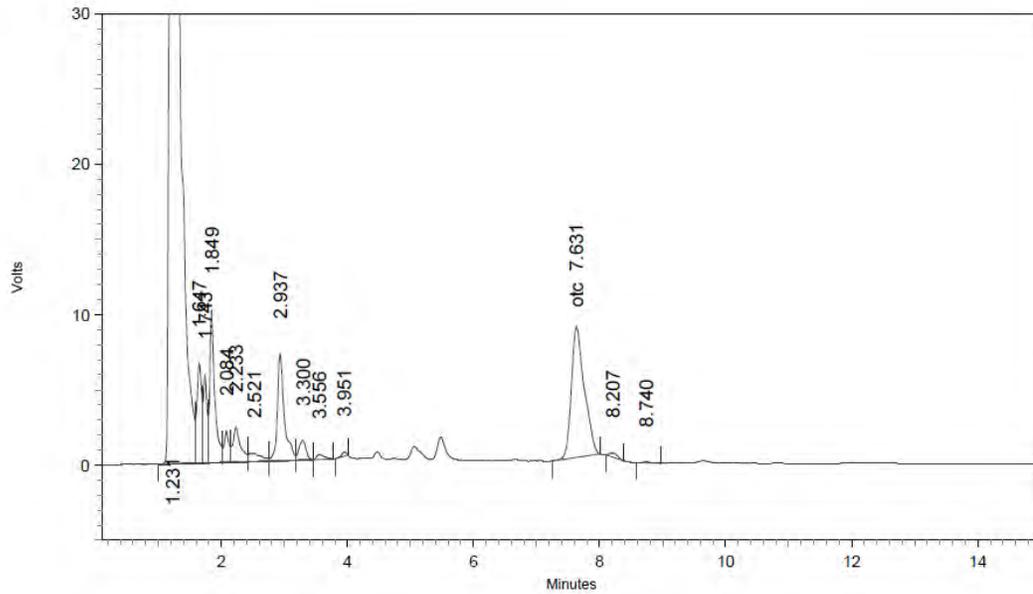


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.801	5148	14594.67



U-10 OTC 16 junio-2016

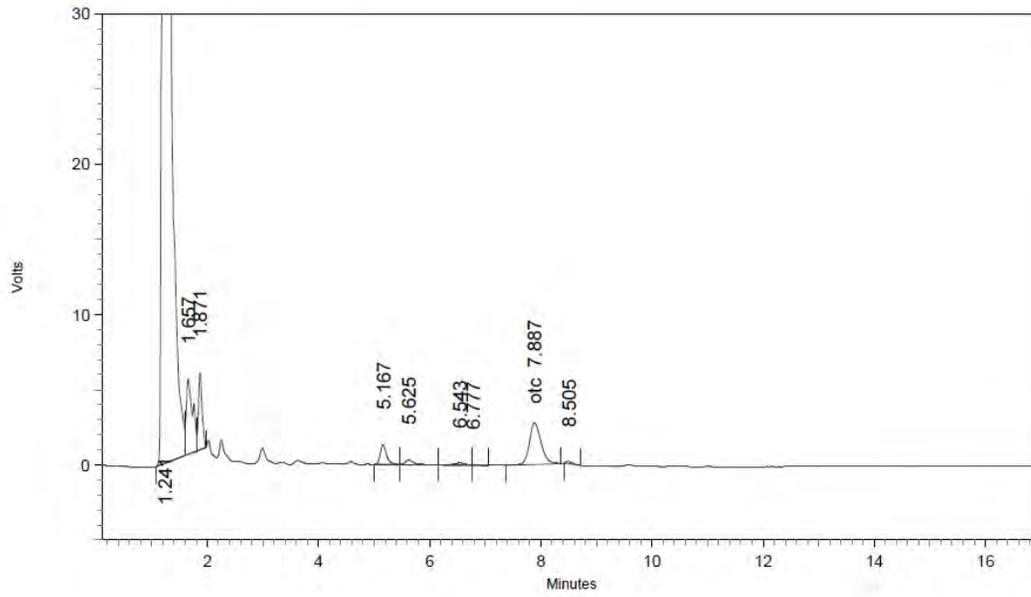


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.631	123619	6783.83



S-11 OTC 30-JUNIO-2016

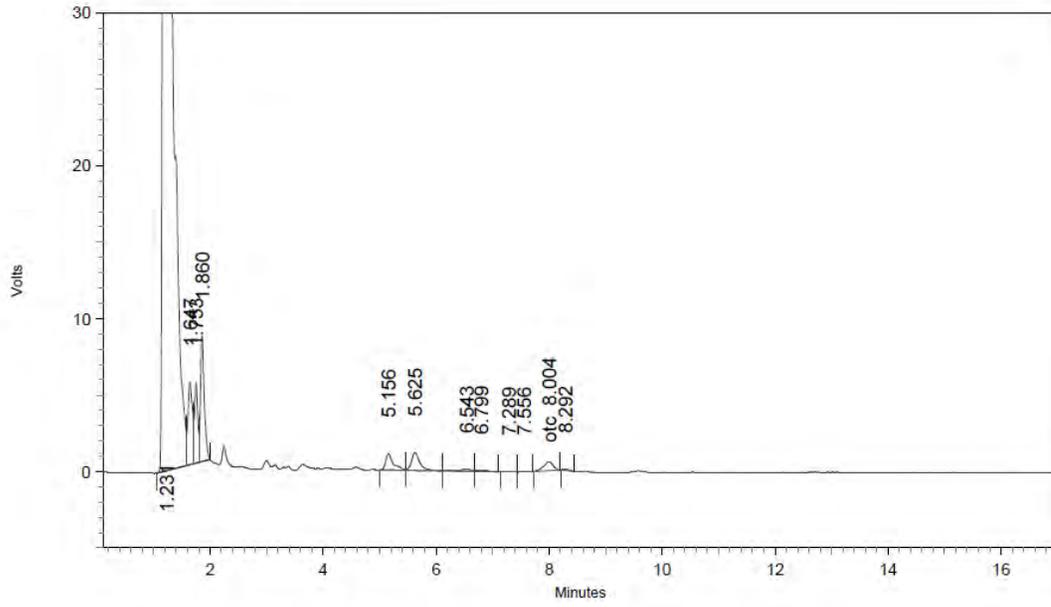


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.887	40656	6661.73



S-12 OTC 30-JUNIO-2016

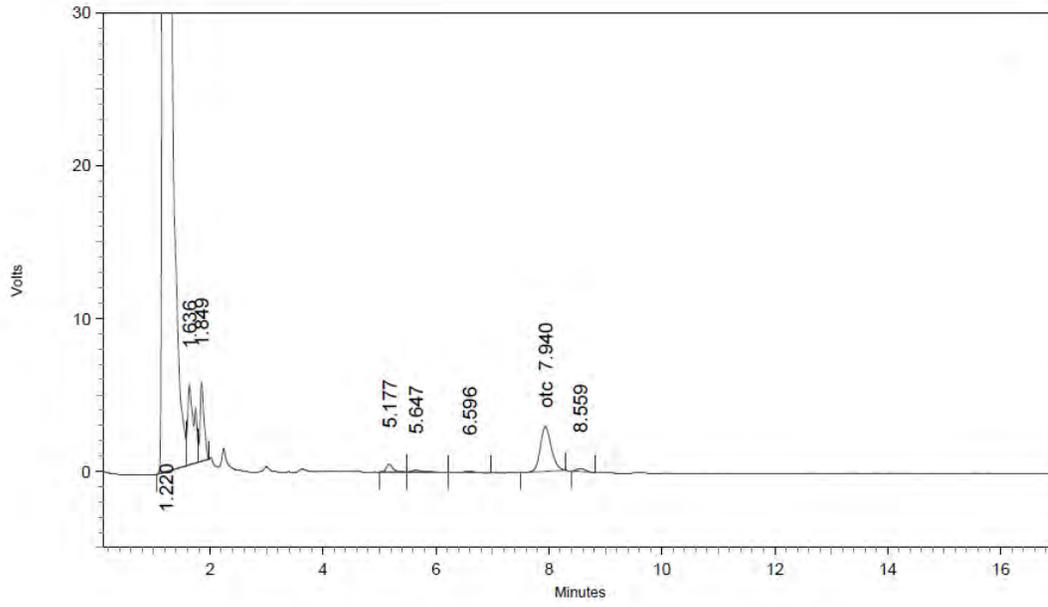


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.004	6604	10361.64



S-13 OTC 30-JUNIO-2016

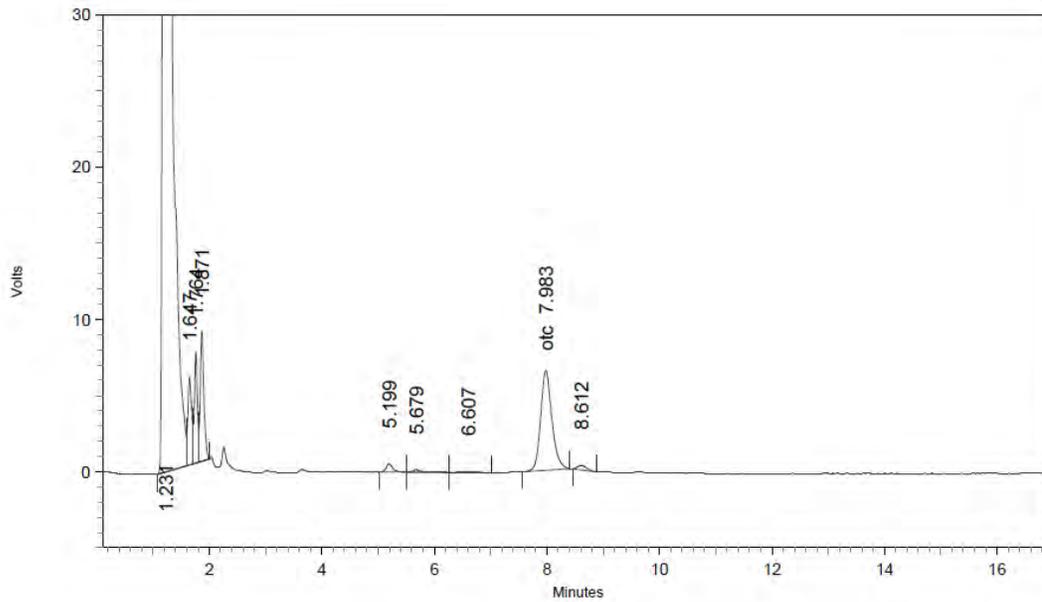


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.940	39902	7683.14



S-14 OTC 30-JUNIO-2016

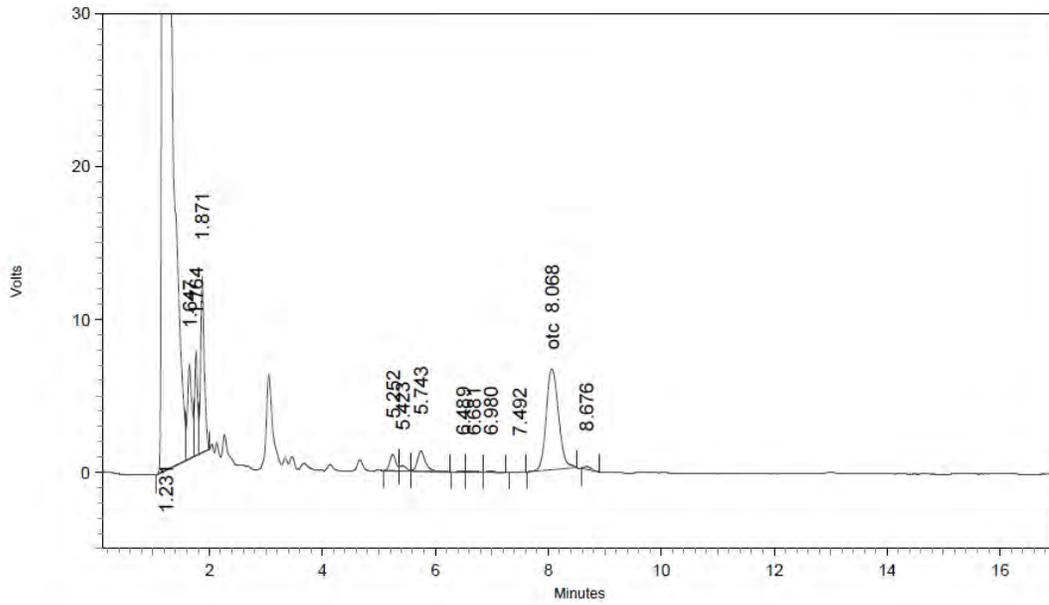


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.983	90927	7766.98



S-15 OTC 30-JUNIO-2016

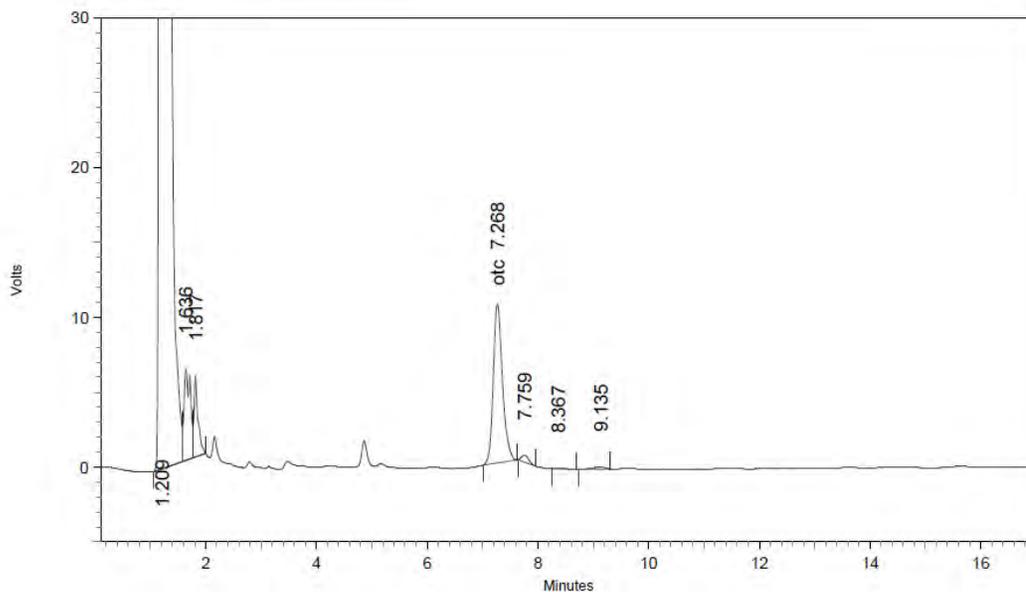


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.068	100059	6524.77



T-11 OTC 5-JULIO-2016

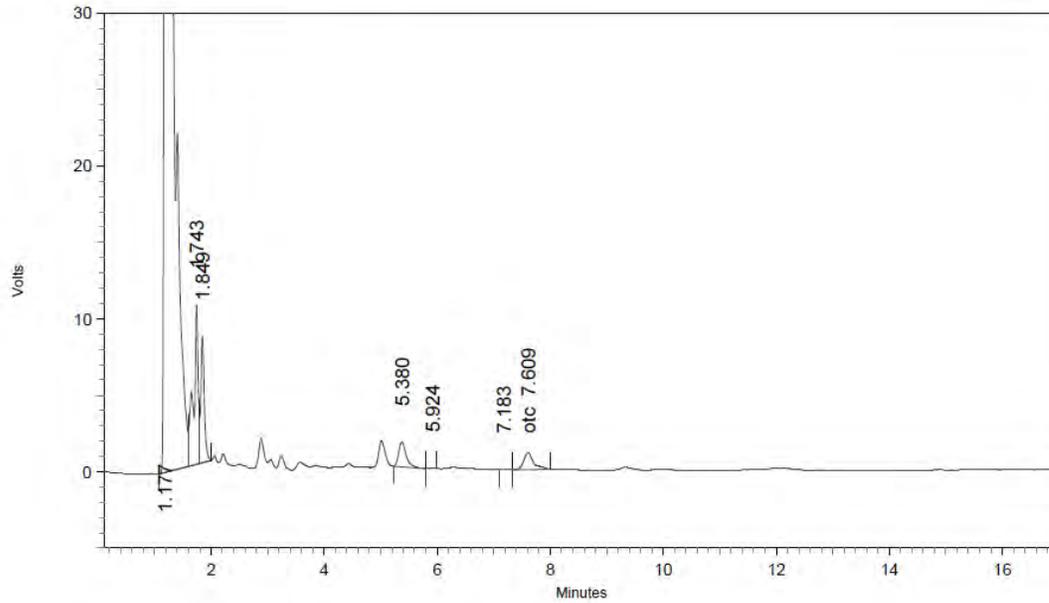


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.268	121949	9225.84



T-12 OTC 5-JULIO-2016

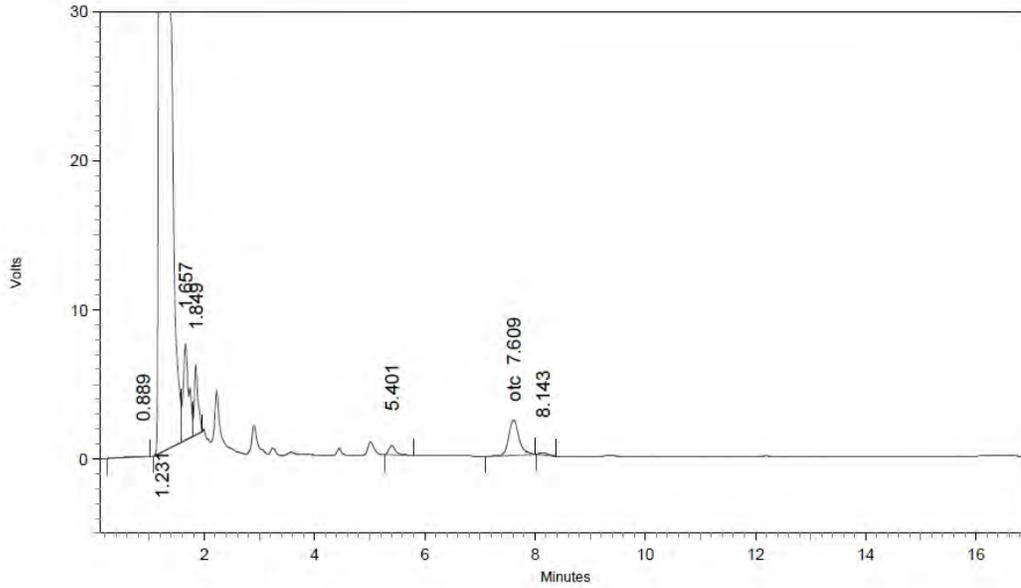


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.609	13630	10951.67



T-13 OTC 5-JULIO-2016

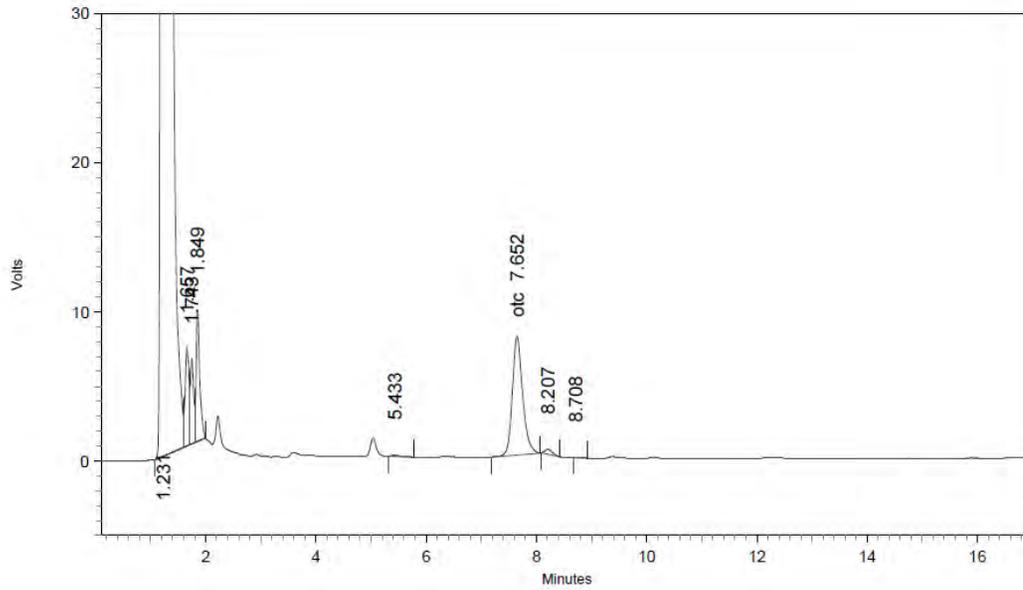


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.609	30861	8336.89



T-14 OTC 5-JULIO-2016

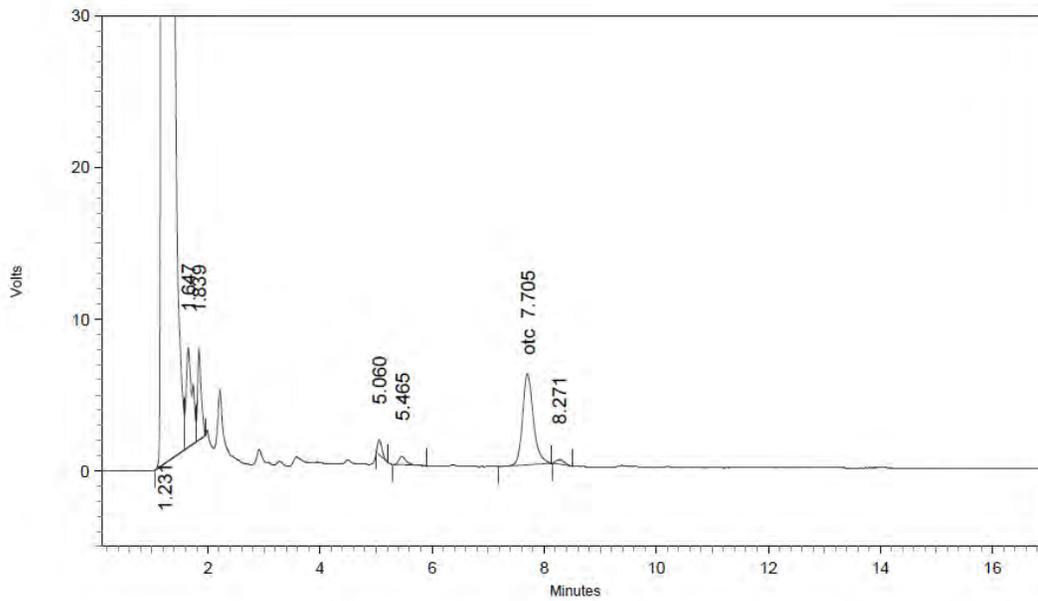


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.652	103140	8357.24



T-15 OTC 5-JULIO-2016

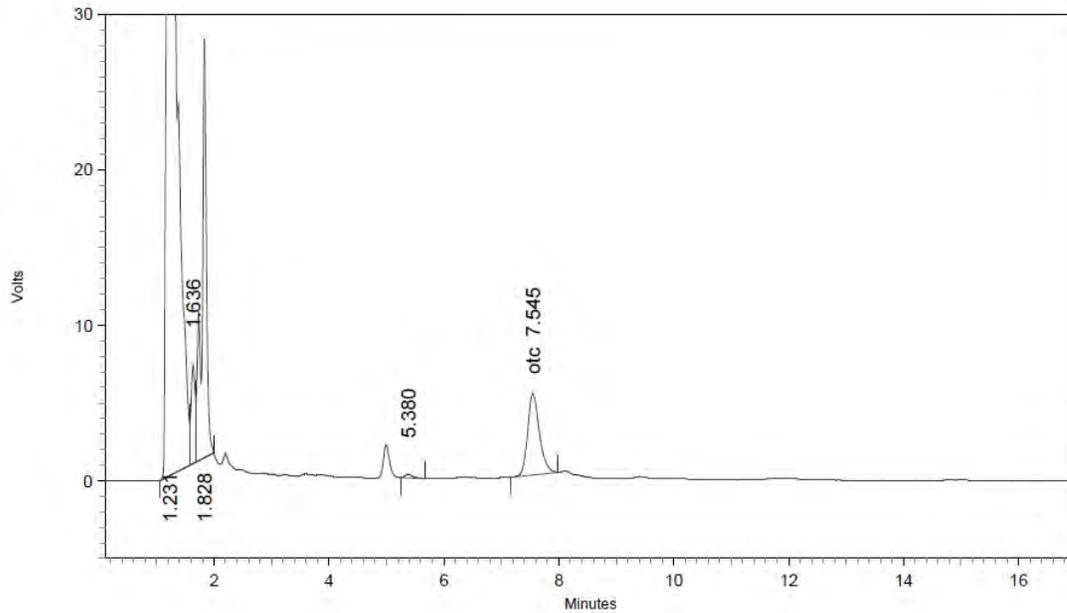


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.705	80774	7839.53



U-11 OTC 12-JULIO-2016

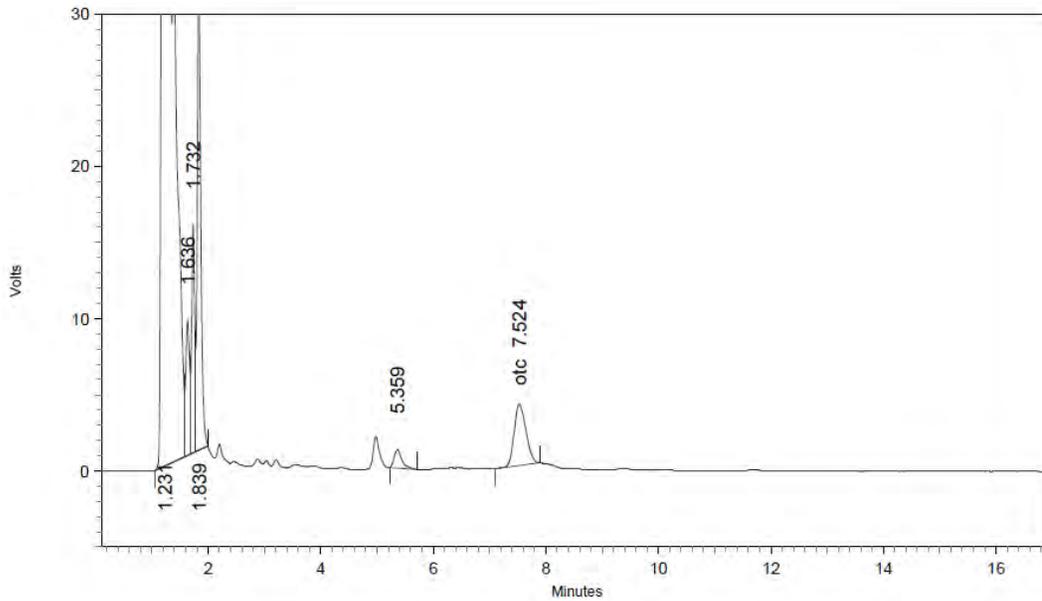


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.545	74550	6632.41



U-12 OTC 12-JULIO-2016

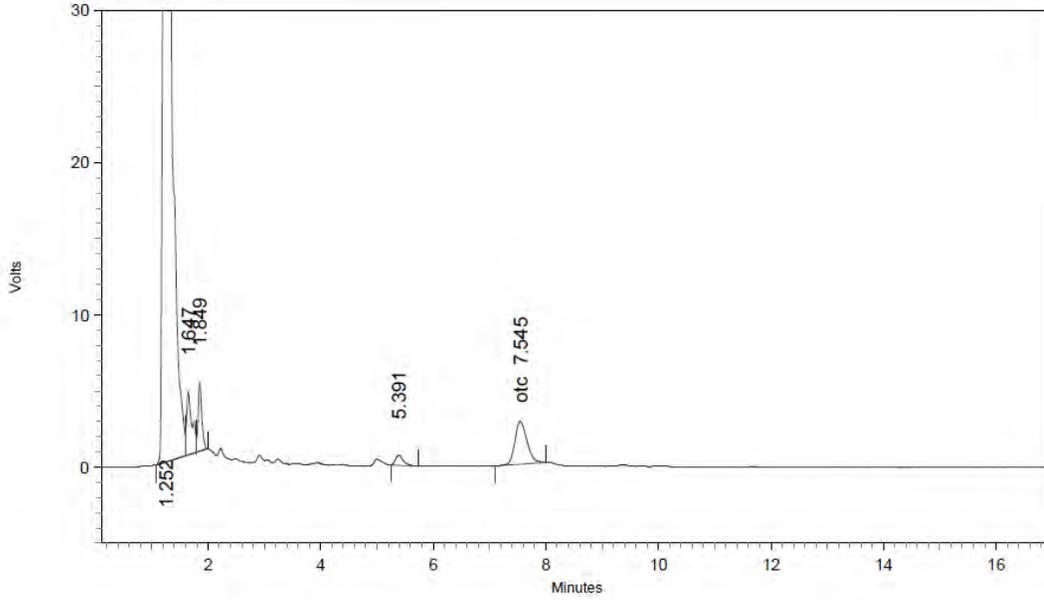


2: 355 mm, 8 mm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.524	58270	5682.74



U-13 OTC 12-JULIO-2016

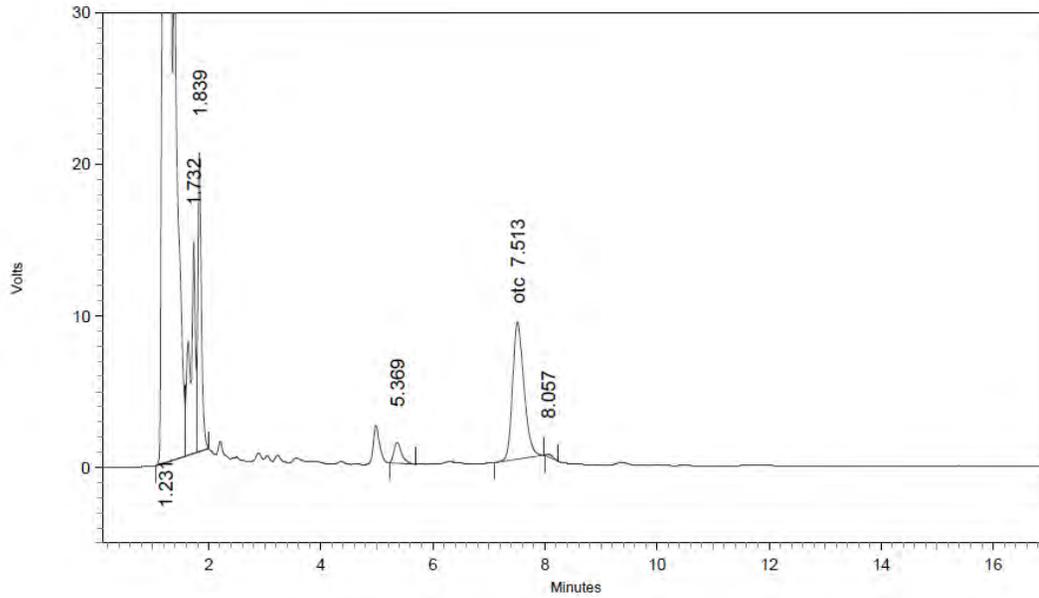


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.545	41912	5733.36



U-14 OTC 12-JULIO-2016

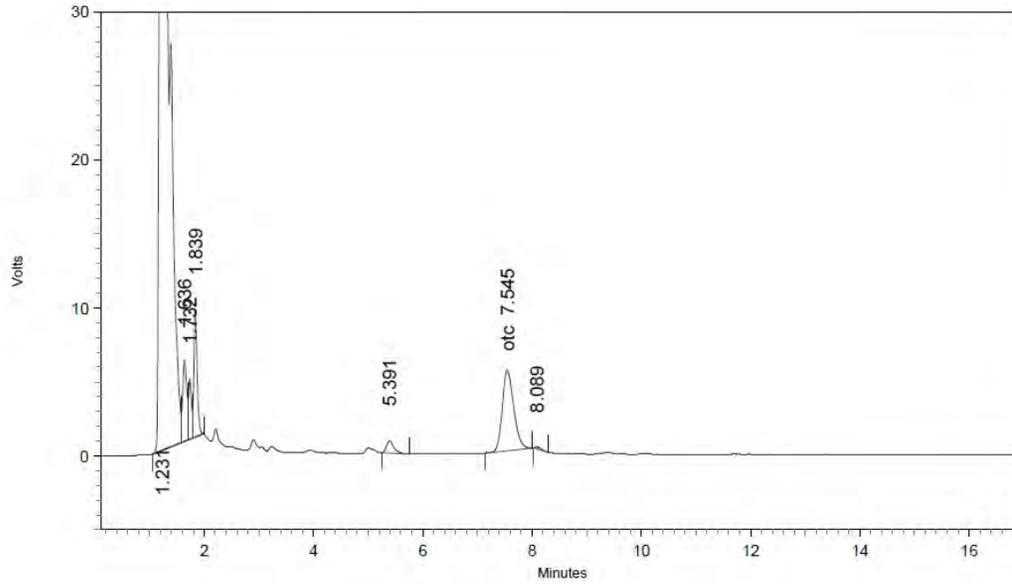


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.513	127720	6377.20



U-15 OTC 12-JULIO-2016

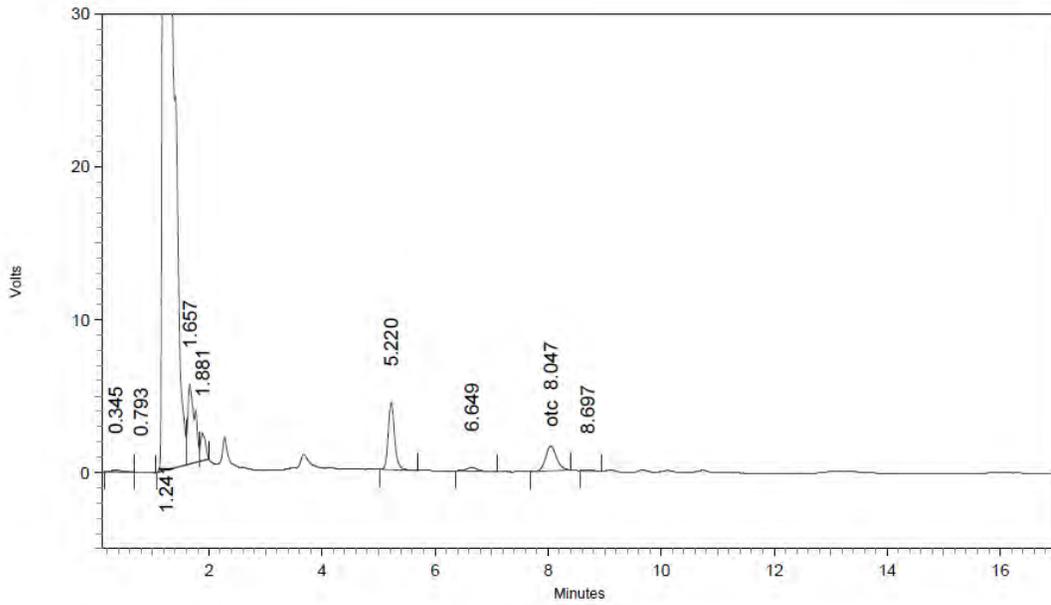


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.545	79382	5997.40



S-16 OTC 30-JUNIO-2016

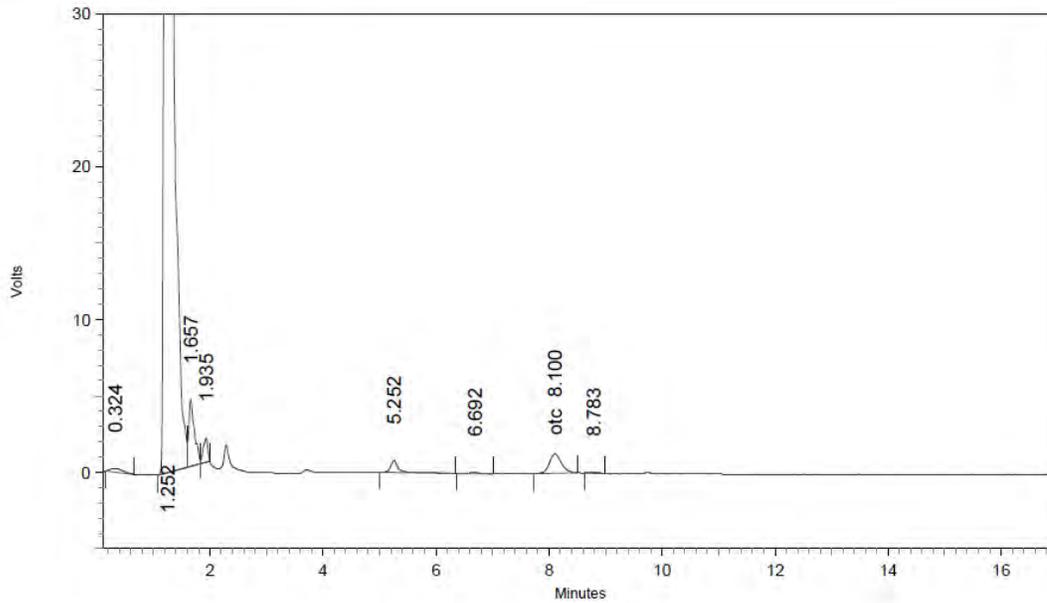


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.047	21994	8065.35



S-17 OTC 30-JUNIO-2016

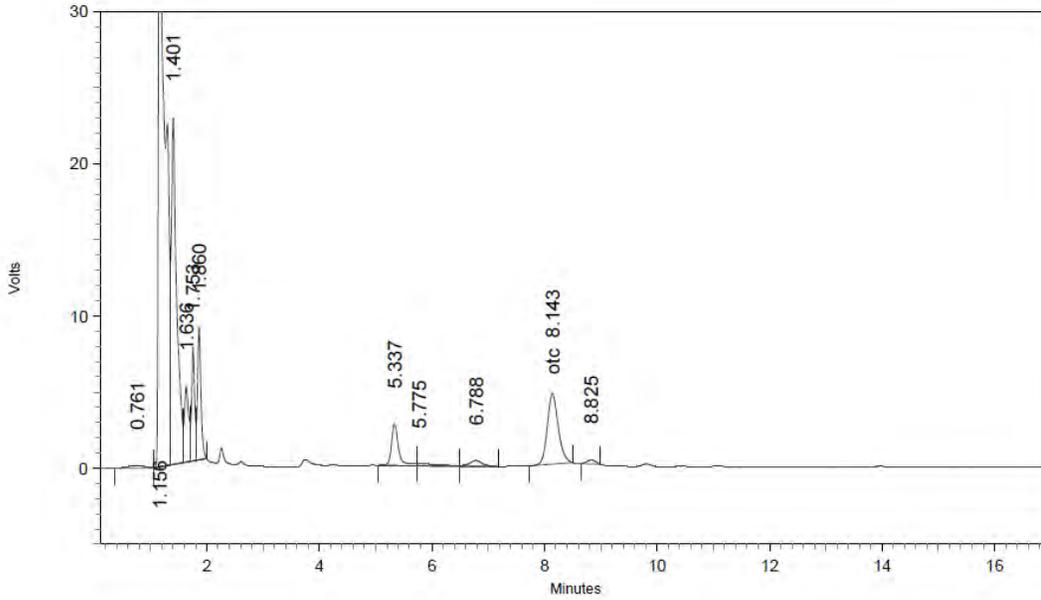


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.100	18783	7091.87



S-18 OTC 30-JUNIO-2016

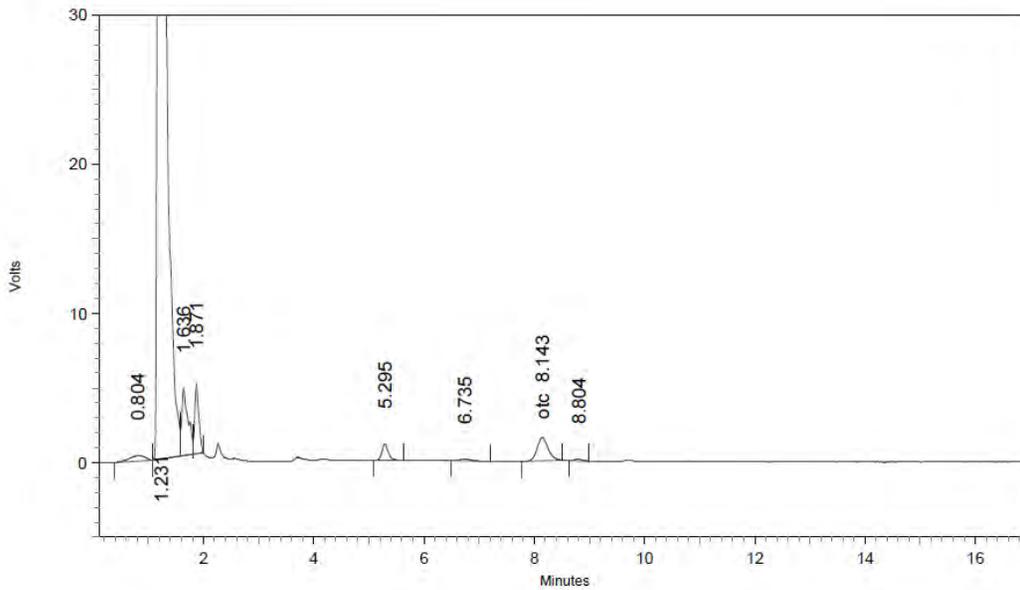


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.143	62841	8407.12



S-19 OTC 30-JUNIO-2016

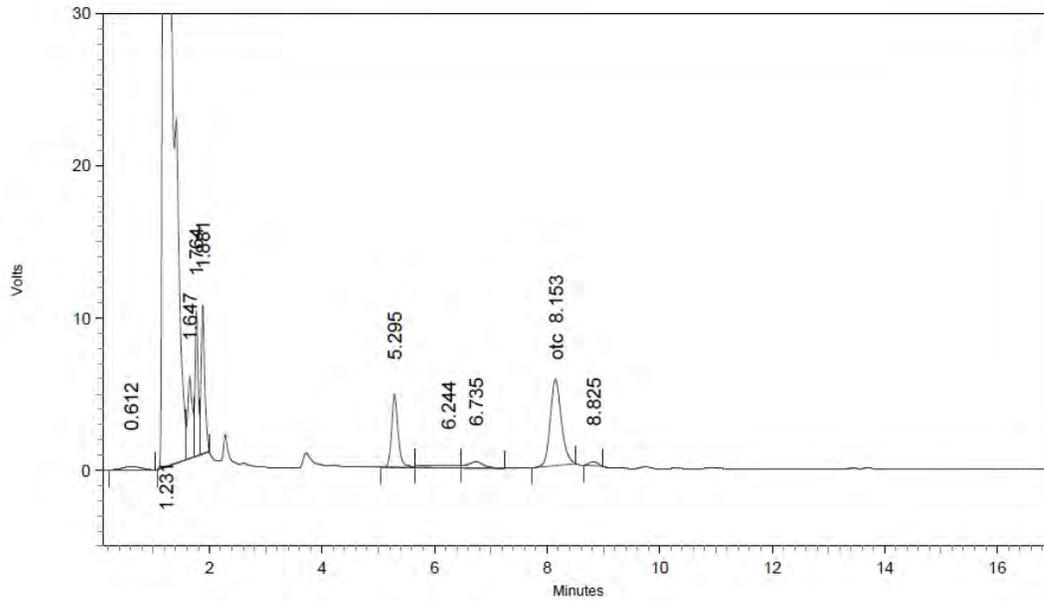


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.143	21677	8246.75



S-20 OTC 30-JUNIO-2016

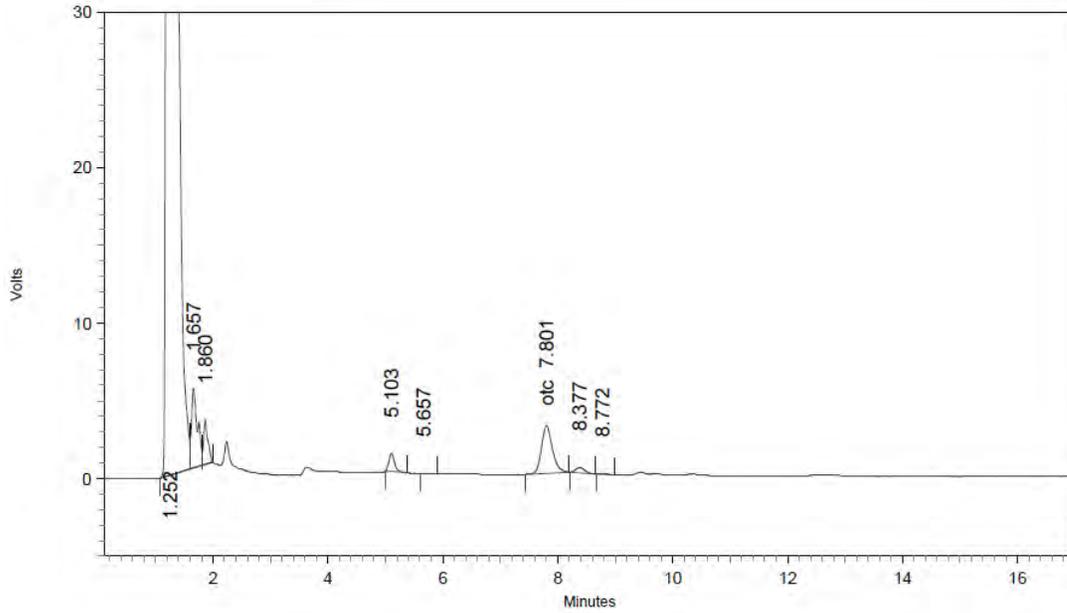


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.153	77429	8246.46



T-16 OTC 5-JULIO-2016

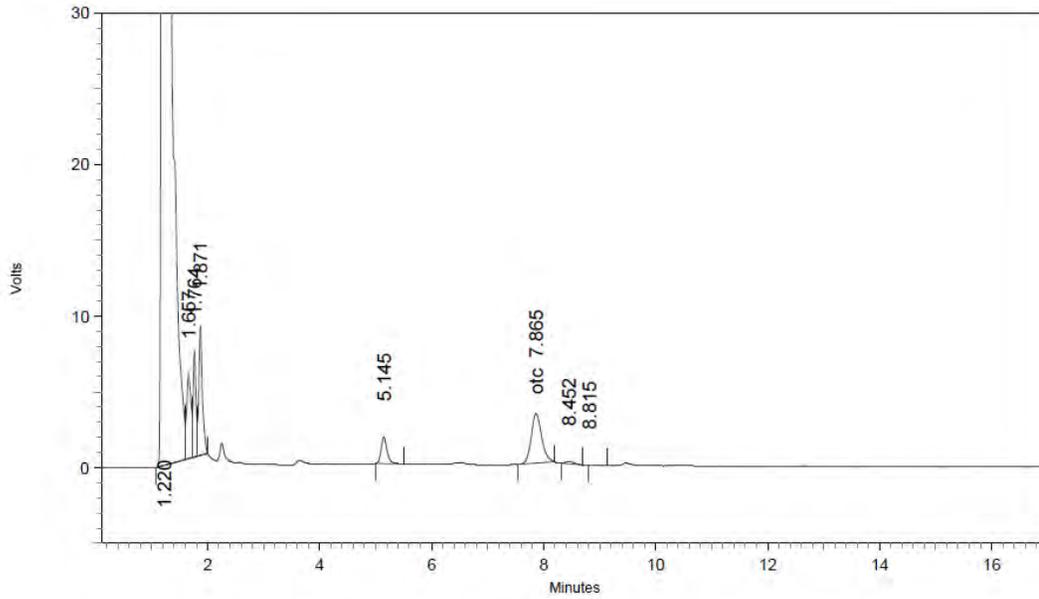


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.801	40512	8258.49



T-17 OTC 5-JULIO-2016

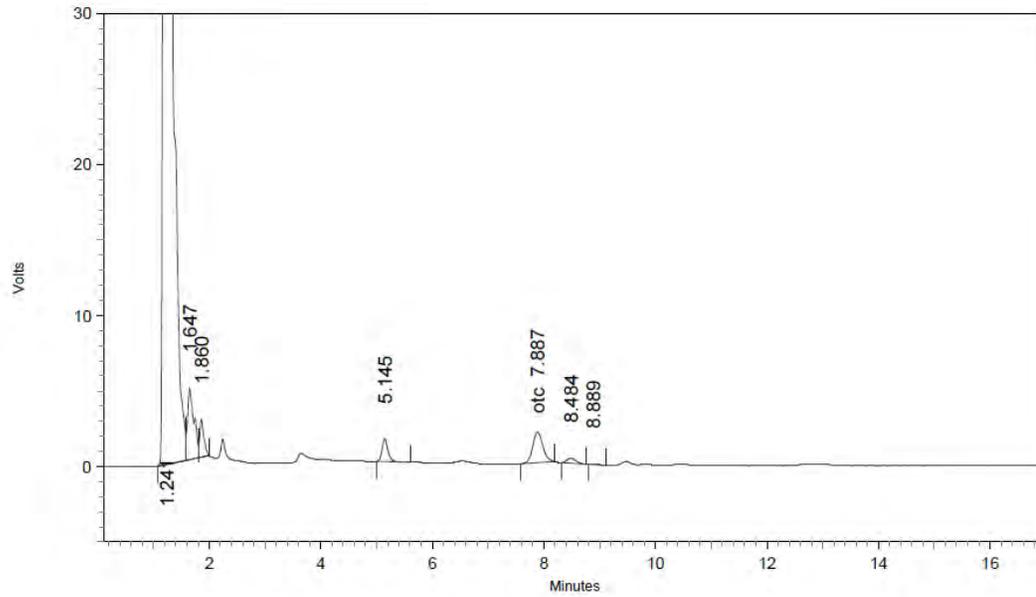


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.865	42452	8328.71



T-18 OTC 5-JULIO-2016

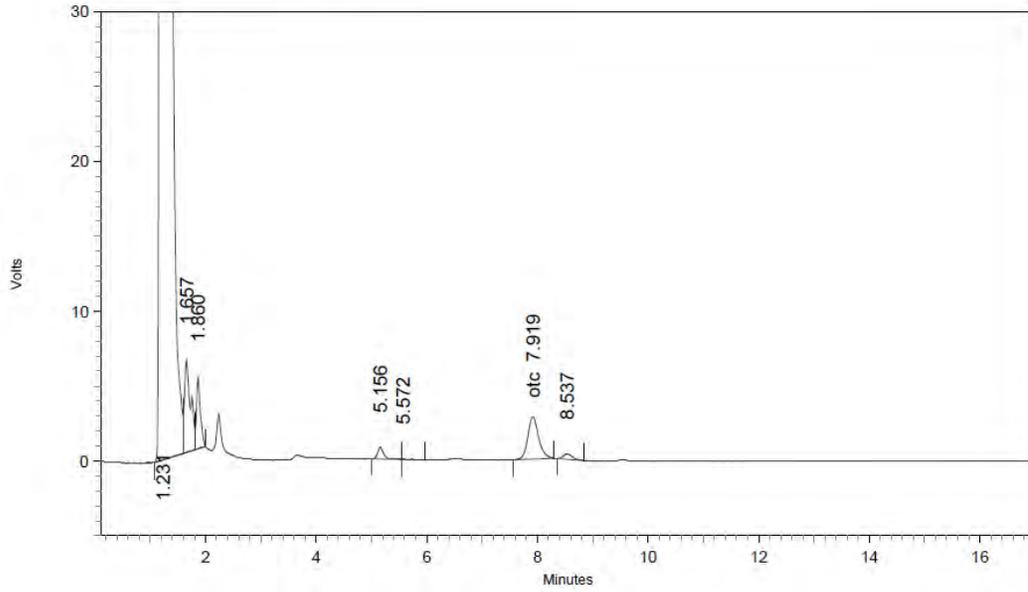


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.887	25584	8654.16



T-19 OTC 5-JULIO-2016

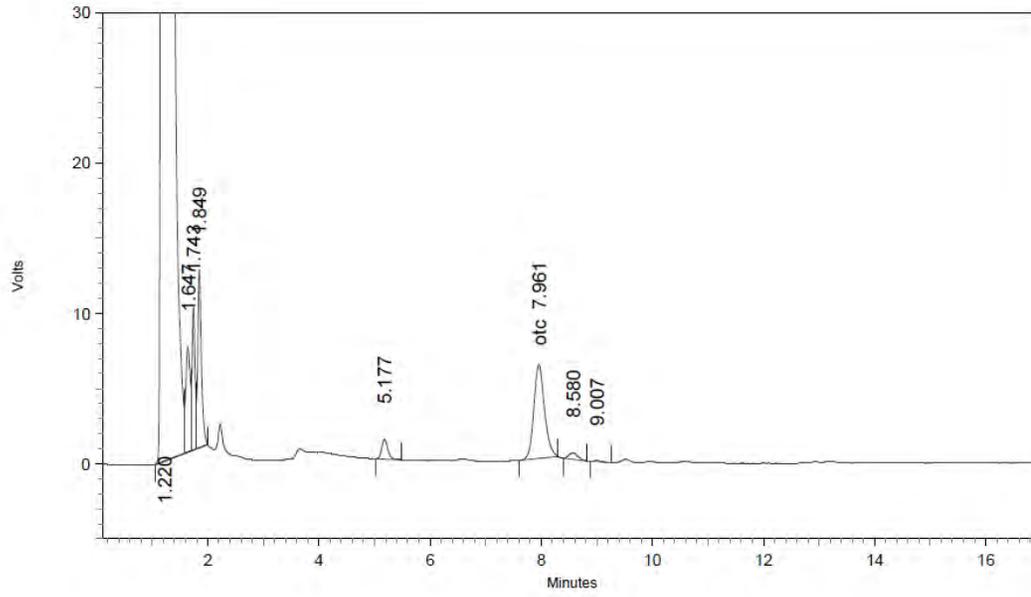


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.919	38806	7854.46



T-20 OTC 5-JULIO-2016

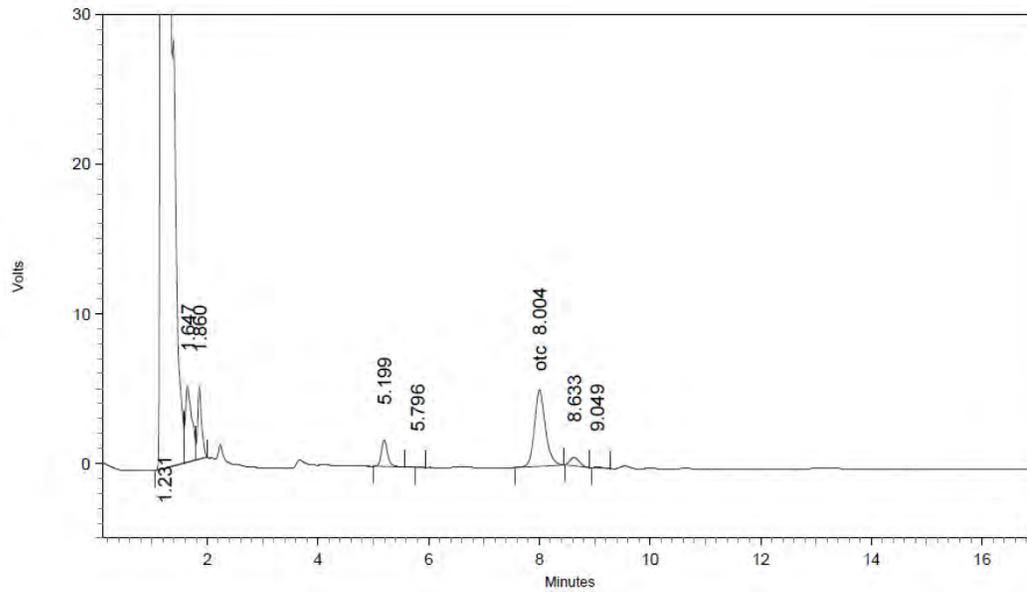


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.961	83154	8157.42



U-16 OTC 5-JULIO-2016

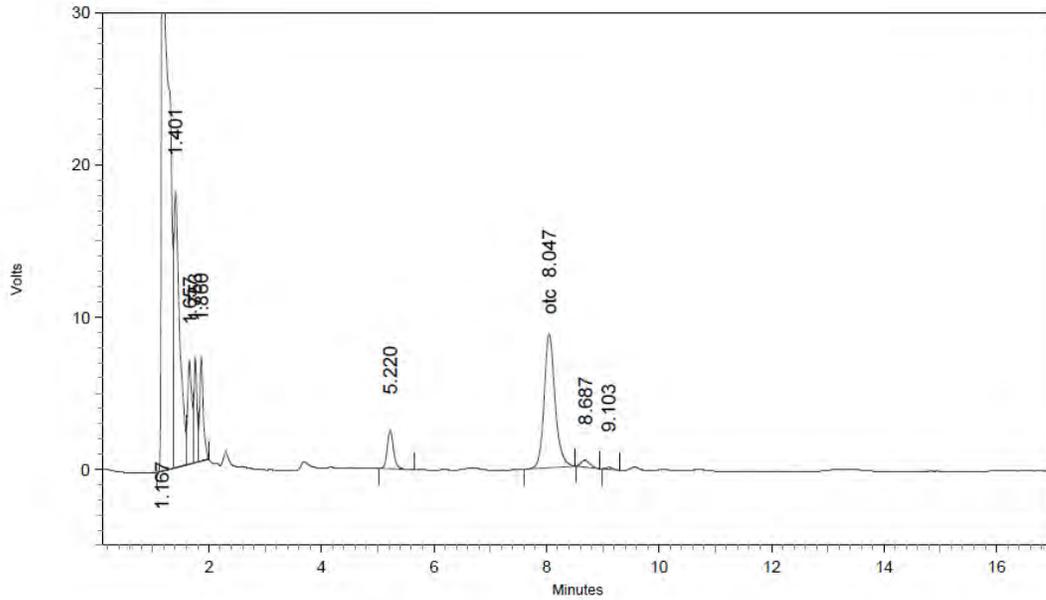


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.004	69719	8133.21



U-17 OTC 5-JULIO-2016

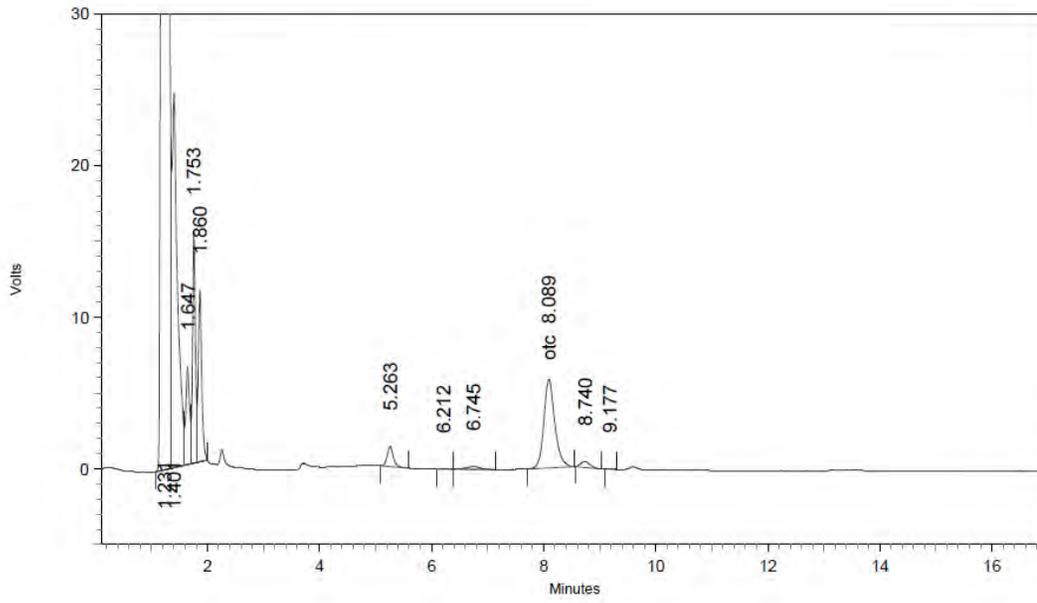


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.047	118613	8617.36



U-18 OTC 5-JULIO-2016

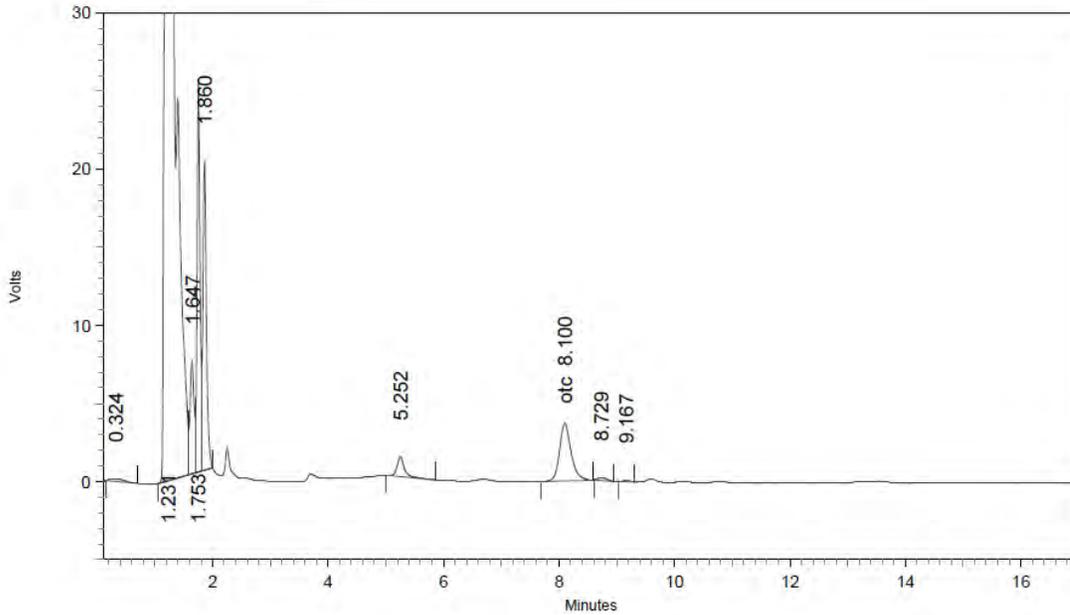


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.089	79209	8511.25



U-19 OTC 5-JULIO-2016

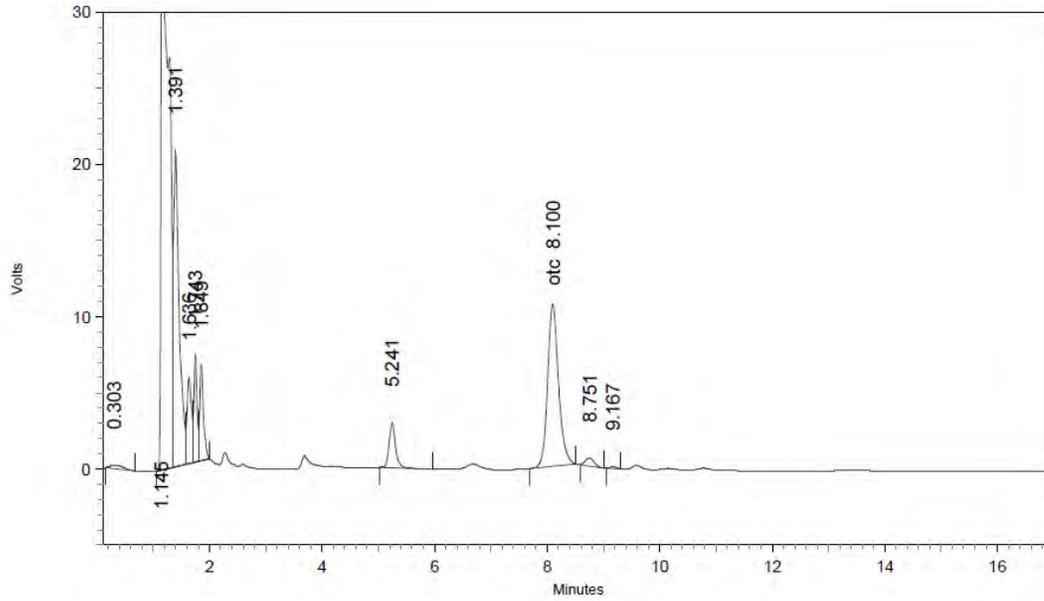


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.100	50885	8278.99



U-20 OTC 5-JULIO-2016



2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.100	142772	8609.51



Anexo 8.15. Resultados de OTC curva de depleci3n Magnadur en Salar condiciones controladas

Fecha	Nº Mx	Días	área	conc obtenida
 analisis		 post- inyecci3n		 ng/g
14/06/2016	V-1	29	93.149	716,3
14/06/2016	V-2	29	24.110	189,0
14/06/2016	V-3	29	18.888	147,5
14/06/2016	V-4	29	132.143	1061,9
14/06/2016	V-5	29	189.489	1511,7
14/06/2016	W-1	29	93.498	723,1
14/06/2016	W-2	29	10.501	79,8
14/06/2016	W-3	29	112.834	869,9
14/06/2016	W-4	29	129.276	998,9
14/06/2016	W-5	29	78.630	628,3
15/06/2016	X-1	29	129.171	1001,9
15/06/2016	X-2	29	82.275	648,5
15/06/2016	X-3	29	133.028	1022,1
15/06/2016	X-4	29	189.332	1455,7
15/06/2016	X-5	29	147.222	1171,6
09/06/2016	V-6	38	71.469	558,6
09/06/2016	V-7	38	31.642	248,9
09/06/2016	V-8	38	62.398	499,1
09/06/2016	V-9	38	41.746	334,4
09/06/2016	V-10	38	50.854	404,7
09/06/2016	W-6	38	64.103	496,9
09/06/2016	W-7	38	102.137	802,5
09/06/2016	W-8	38	41.407	315,3
09/06/2016	W-9	38	39.489	310,6
09/06/2016	W-10	38	62.579	493,6
09/06/2016	X-6	38	41.204	317,3
09/06/2016	X-7	38	54.330	414,4
09/06/2016	X-8	38	30.784	232,0
09/06/2016	X-9	38	43.969	333,6
09/06/2016	X-10	38	18.187	143,1

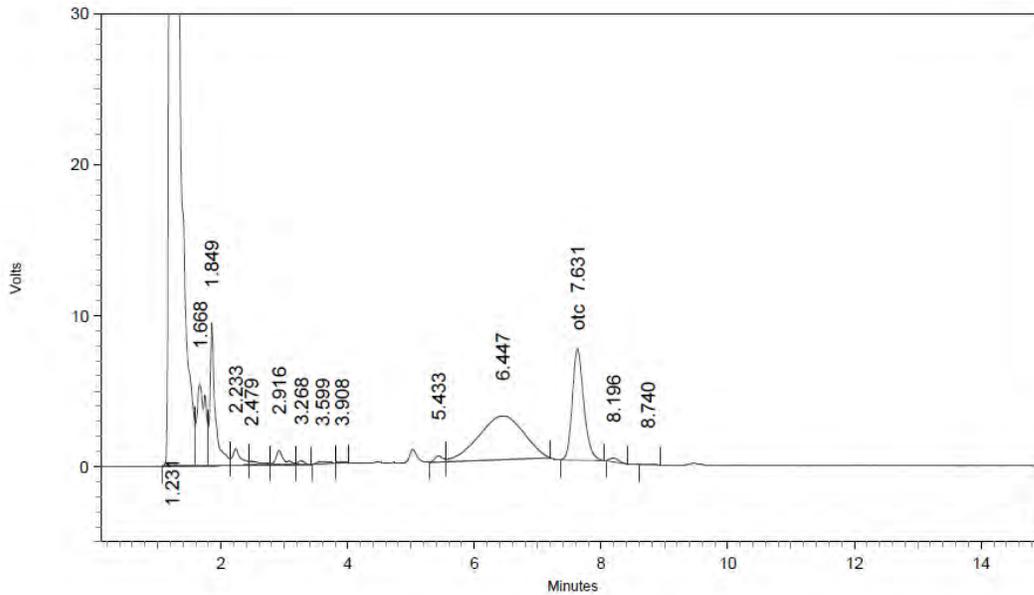


14/06/2016	V-11	44	56.223	442,4
14/06/2016	V-12	44	53.819	412,8
14/06/2016	V-13	44	70.299	544,2
14/06/2016	V-14	44	51.446	399,9
14/06/2016	V-15	44	41.661	315,4
14/06/2016	W-11	44	5.395	40,9
14/06/2016	W-12	44	69.265	540,3
14/06/2016	W-13	44	64.968	520,8
15/06/2016	W-14	44	34.377	261,8
15/06/2016	W-15	44	56.947	447,2
15/06/2016	X-11	44	49.058	386,4
15/06/2016	X-12	44	38.519	304,1
15/06/2016	X-13	44	67.772	525,5
15/06/2016	X-14	44	54.028	412,1
15/06/2016	X-15	44	63.318	502,5
14/06/2016	V-16	55	48.132	379,1
14/06/2016	V-18	55	30.715	242,9
14/06/2016	V-19	55	85.180	652,3
14/06/2016	V-20	55	64.146	489,7
15/06/2016	W-16	55	74.861	576,3
15/06/2016	W-17	55	58.977	451,8
15/06/2016	W-18	55	72.266	559,5
15/06/2016	W-19	55	57.206	453,7
15/06/2016	W-20	55	102.081	797,4
15/06/2016	X-16	55	23.140	175,4
15/06/2016	X-17	55	25.520	198,3
15/06/2016	X-18	55	50.940	389,1
15/06/2016	X-19	55	19.798	156,9
15/06/2016	X-20	55	36.840	293,0



Anexo 8.16. Cromatogramas de curva de depleci3n Magnadur Salar, condiciones controladas

V-1 otc 14-Junio-2016

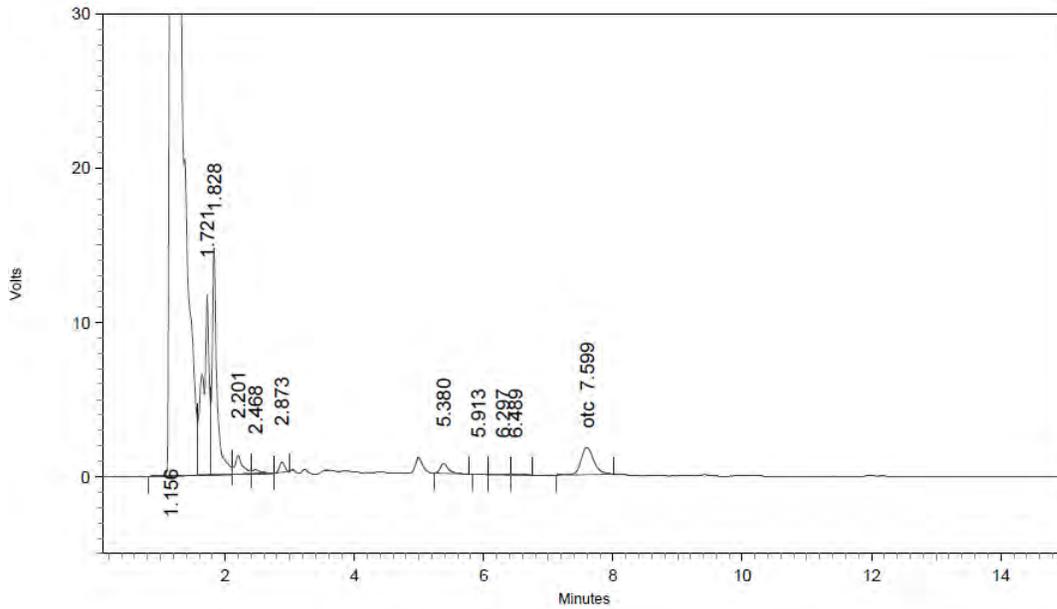


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.631	93149	8547.39



V-2 otc 14-Junio-2016

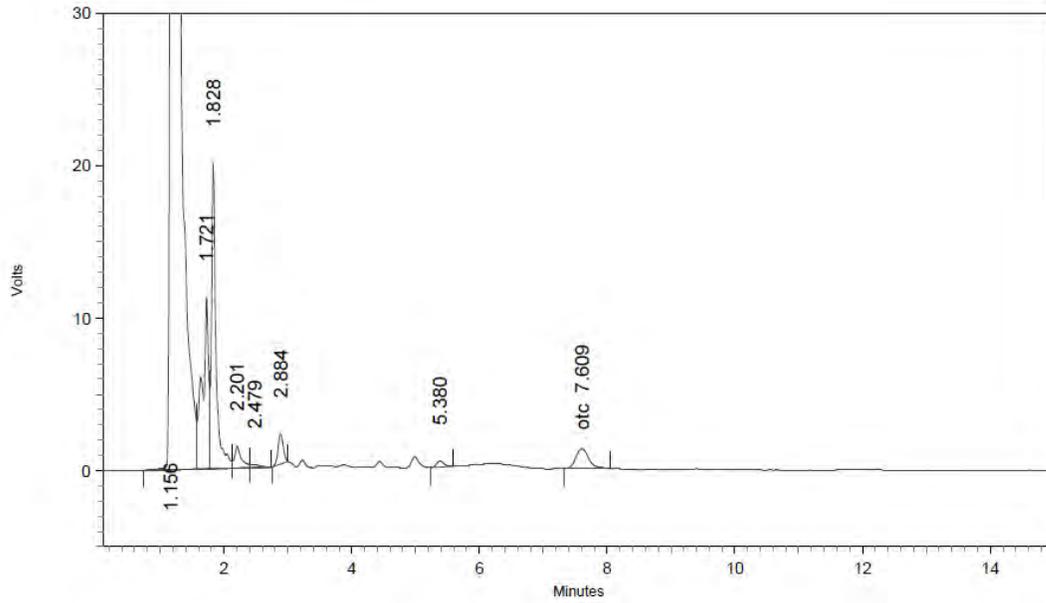


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.599	24110	7419.87



V-3 otc 14-Junio-2016

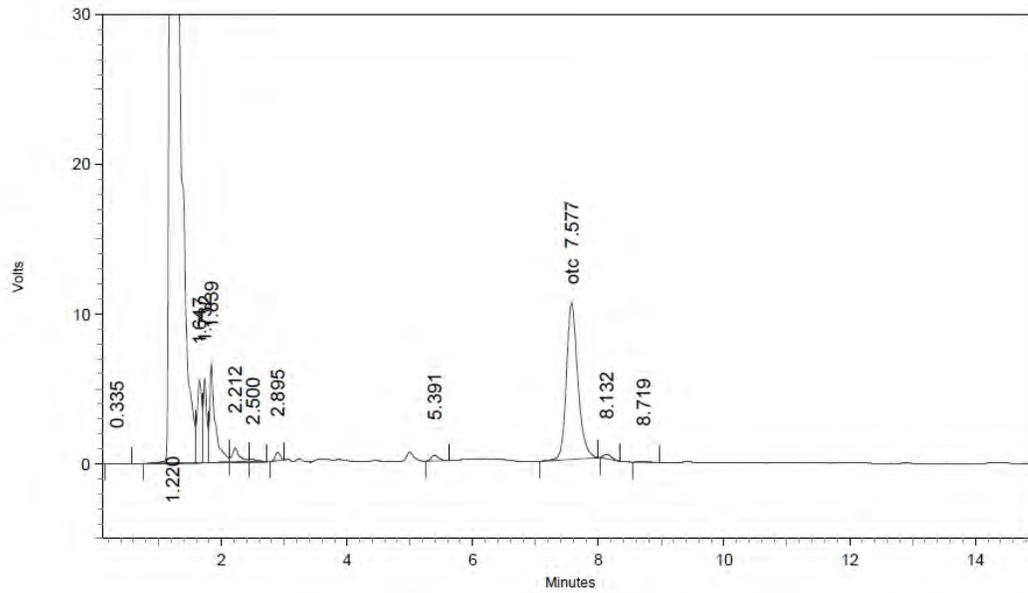


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.609	18888	6874.49



V-4 otc 14-Junio-2016

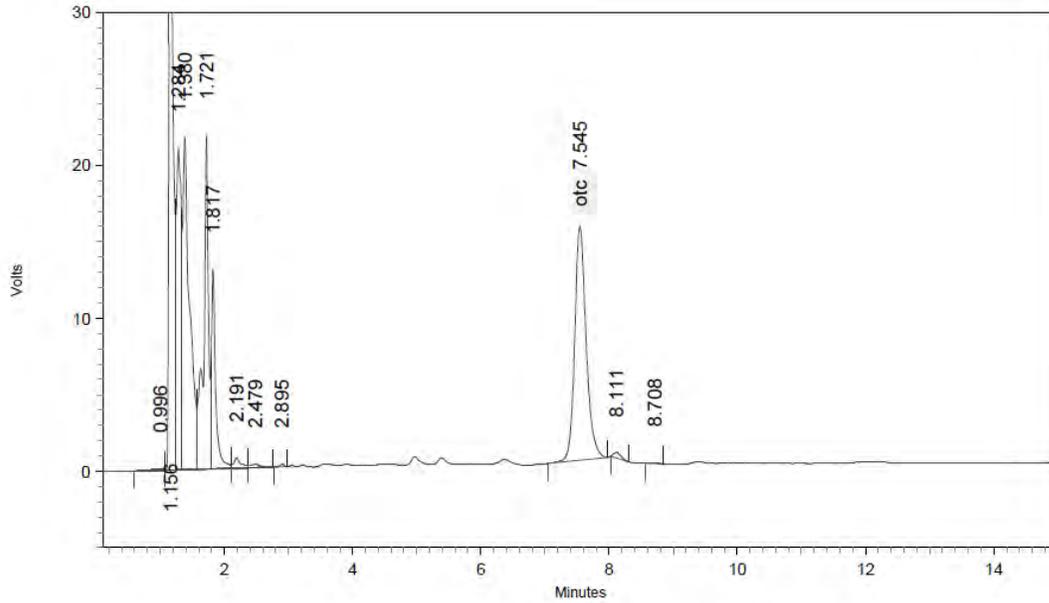


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.577	132143	8573.18



V-5 otc 14-Junio-2016

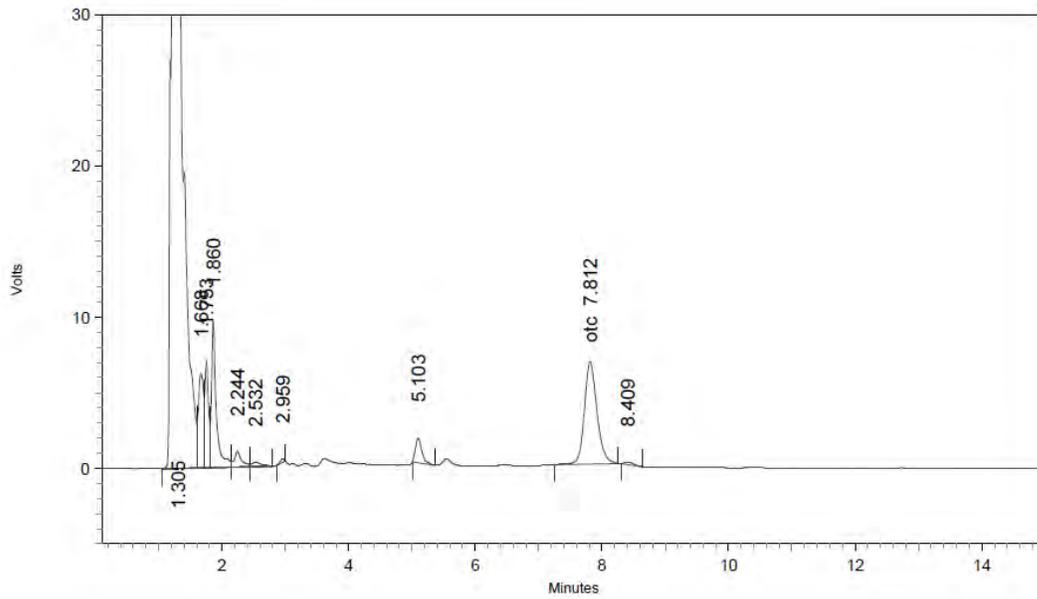


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.545	189489	8881.95



W-1 otc 14-Junio-2016

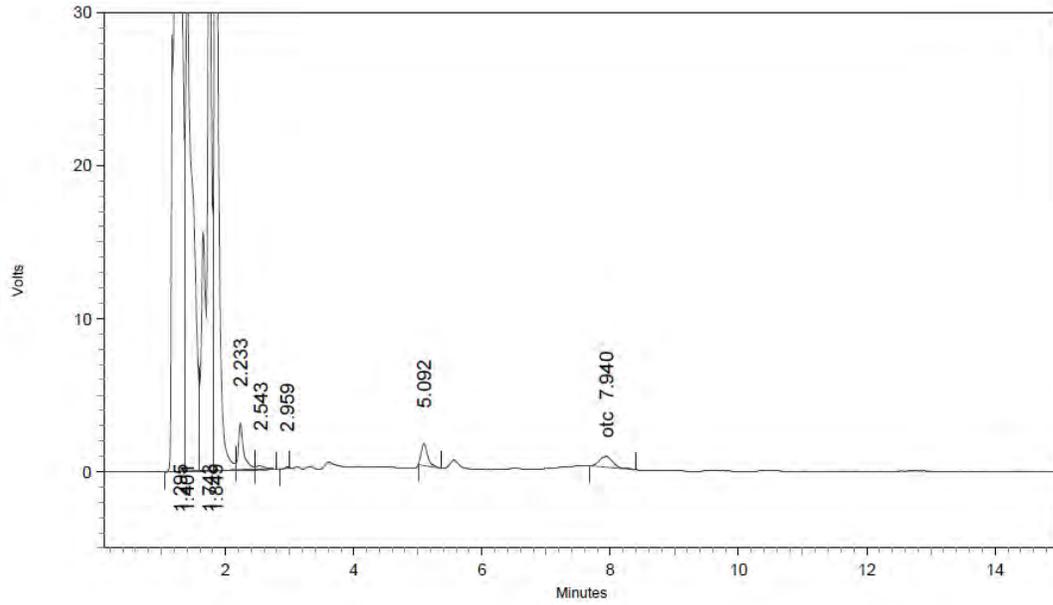


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.812	93498	7673.06



W-2 otc 14-Junio-2016

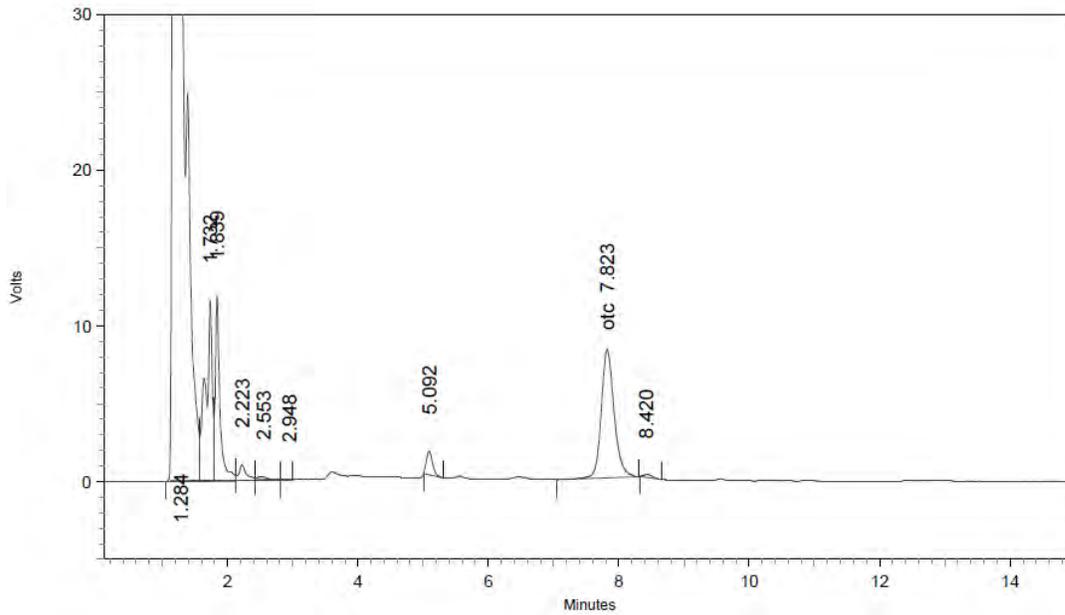


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.940	10501	6958.00



W-3 otc 14-Junio-2016

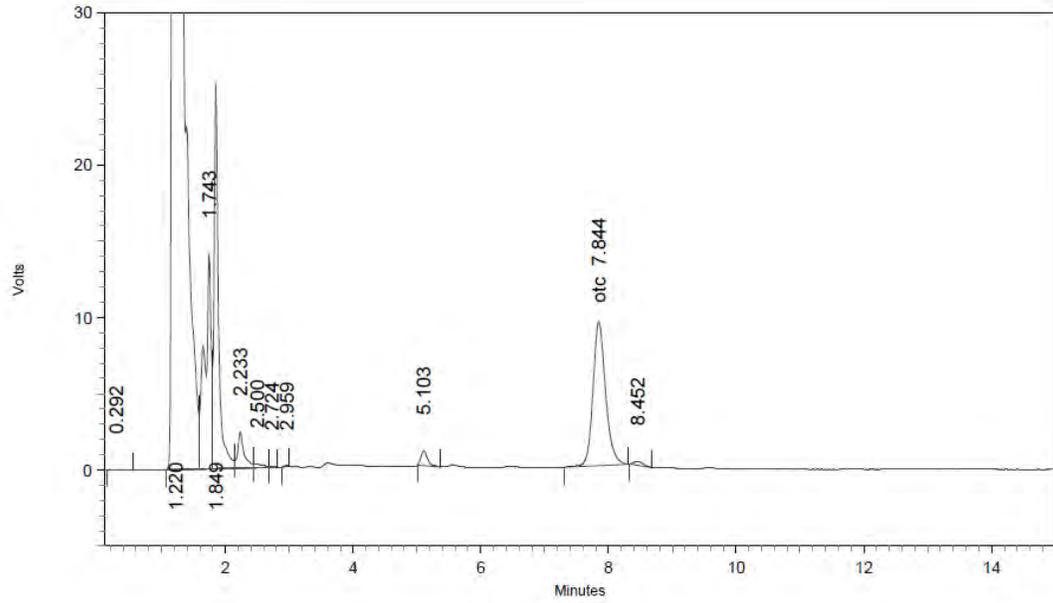


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.823	112834	7905.65



W-4 otc 14-Junio-2016

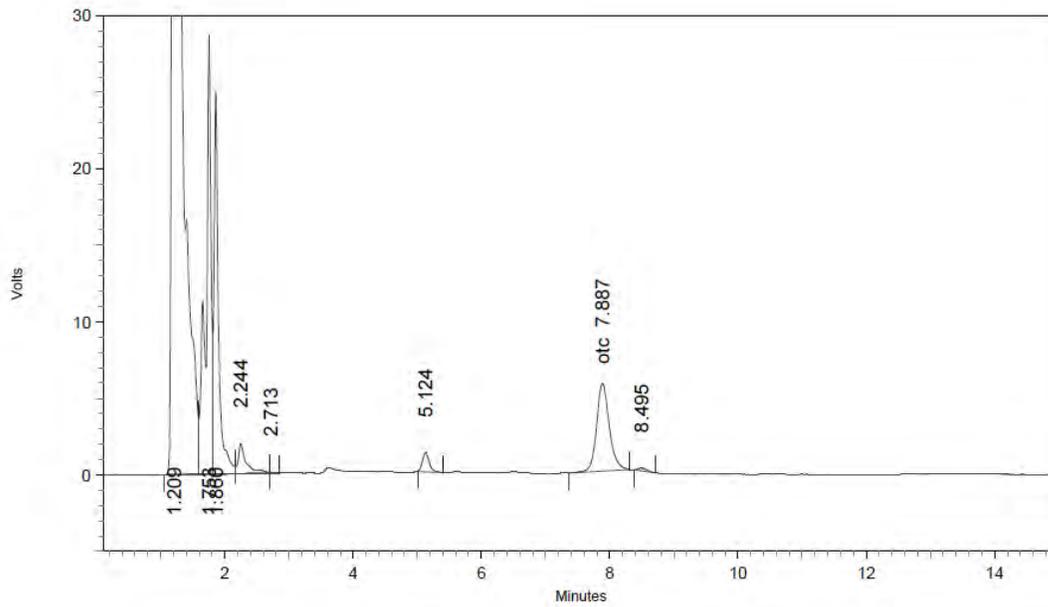


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.844	129276	7918.22



W-5 otc 14-Junio-2016

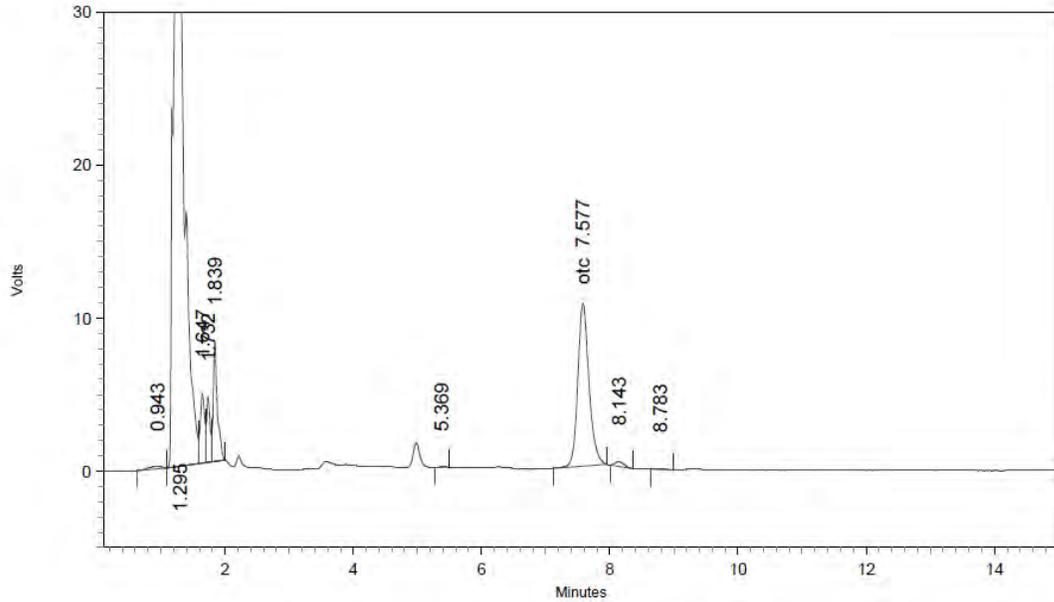


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.887	78630	7958.41



X-1 otc 15-junio-2016

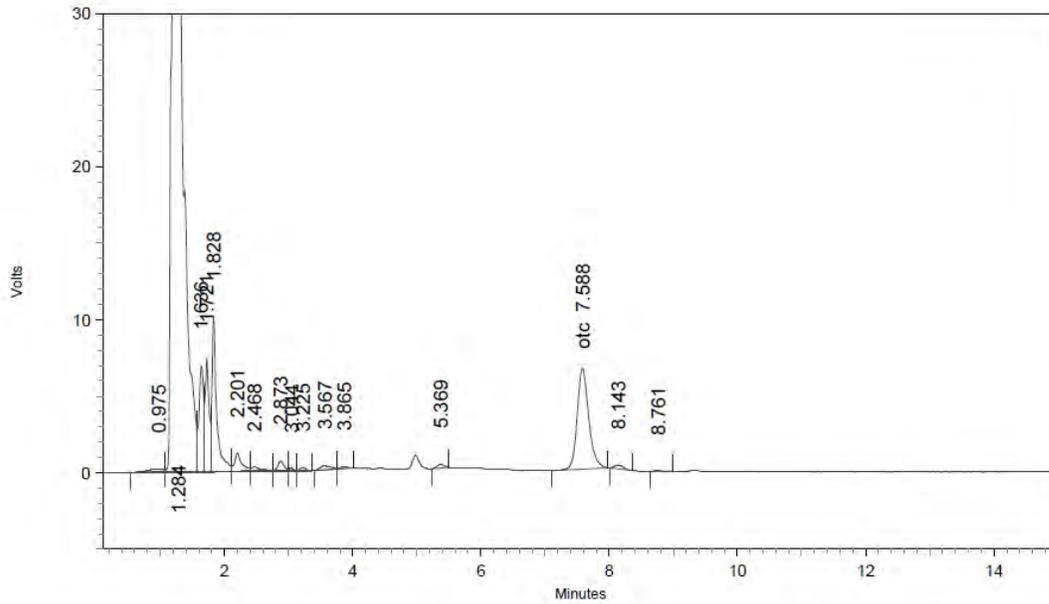


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.577	129171	9103.12



X-2 otc 15-junio-2016

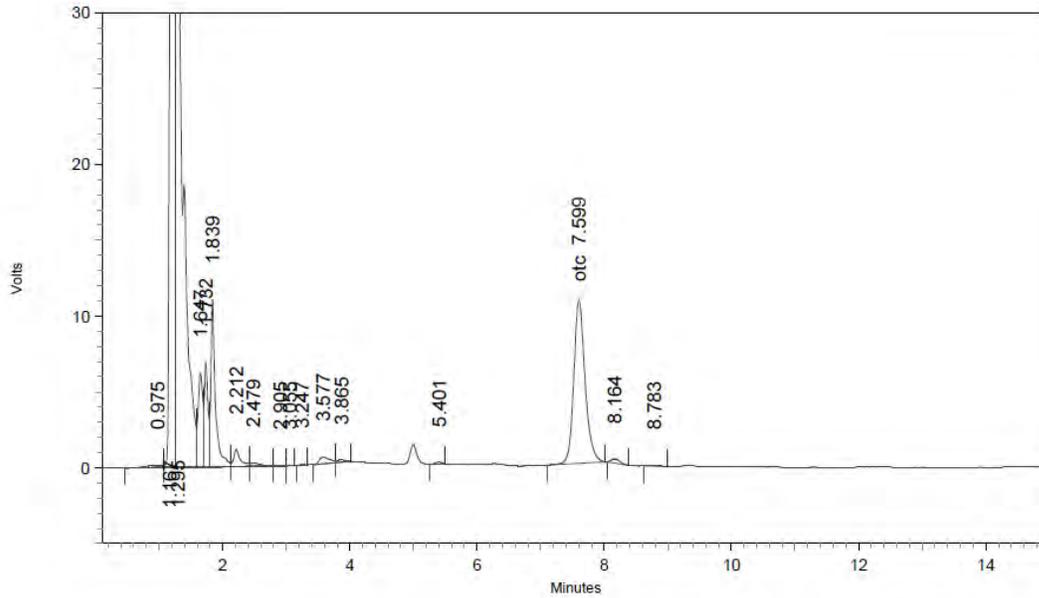


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.588	82275	8787.59



X-3 otc 15-junio-2016

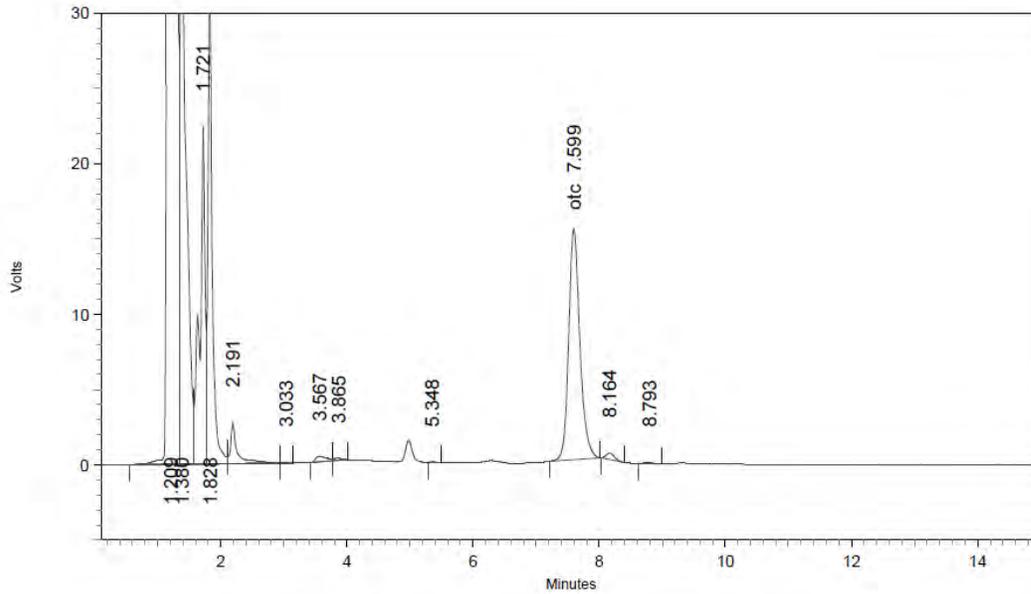


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.599	133028	8893.60



X-4 otc 15-junio-2016

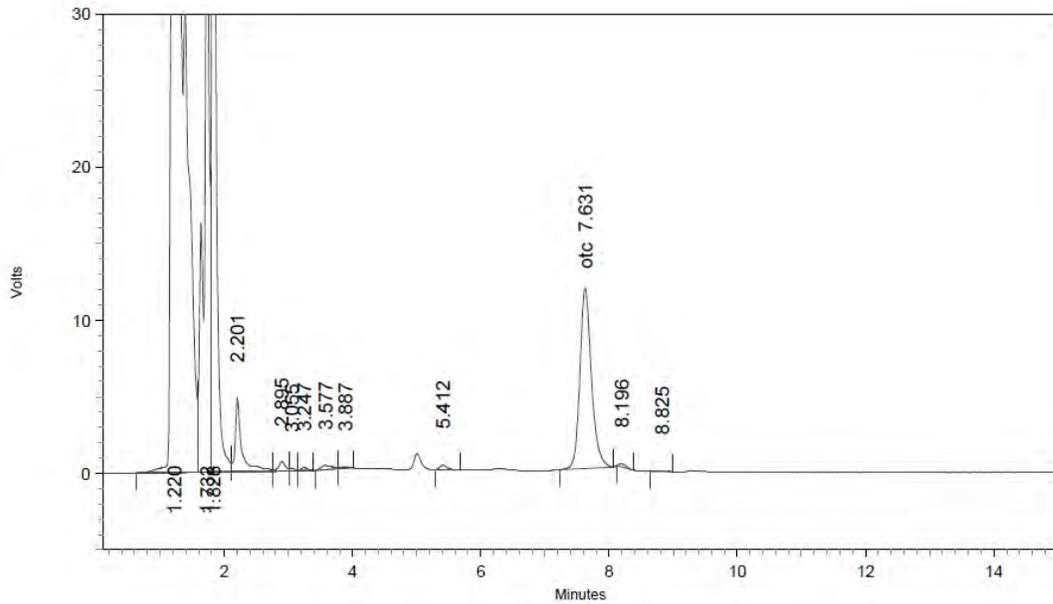


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.599	189332	9071.38



X-5 otc 15-junio-2016

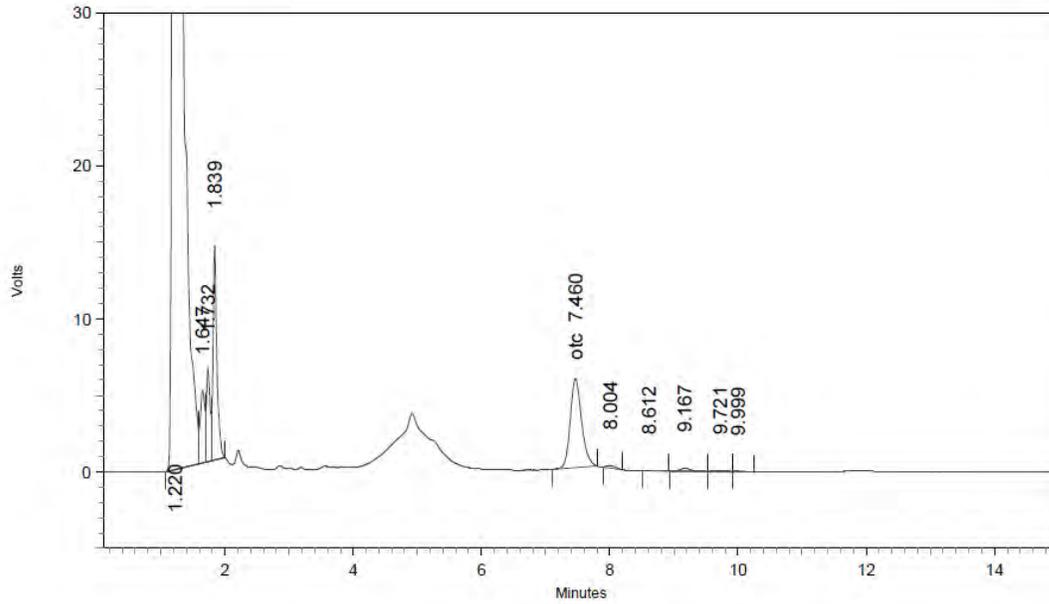


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.631	147222	8953.91



V-6 otc 9-Junio-2016

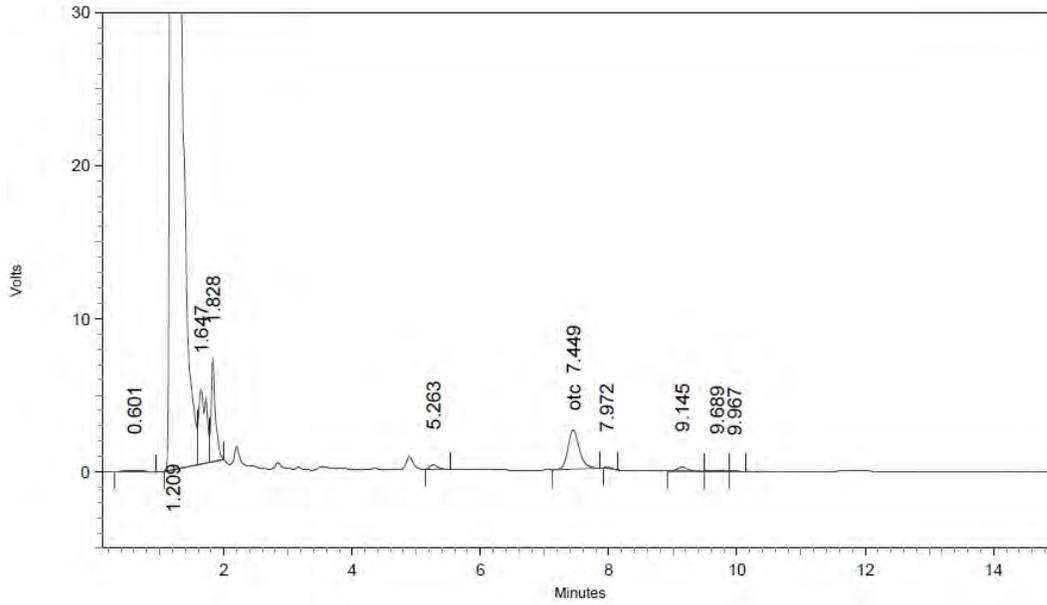


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.460	71469	8566.26



V-7 otc 9-Junio-2016

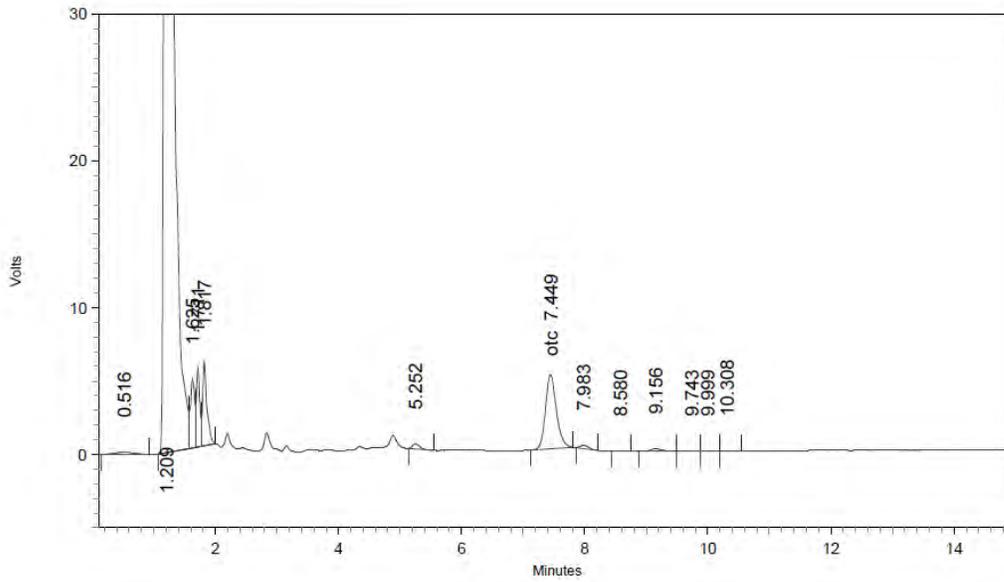


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.449	31642	8607.22



V-8 otc 9-Junio-2016

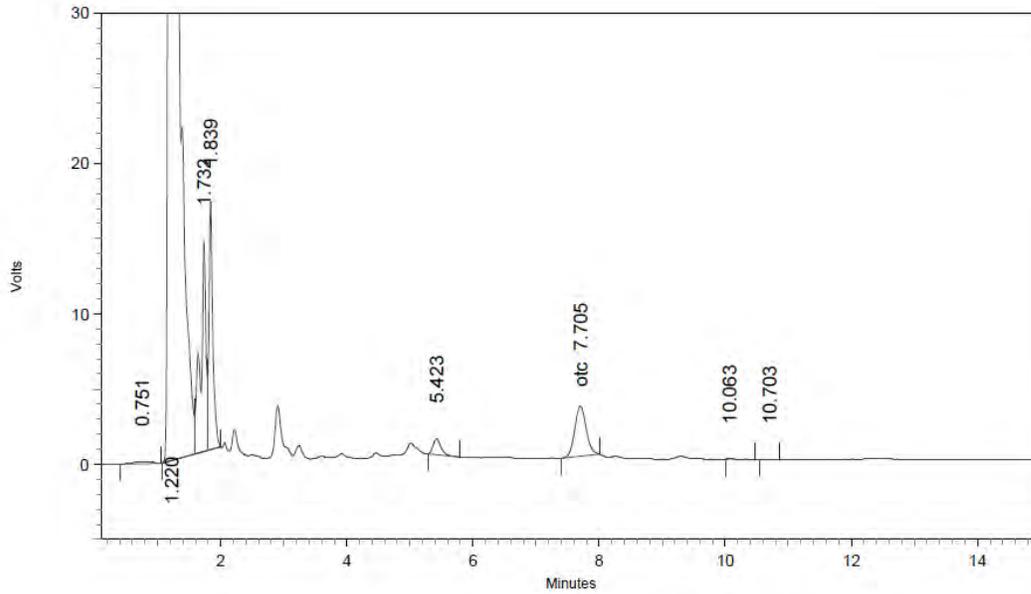


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.449	62398	8518.30



V-9 otc 9-Junio-2016

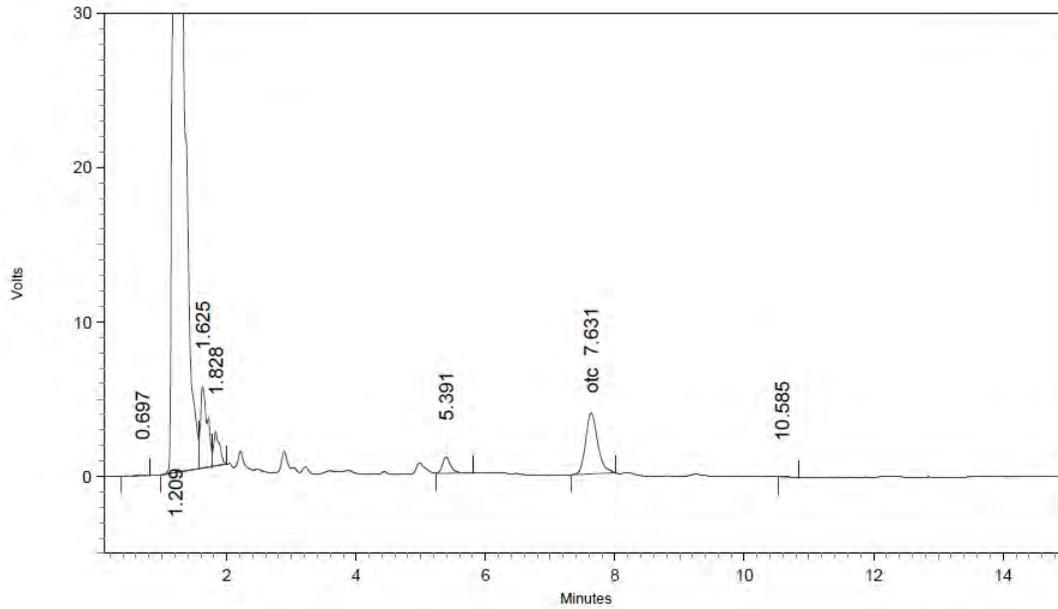


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.705	41746	8380.00



V-10 otc 9-Junio-2016

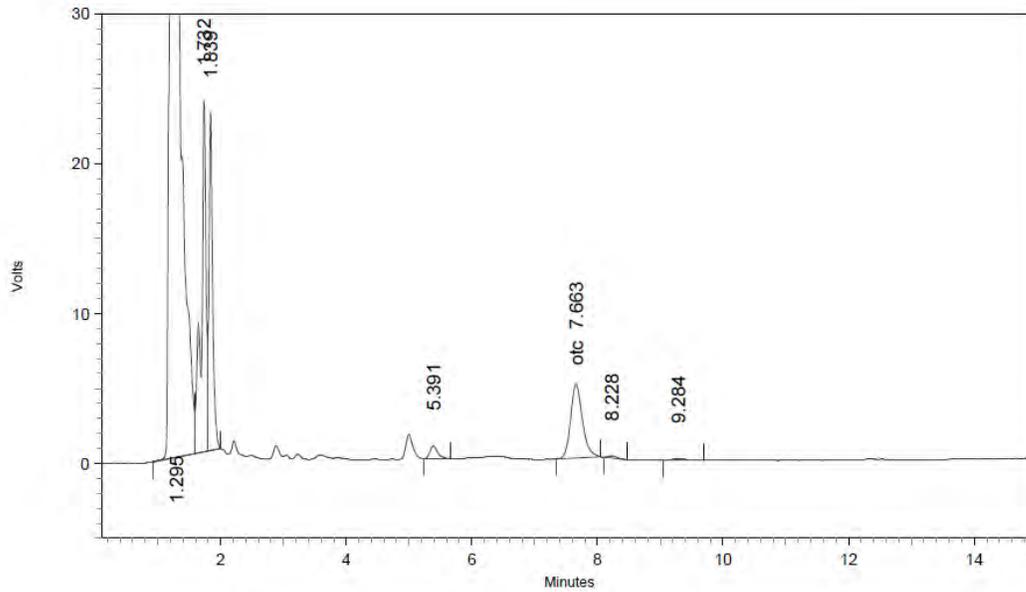


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.631	50854	8229.00



W-6 otc 9-Junio-2016

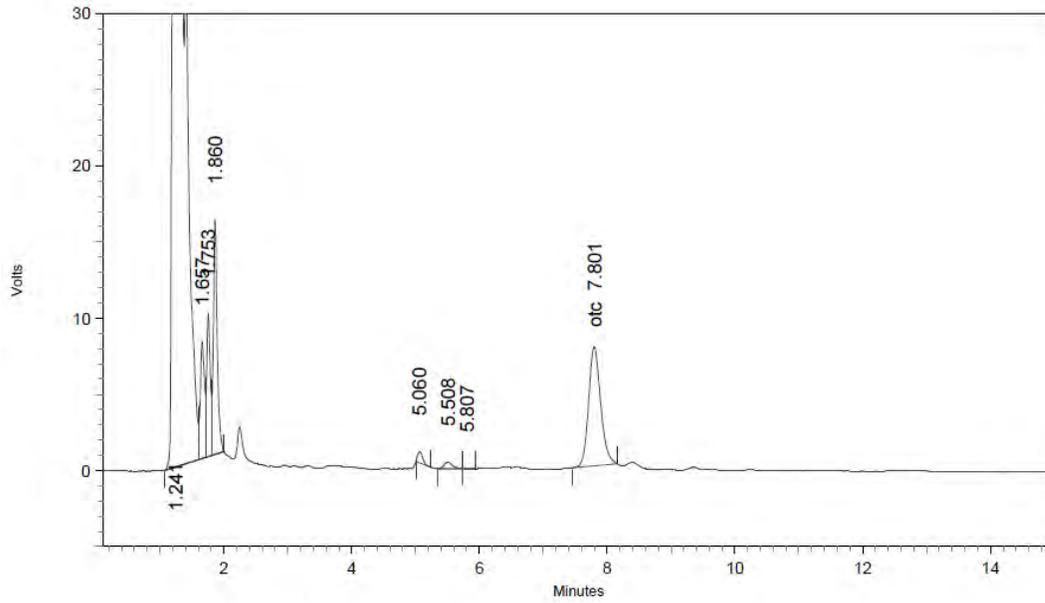


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.663	64103	7972.73



W-7 otc 9-Junio-2016

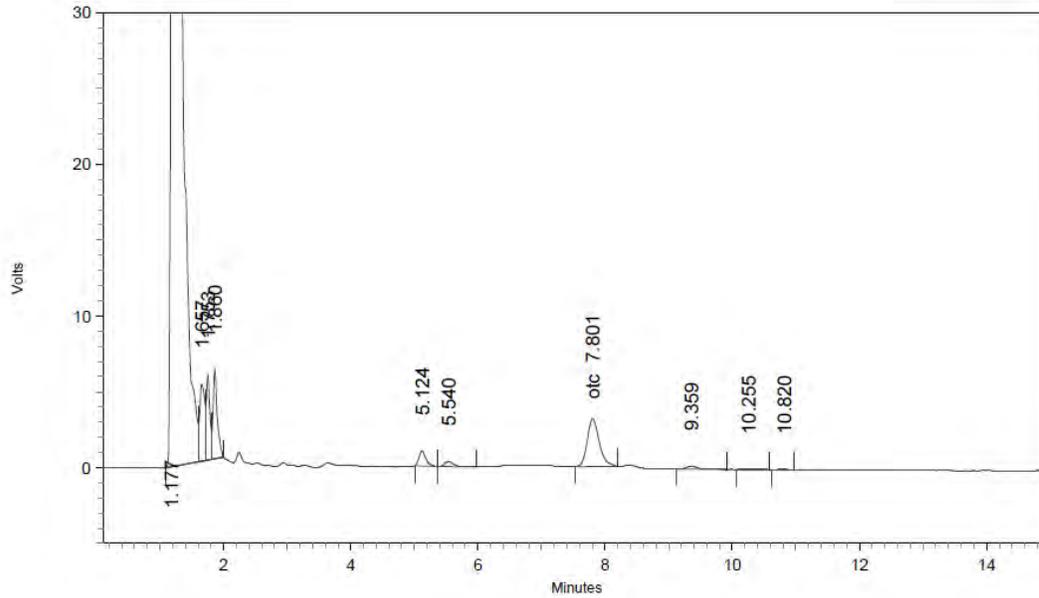


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.801	102137	8102.99



W-8 otc 9-Junio-2016

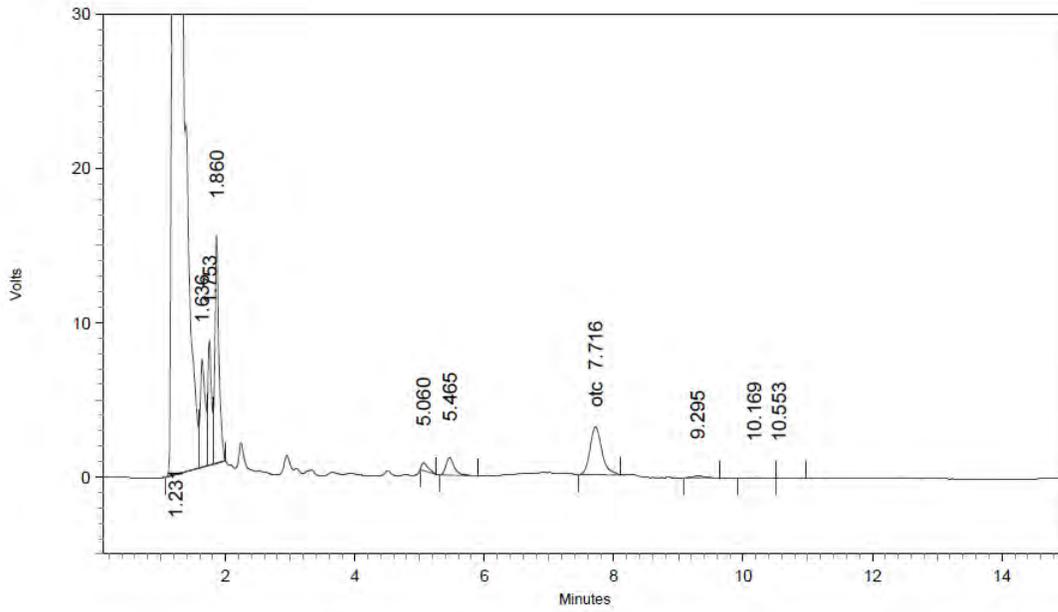


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.801	41407	8338.43



W-9 otc 9-Junio-2016

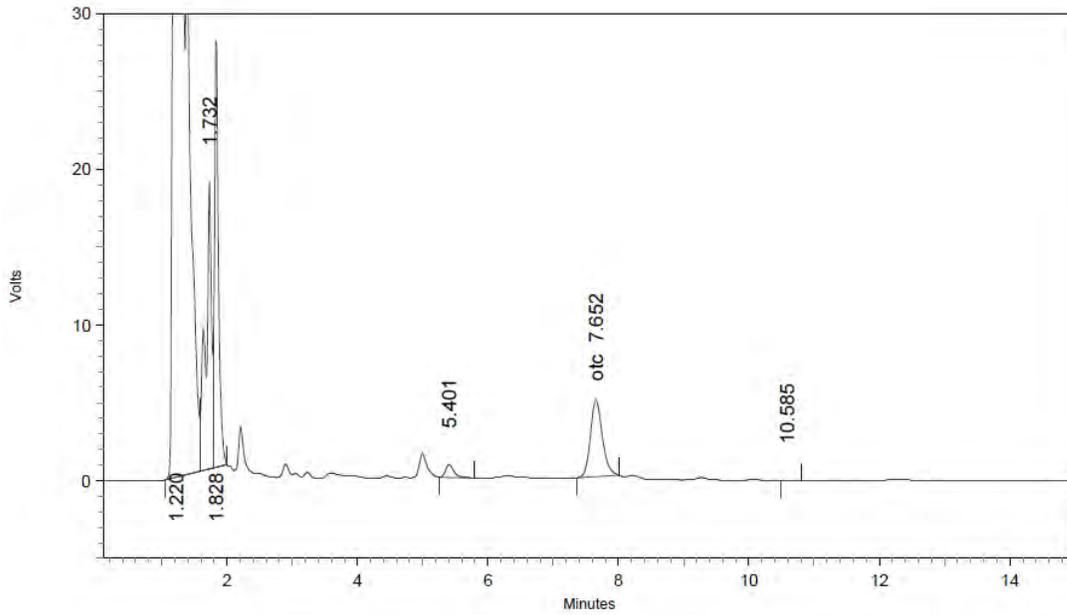


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.716	39489	8764.51



W-10 otc 9-Junio-2016

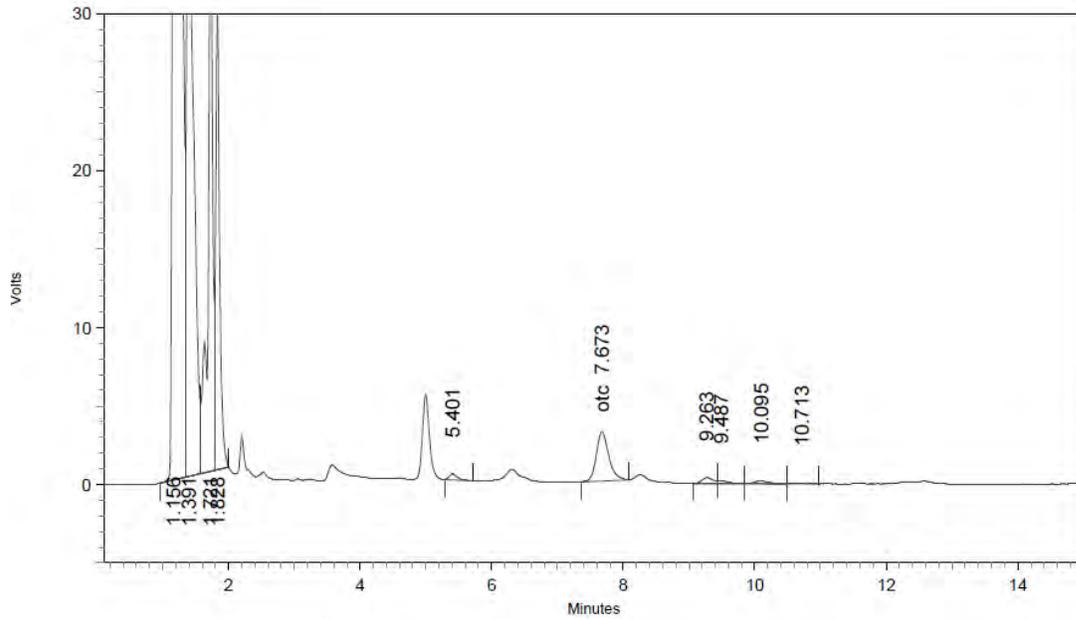


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.652	62579	8358.53



X-6 otc 9-Junio-2016

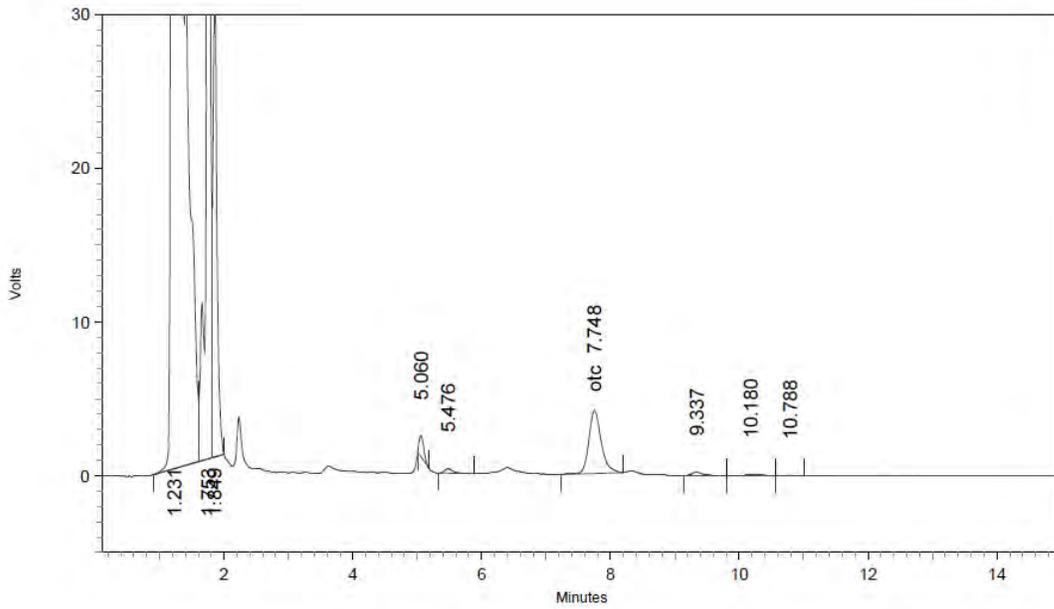


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.673	41204	8208.15



X-7 otc 9-Junio-2016

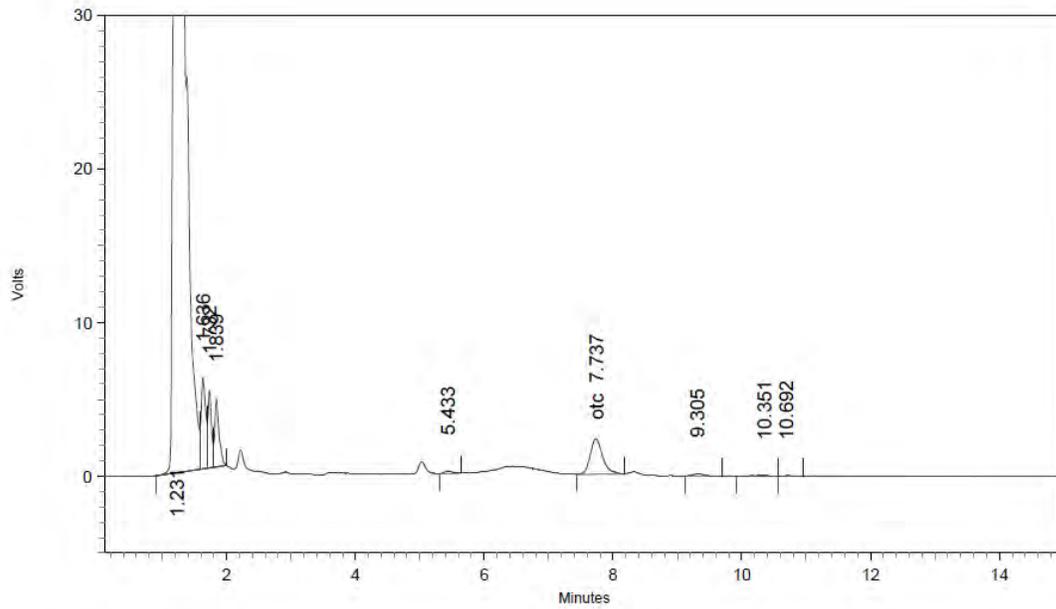


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.748	54330	8256.54



X-8 otc 9-Junio-2016

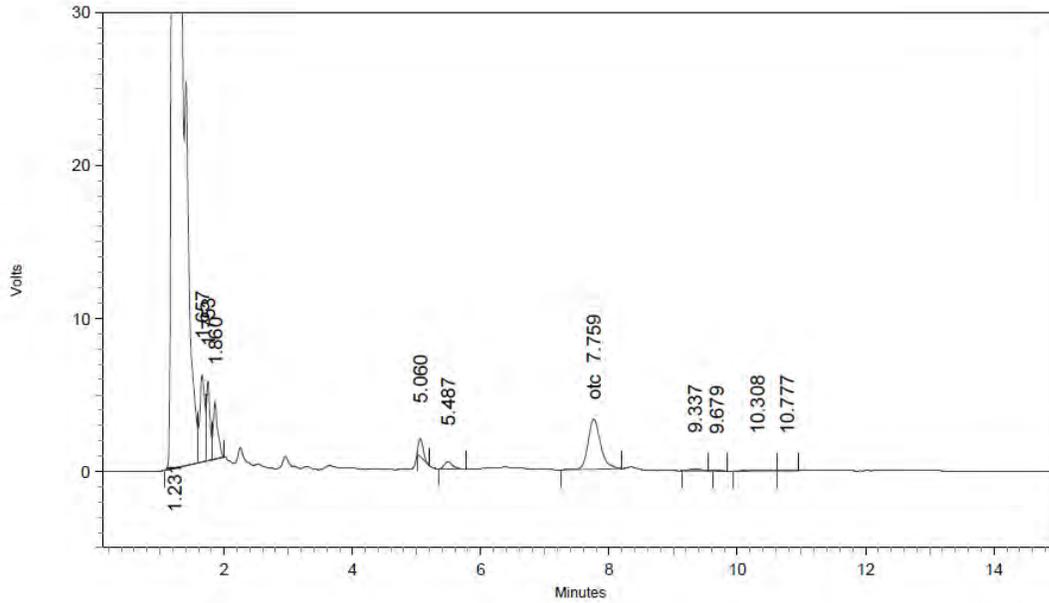


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.737	30784	7879.02



X-9 otc 9-Junio-2016

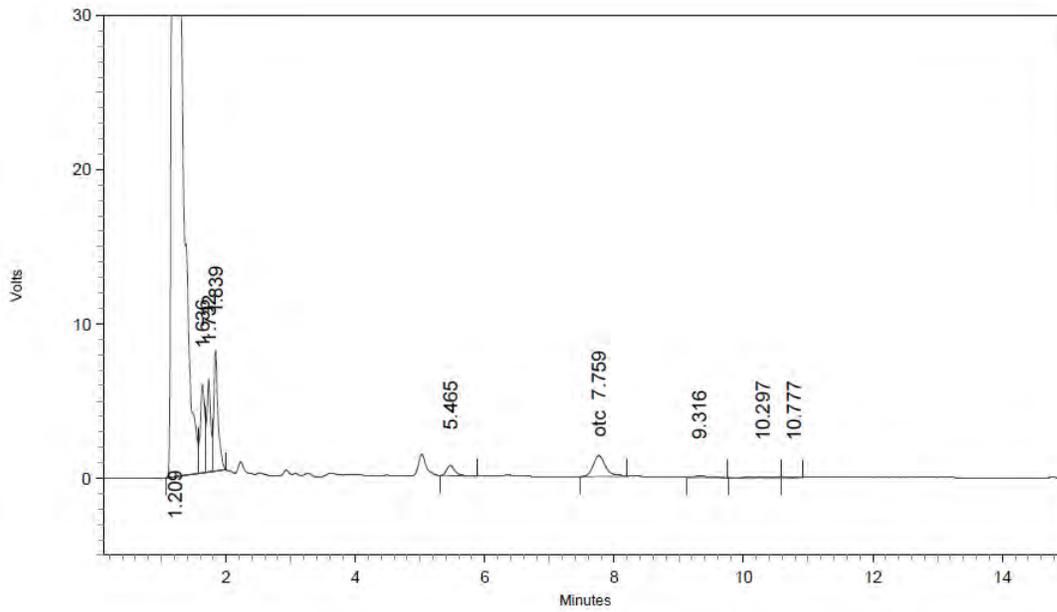


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.759	43969	8065.67



X-10 otc 9-Junio-2016

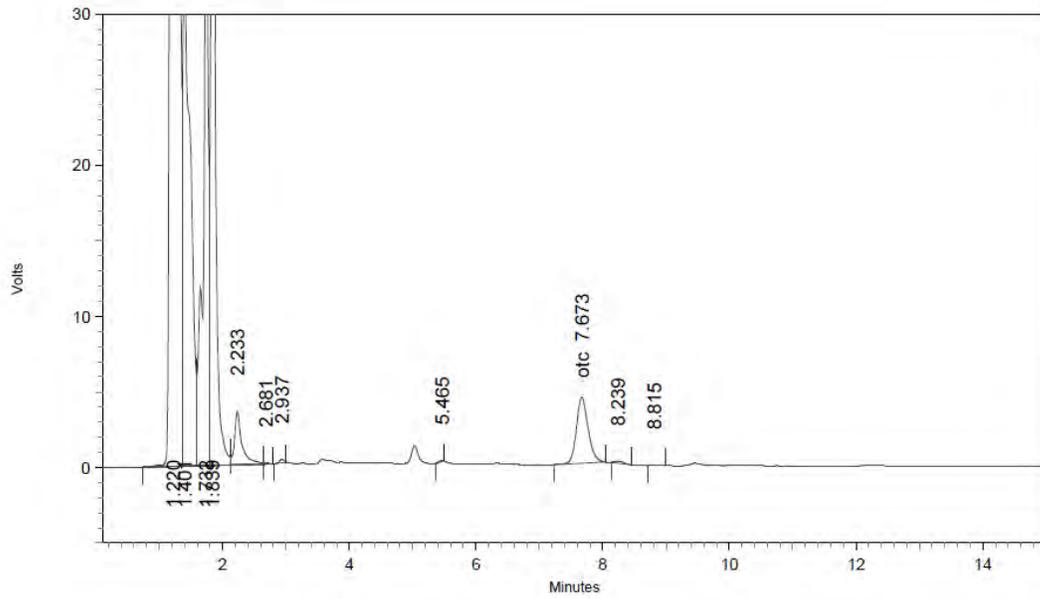


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.759	18187	8212.35



V-11 otc 14-Junio-2016

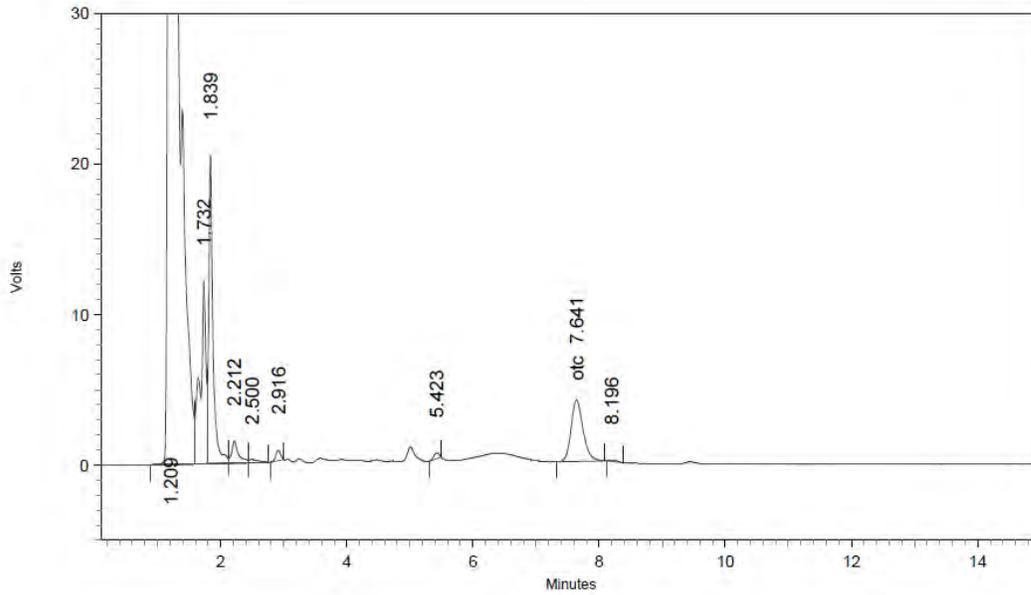


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.673	56223	8336.29



V-12 otc 14-Junio-2016

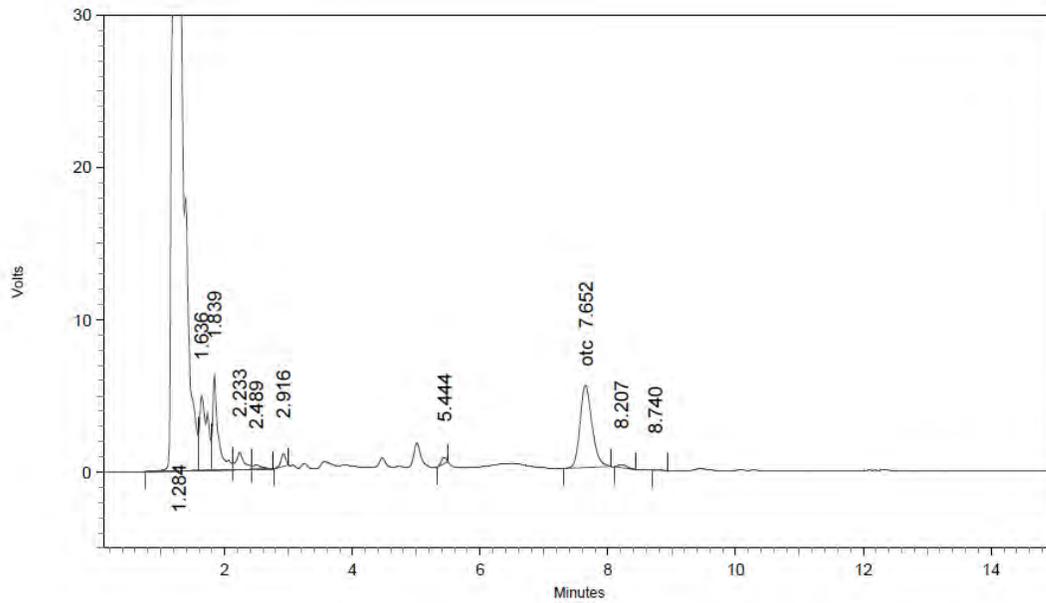


2: 355 nm. 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.641	53819	7881.99



V-13 otc 14-Junio-2016

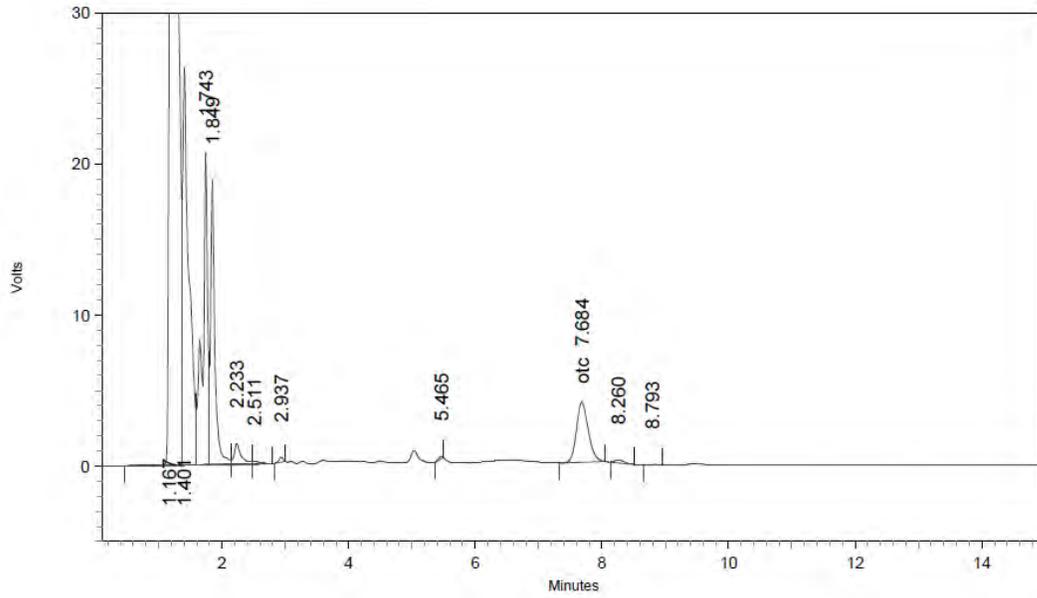


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.652	70299	7899.18



V-14 otc 14-Junio-2016

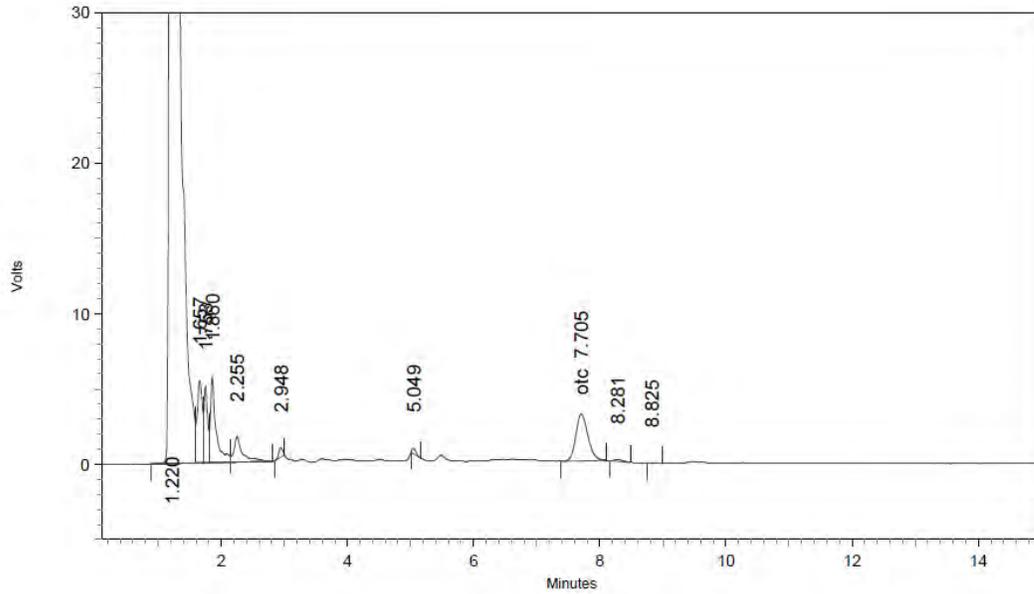


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.684	51446	8054.02



V-15 otc 14-Junio-2016

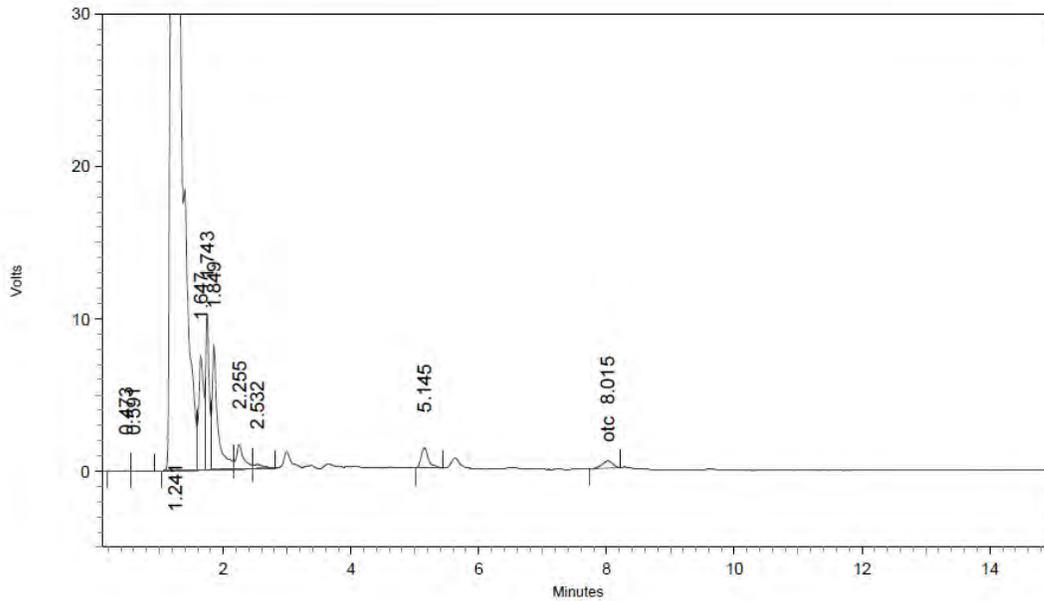


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.705	41661	7480.96



W-11 otc 14-Junio-2016

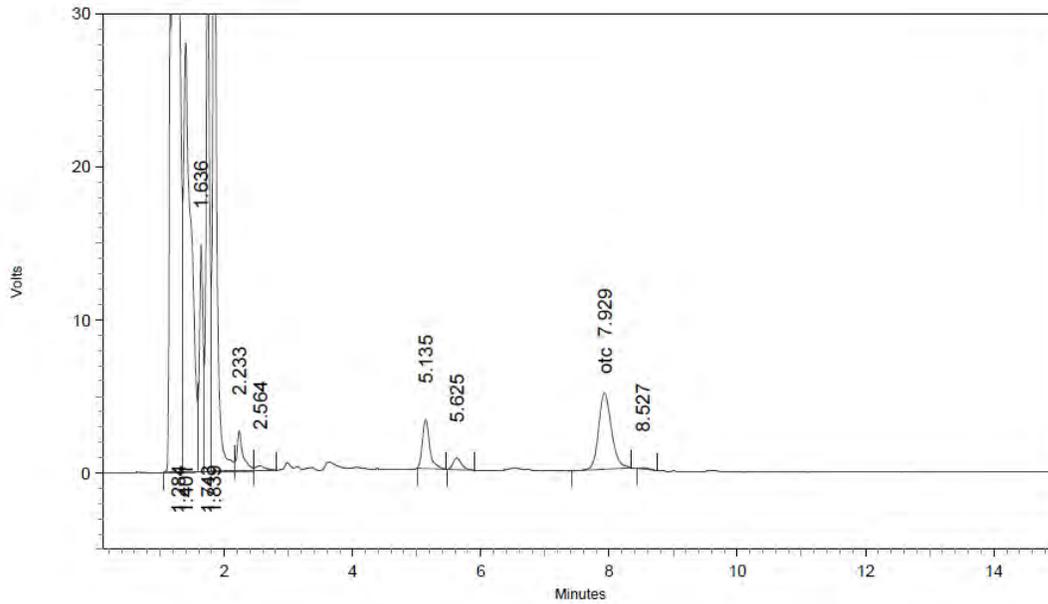


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.015	5395	10319.13



W-12 otc 14-Junio-2016

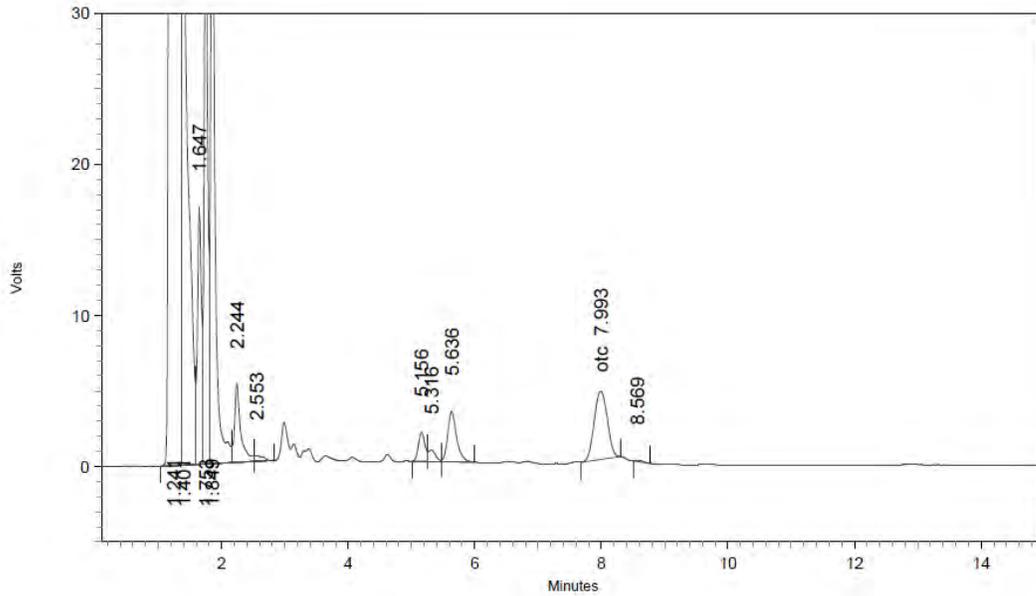


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.929	69265	7450.88



W-13 otc 14-Junio-2016

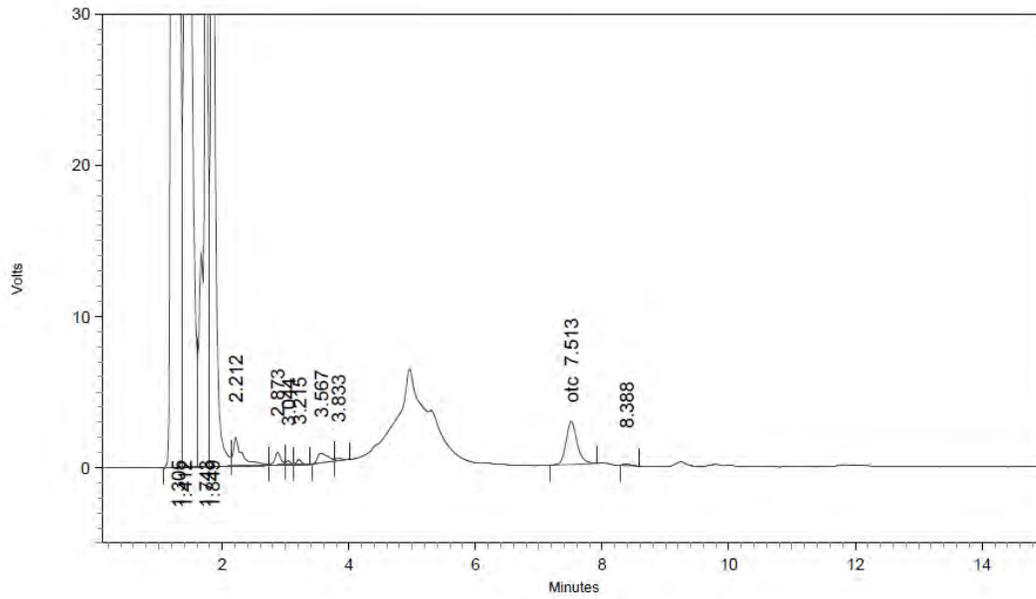


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.993	64968	6886.53



W-14 otc 15-junio-2016

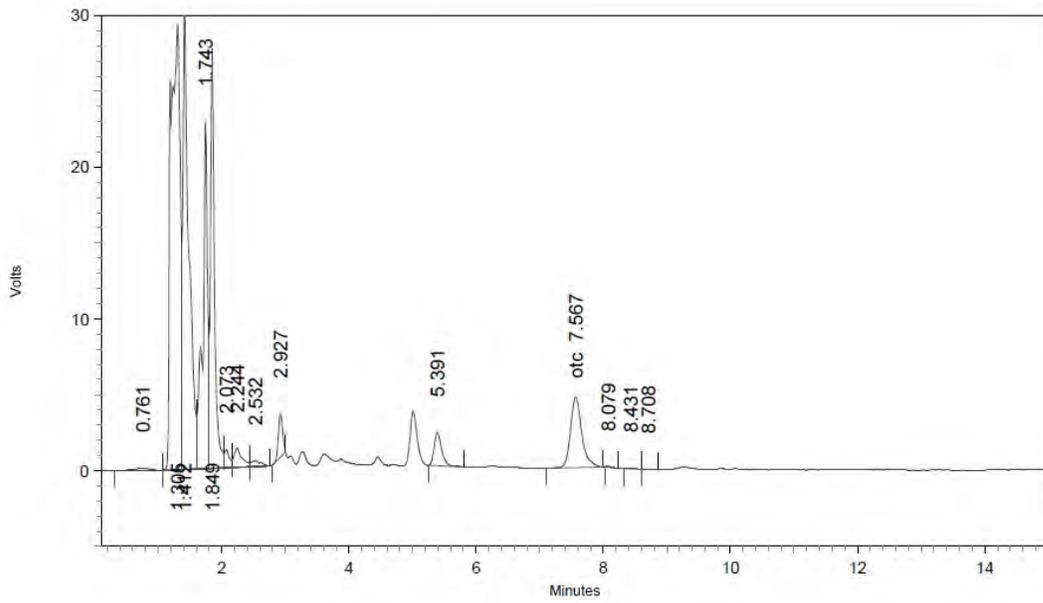


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.513	34377	9112.05



W-15 otc 15-junio-2016

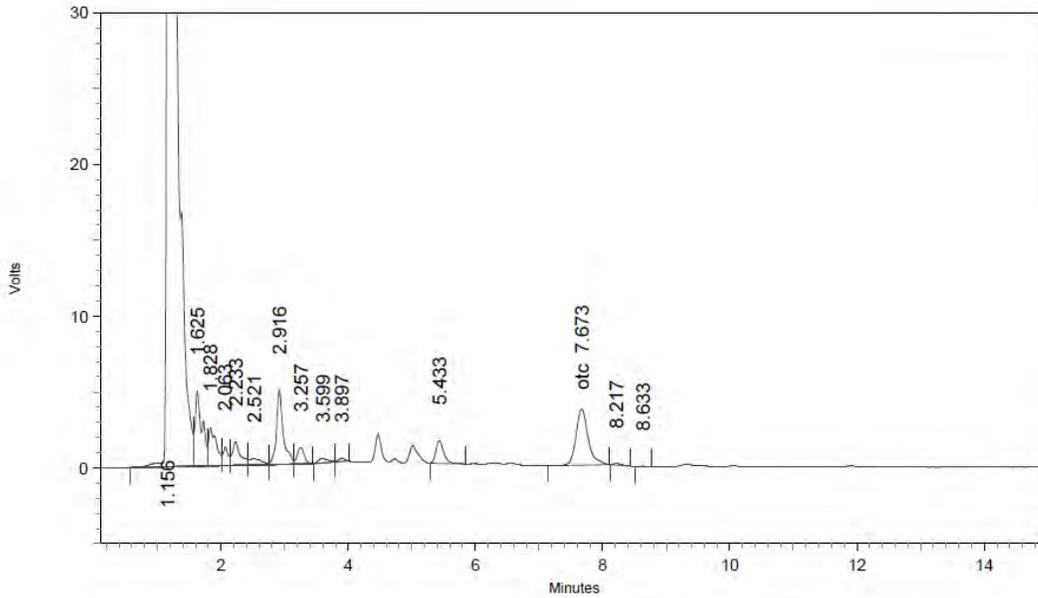


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.567	56947	9382.16



X-11 otc 15-junio-2016

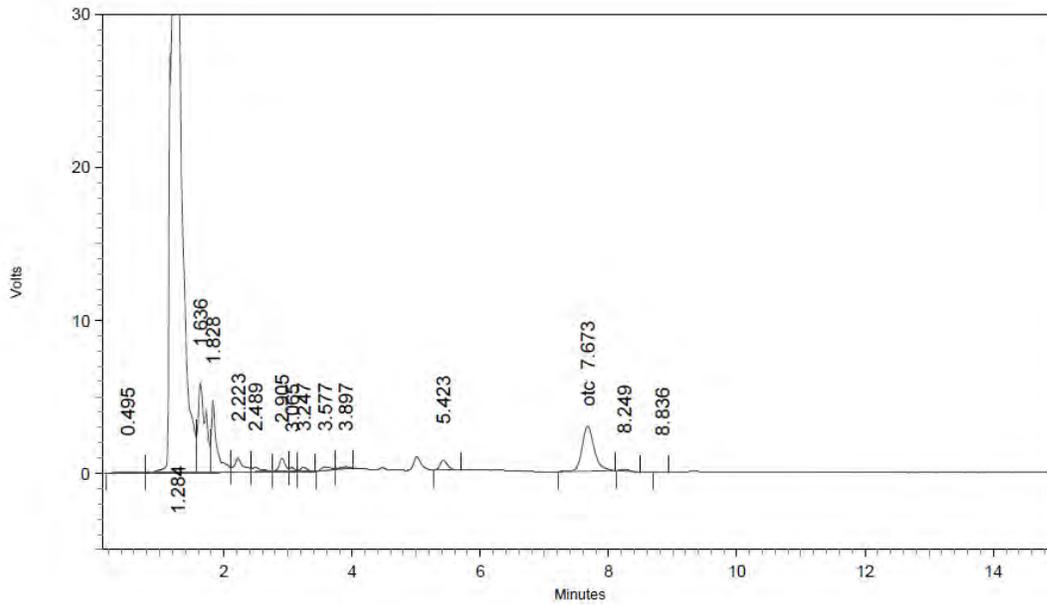


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.673	49058	8271.44



X-12 otc 15-junio-2016

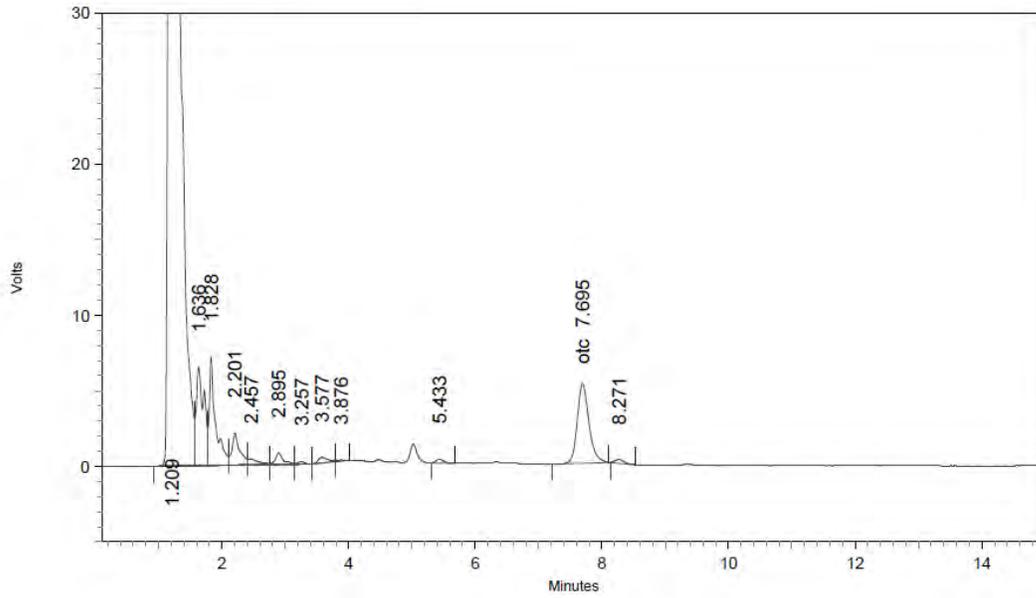


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.673	38519	8427.21



X-13 otc 15-junio-2016

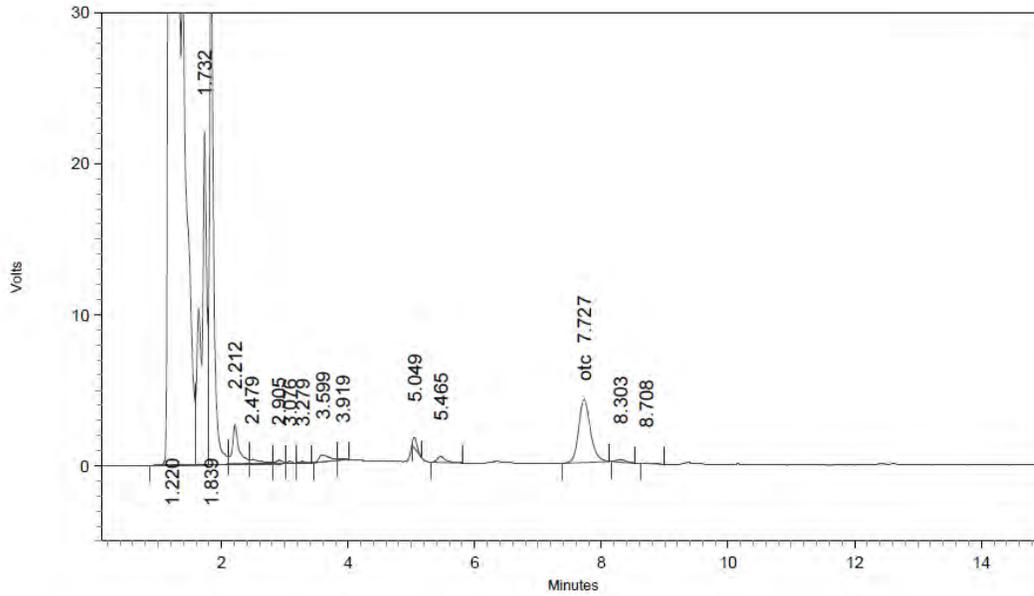


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.695	67772	8474.73



X-14 tc 15-junio-2016

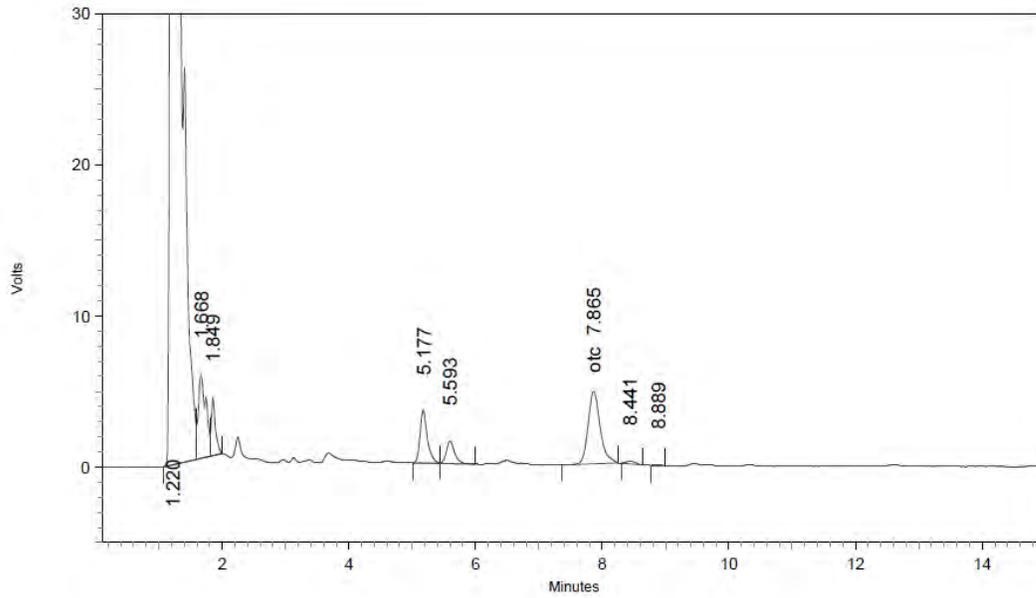


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.727	54028	8397.27



X-15 otc 15-junio-2016

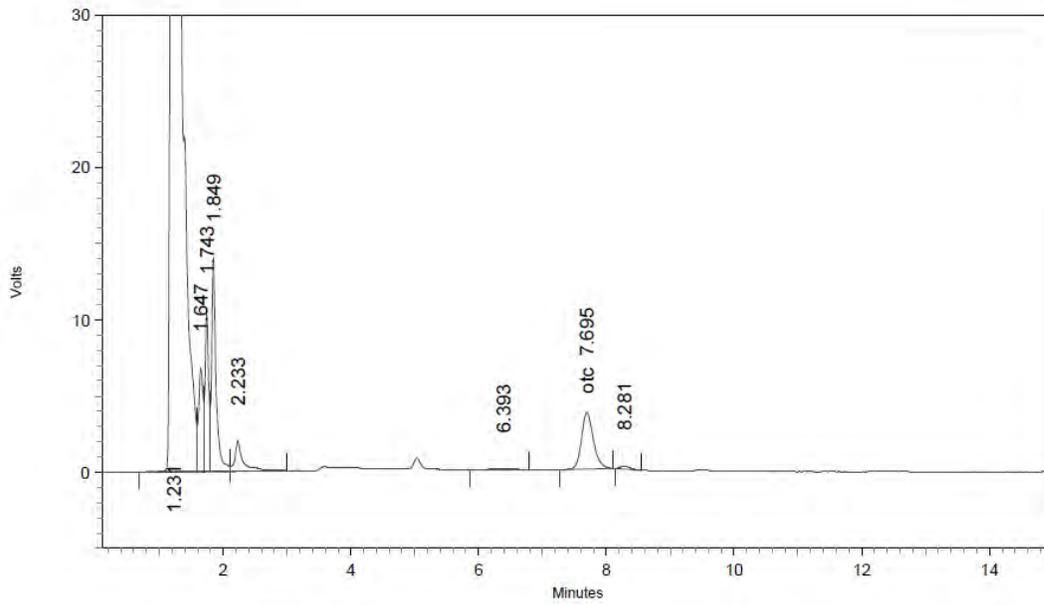


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.865	63318	8533.67



V-16 otc 14-Junio-2016

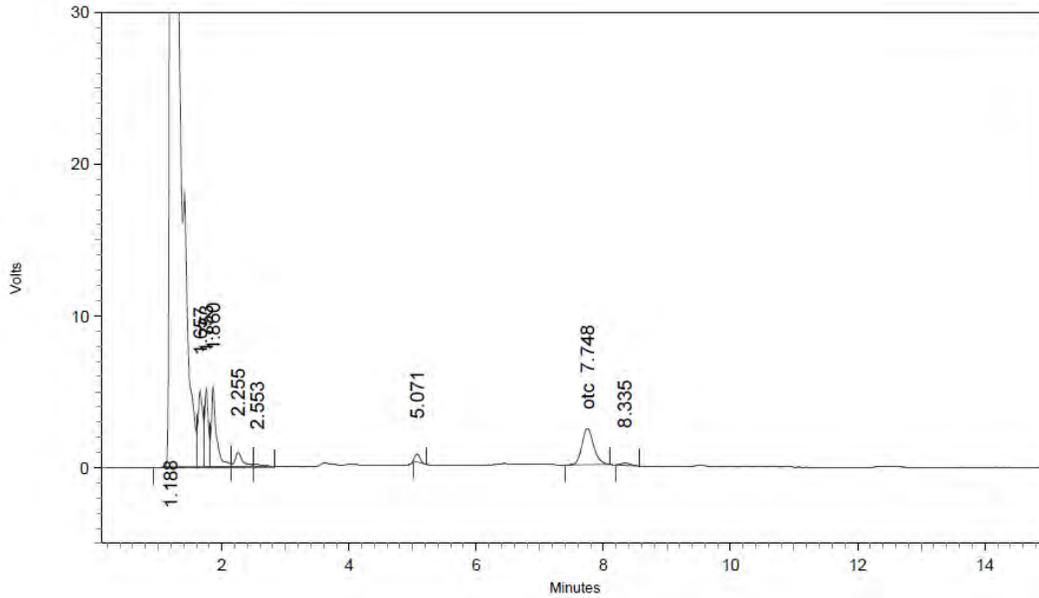


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.695	48132	8313.39



V-18 otc 14-Junio-2016

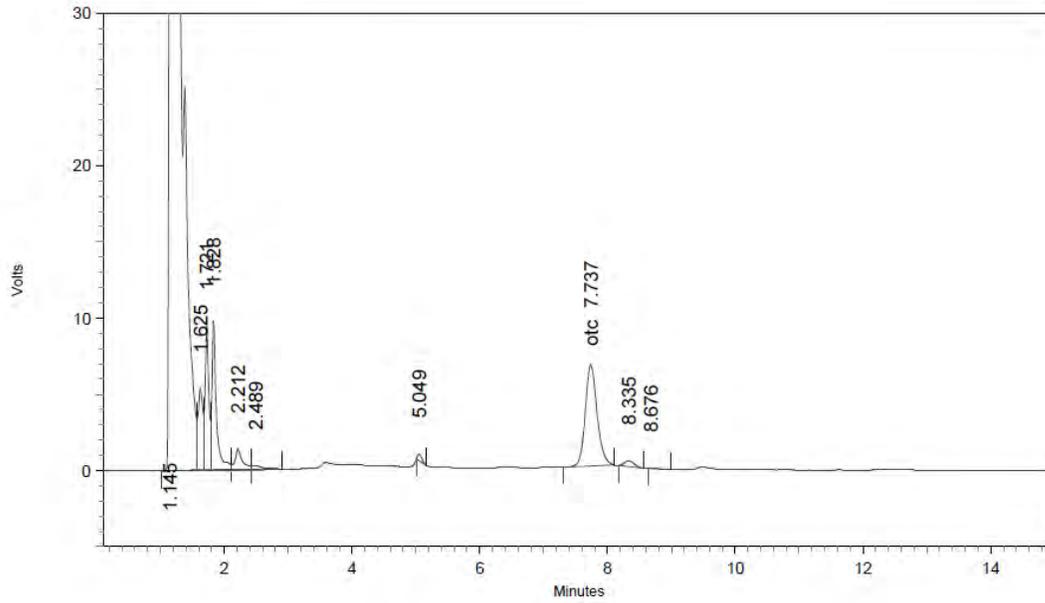


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.748	30715	8292.65



V-19 otc 14-Junio-2016

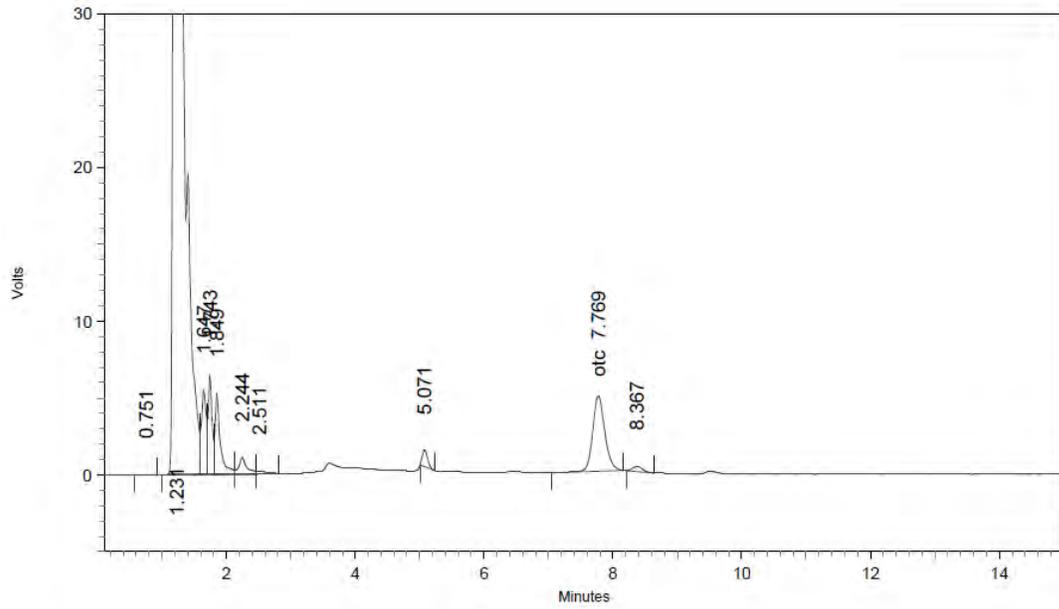


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.737	85180	8397.58



V-20 otc 14-Junio-2016

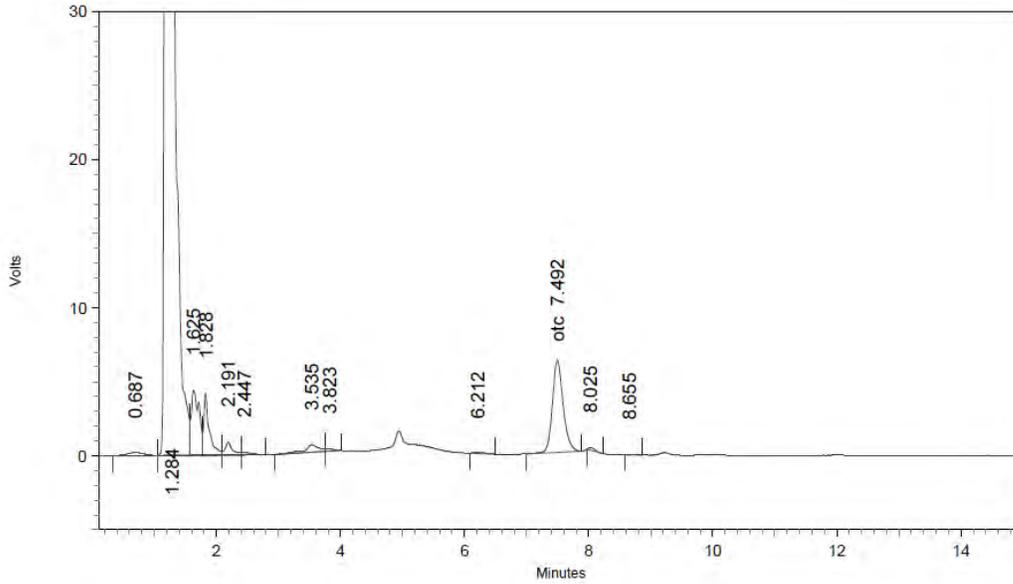


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.769	64146	8296.00



W-16 otc 15-junio-2016

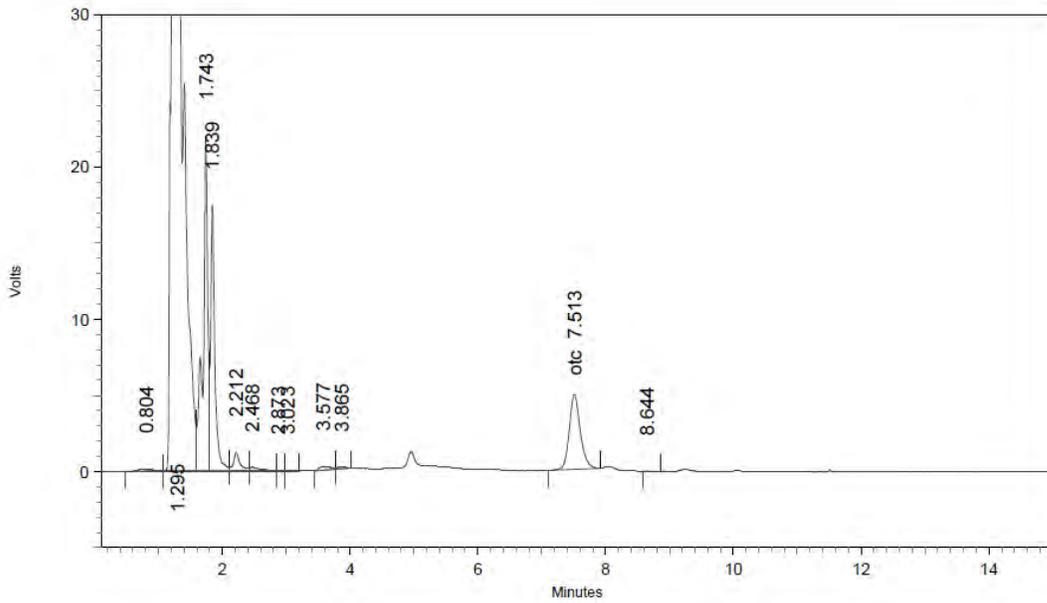


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.492	74861	9251.11



W-17 otc 15-junio-2016

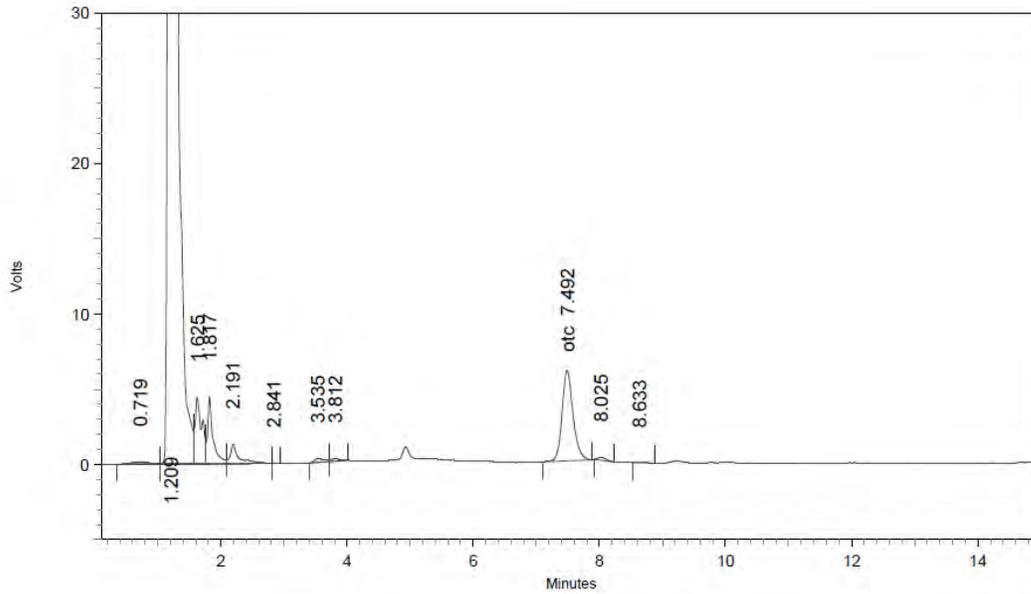


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.513	58977	9121.95



W-18 otc 15-junio-2016

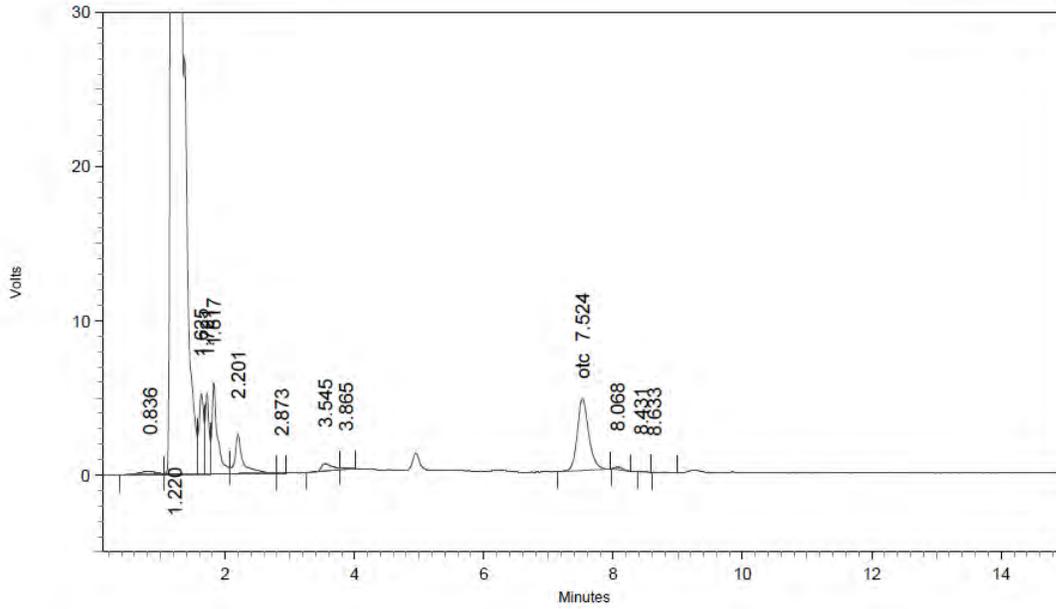


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.492	72266	9087.34



W-19 otc 15-junio-2016

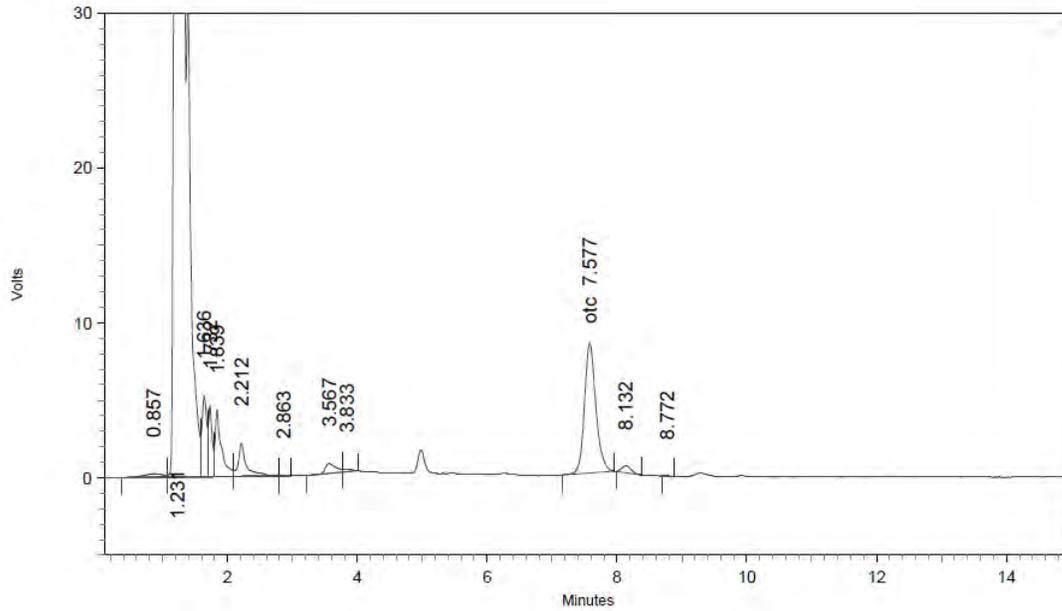


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.524	57206	9014.09



W-20 otc 15-junio-2016

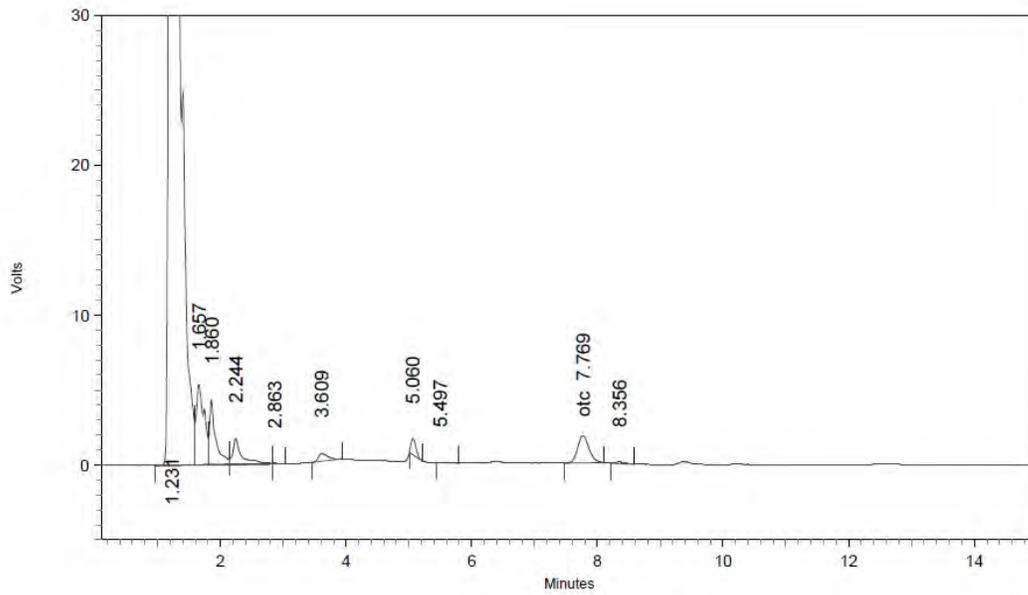


2: 355 nm. 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.577	102081	8949.60



X-16 otc 15-junio-2016

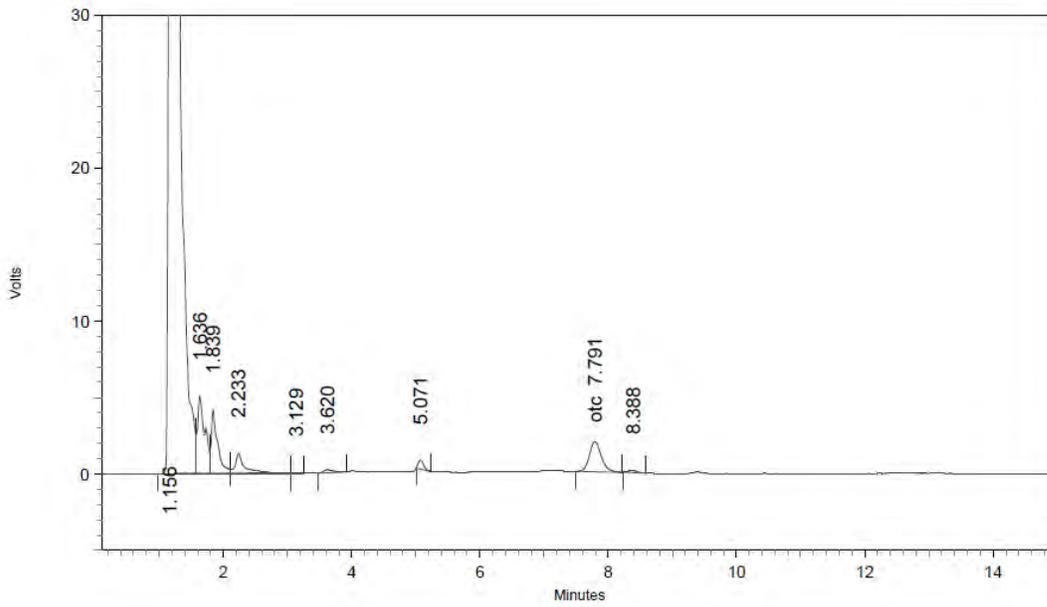


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.769	23140	8629.55



X-17 otc 15-junio-2016

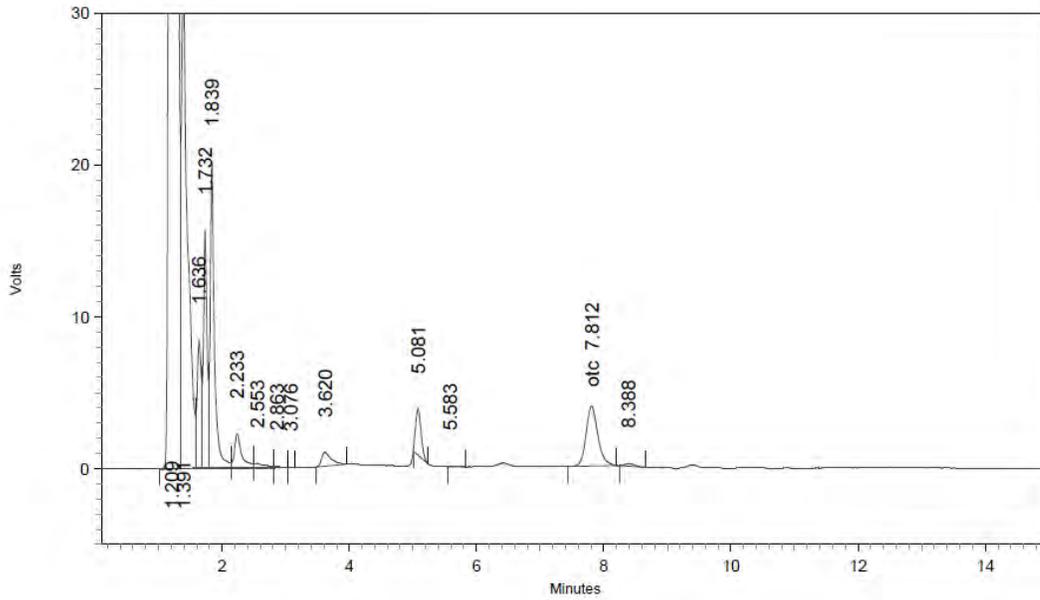


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.791	25520	8639.95



X-18 otc 15-junio-2016

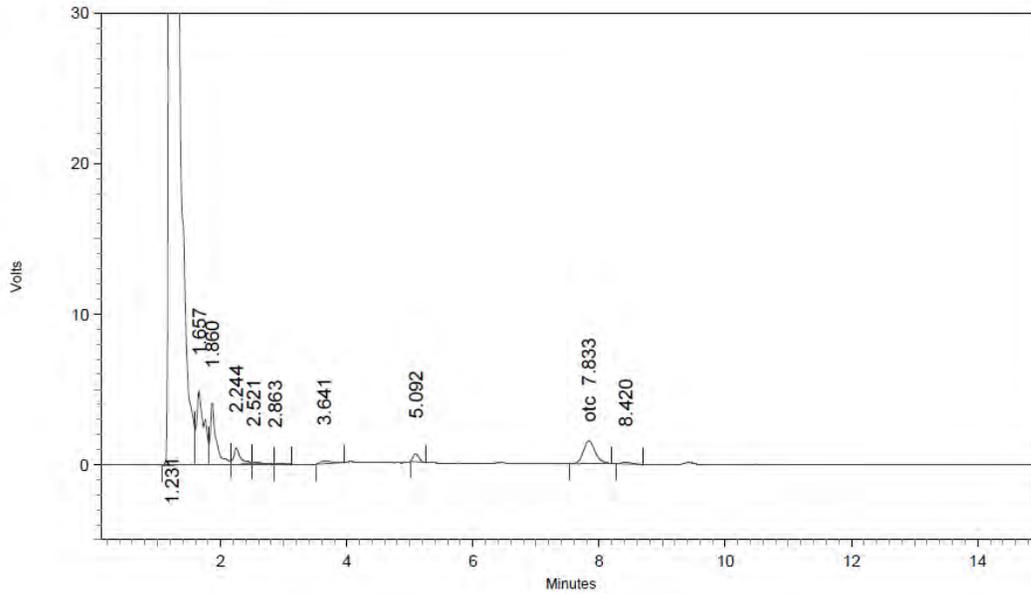


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.812	50940	8776.20



X-19 otc 15-junio-2016

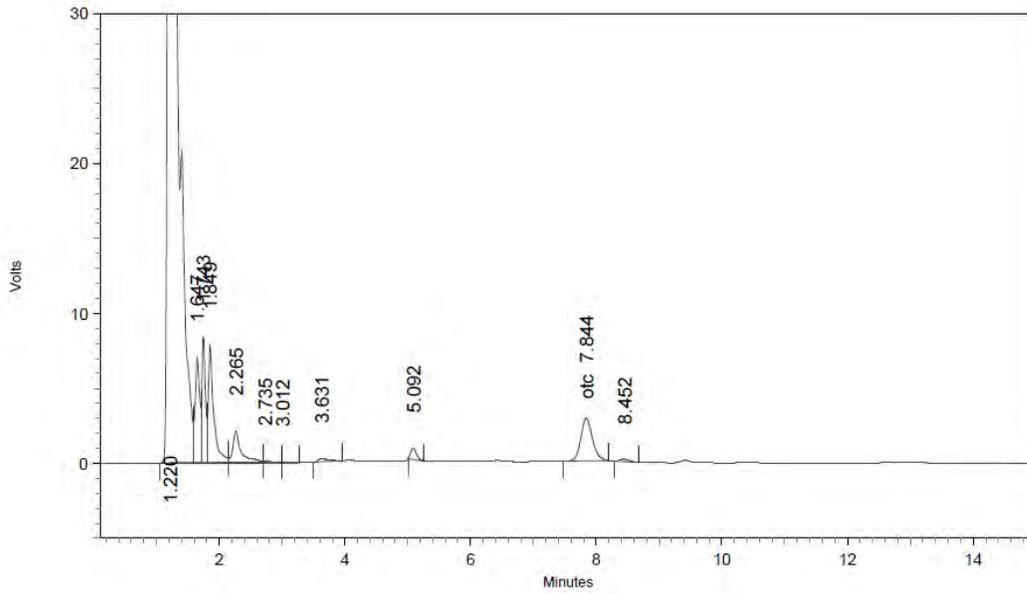


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.833	19798	8540.97



X-20 otc 15-junio-2016



2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.844	36840	8505.14





Anexo 8.17. Resultados de OTC en piel-m3sculo de Salar para el c3lculo de la curva de depleci3n de Terrivet en condiciones controladas

Fecha	Nº Mx	Días	3rea	conc obtenida
an3lisis		post-inyecci3n		ng/g
06/07/2016	Y-1	29	84.868	671,7
06/07/2016	Y-2	29	125.260	958,6
06/07/2016	Y-3	29	52.870	420,8
06/07/2016	Y-4	29	106.623	809,4
06/07/2016	Y-5	29	93.393	726,5
06/07/2016	Z-1	29	88.751	701,1
06/07/2016	Z-2	29	65.777	505,1
06/07/2016	Z-3	29	186.264	1423,9
06/07/2016	Z-4	29	139.987	1094,5
06/07/2016	Z-5	29	104.028	837,1
07/07/2016	ZZ-1	29	253.382	1963,9
07/07/2016	ZZ-2	29	169.931	1366,2
07/07/2016	ZZ-3	29	236.324	1800,4
07/07/2016	ZZ-4	29	50.843	385,4
07/07/2016	ZZ-5	29	106.354	839,1
16/06/2016	Y-6	38	65.460	519,5
16/06/2016	Y-7	38	65.725	508,6
16/06/2016	Y-8	38	96.920	758,5
16/06/2016	Y-9	38	41.006	328,4
16/06/2016	Y-10	38	223.726	1710,8
16/06/2016	Z-6	38	94.169	734,0
16/06/2016	Z-7	38	33.675	257,4
23/06/2016	Z-8	38	87.014	699,7
23/06/2016	Z-9	38	135.055	1045,7
23/06/2016	Z-10	38	116.345	930,9
07/07/2016	ZZ-6	38	200.026	1549,9
07/07/2016	ZZ-7	38	128.557	991,4
07/07/2016	ZZ-8	38	173.800	1383,6

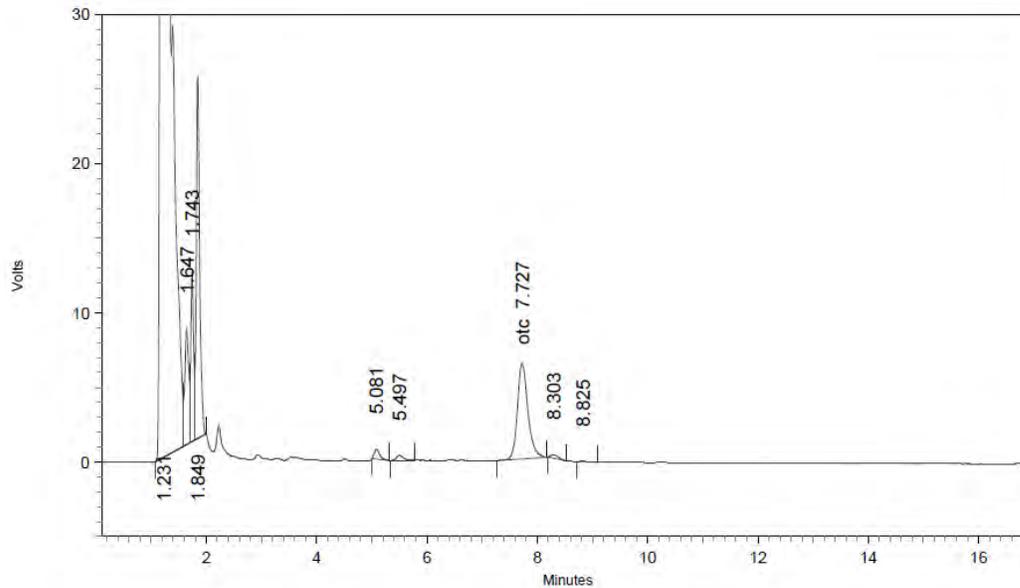


07/07/2016	ZZ-9	38	64.126	495,2
07/07/2016	ZZ-10	38	87.956	668,6
12/07/2016	Y-11	44	60.791	466,6
12/07/2016	Y-12	44	59.570	467,0
12/07/2016	Y-13	44	58.545	470,0
12/07/2016	Y-14	44	8.378	63,3
12/07/2016	Y-15	44	74.193	586,9
06/07/2016	Z-11	44	55.772	435,4
06/07/2016	Z-12	44	43.135	332,9
06/07/2016	Z-13	44	63.756	505,0
06/07/2016	Z-14	44	43.360	337,9
07/07/2016	Z-15	44	22.825	176,4
12/07/2016	ZZ-11	44	88.551	675,7
12/07/2016	ZZ-12	44	8.260	61,4
12/07/2016	ZZ-13	44	46.912	360,9
12/07/2016	ZZ-14	44	67.524	525,6
12/07/2016	ZZ-15	44	53.032	403,7
06/07/2016	Y-16	55	28.556	217,1
06/07/2016	Y-17	55	13.652	104,1
06/07/2016	Y-18	55	39.650	302,3
06/07/2016	Y-19	55	39.558	308,7
06/07/2016	Y-20	55	39.491	311,8
07/07/2016	Z-16	55	45.064	352,7
07/07/2016	Z-17	55	63.459	488,2
07/07/2016	Z-18	55	46.814	371,6
07/07/2016	Z-19	55	20.662	157,6
07/07/2016	Z-20	55	61.313	465,3
07/07/2016	ZZ-16	55	48.347	366,4
07/07/2016	ZZ-17	55	35.202	278,2
07/07/2016	ZZ-18	55	25.985	201,1
07/07/2016	ZZ-19	55	89.051	680,8
07/07/2016	ZZ-20	55	50.871	387,1



Anexo 8.18. Cromatogramas de curva de depleción Terrivet Salar, condiciones controladas

Y-1 OTC 6-JULIO-2016

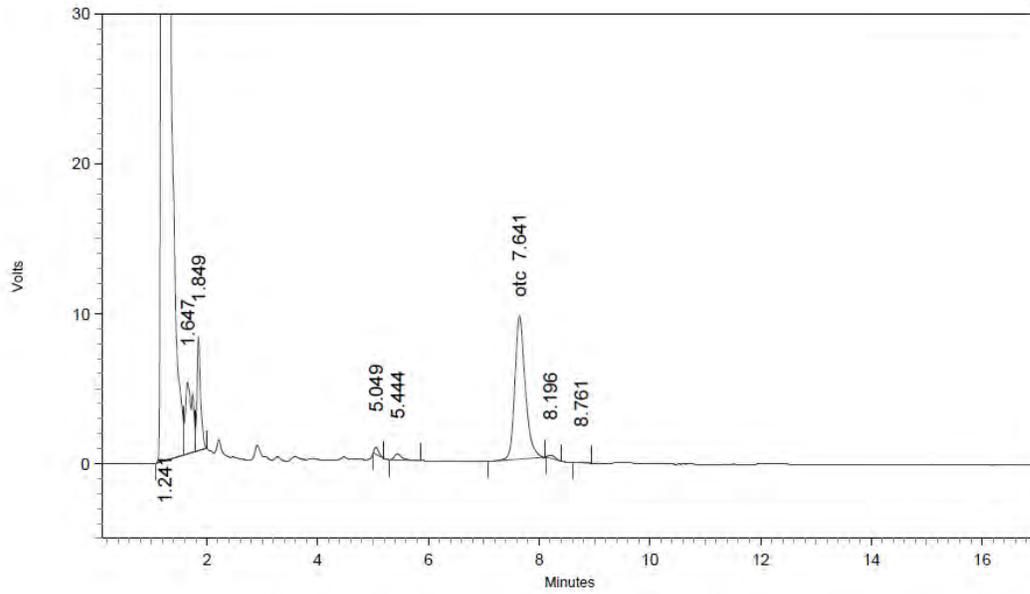


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.727	84868	8015.57



Y-2 OTC 6-JULIO-2016

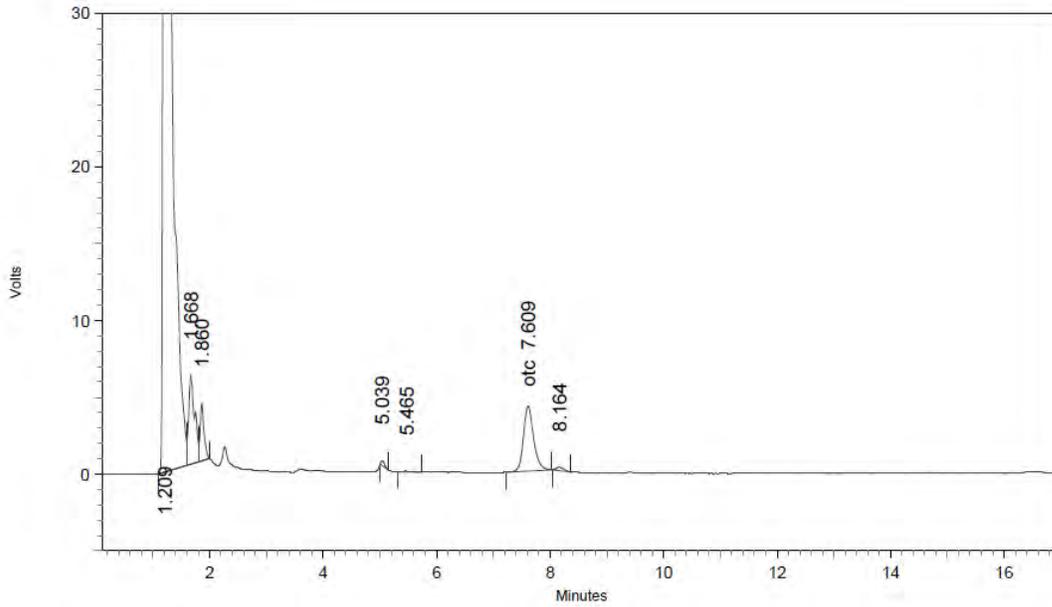


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.641	125260	8175.52



Y-3 OTC 6-JULIO-2016

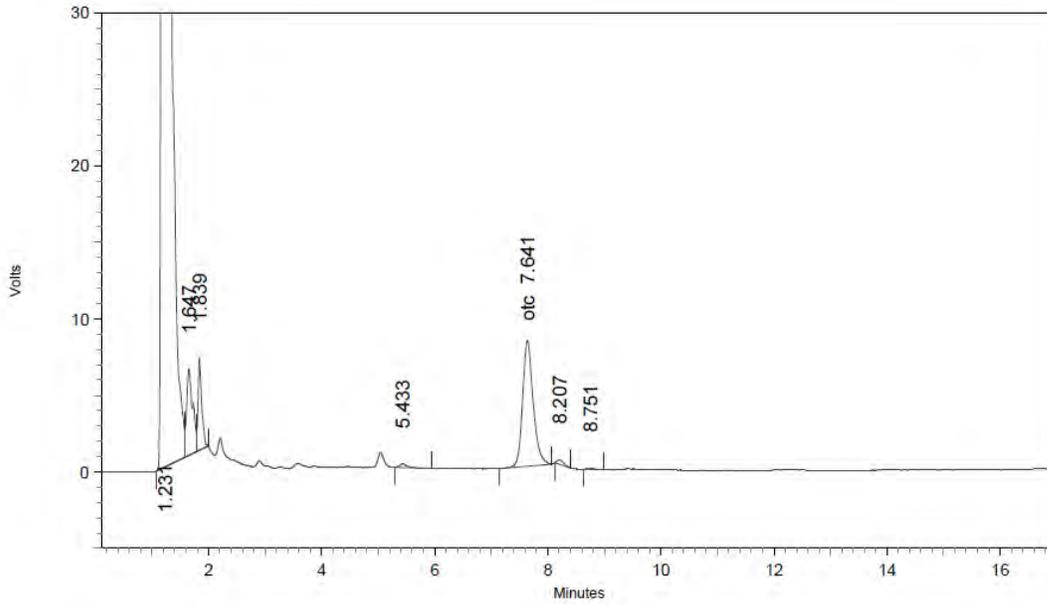


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.609	52870	8720.05



Y-4 OTC 6-JULIO-2016

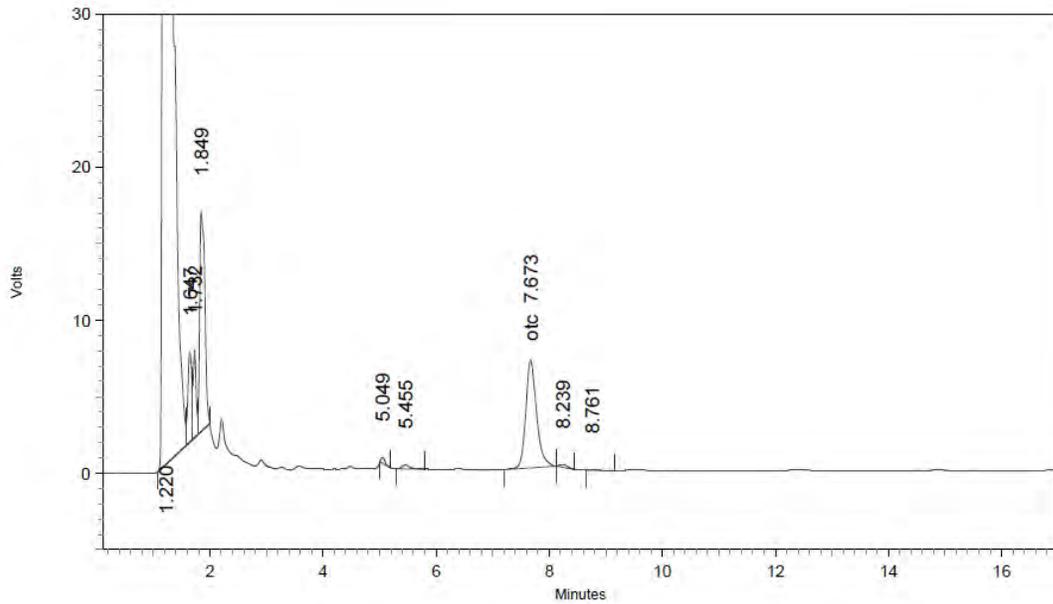


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.641	106623	8350.77



Y-5 OTC 6-JULIO-2016

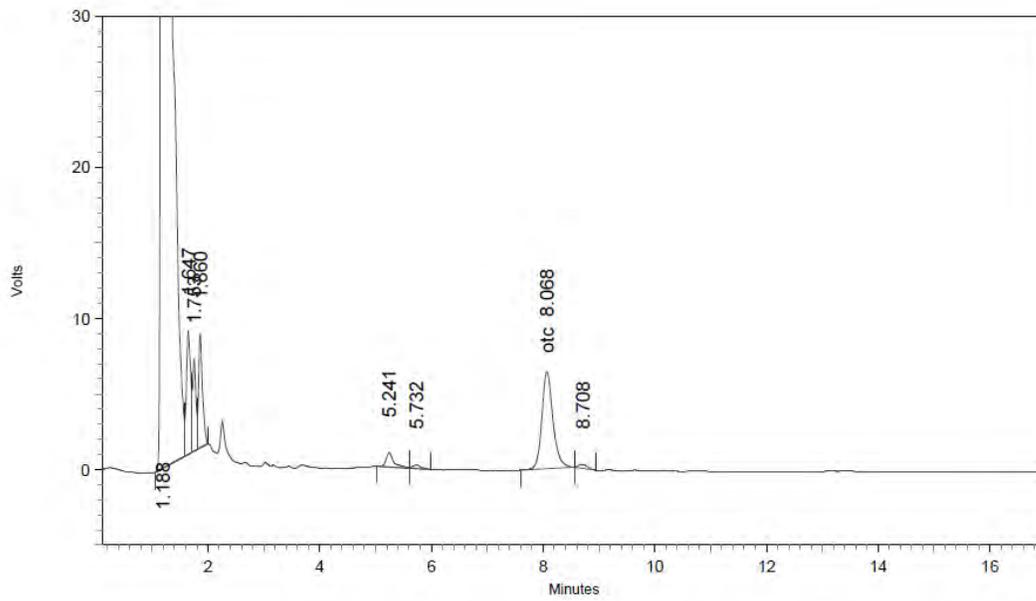


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.673	93393	7993.76



Z-1 OTC 6-JULIO-2016

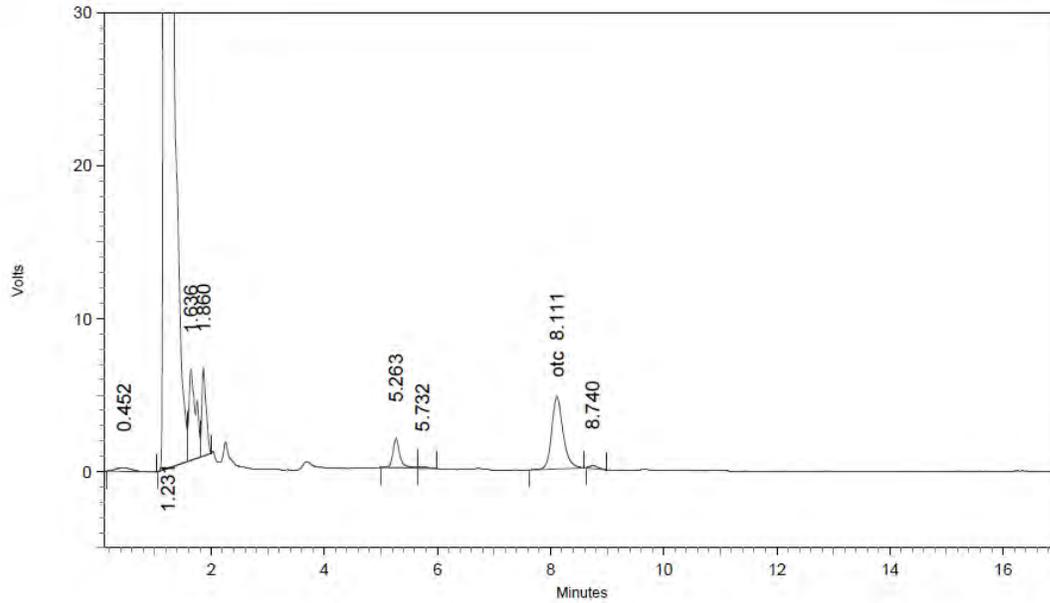


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.068	88751	8201.16



Z-2 OTC 6-JULIO-2016

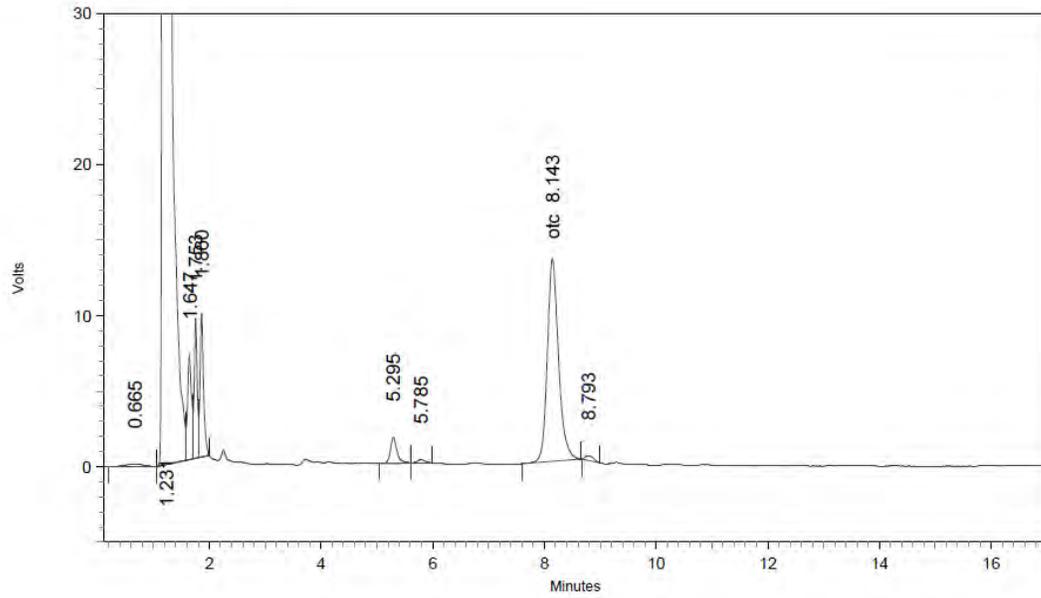


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.111	65777	8246.18



Z-3 OTC 6-JULIO-2016

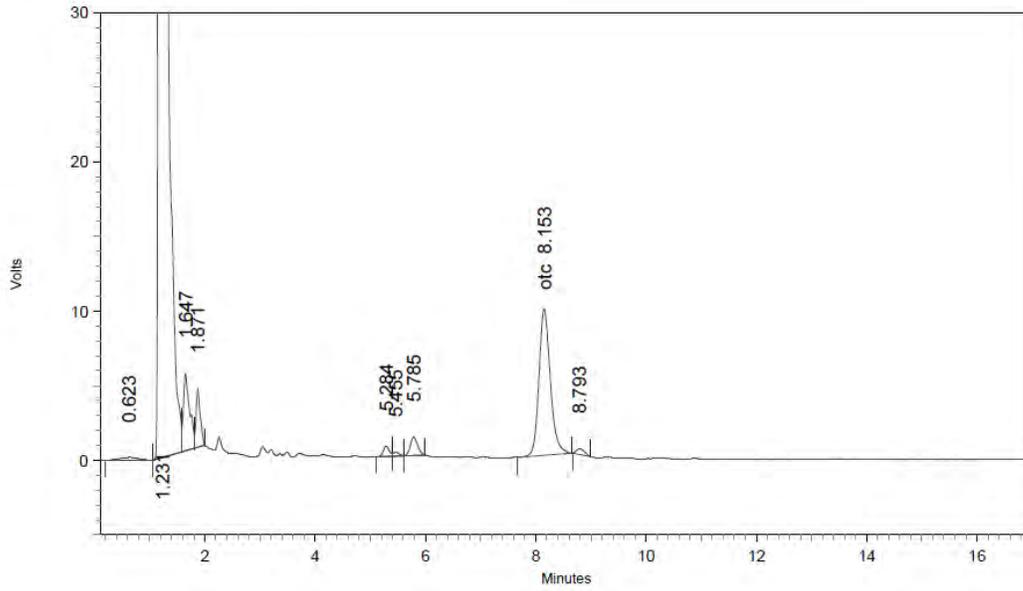


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.143	186264	8418.42



Z-4 OTC 6-JULIO-2016

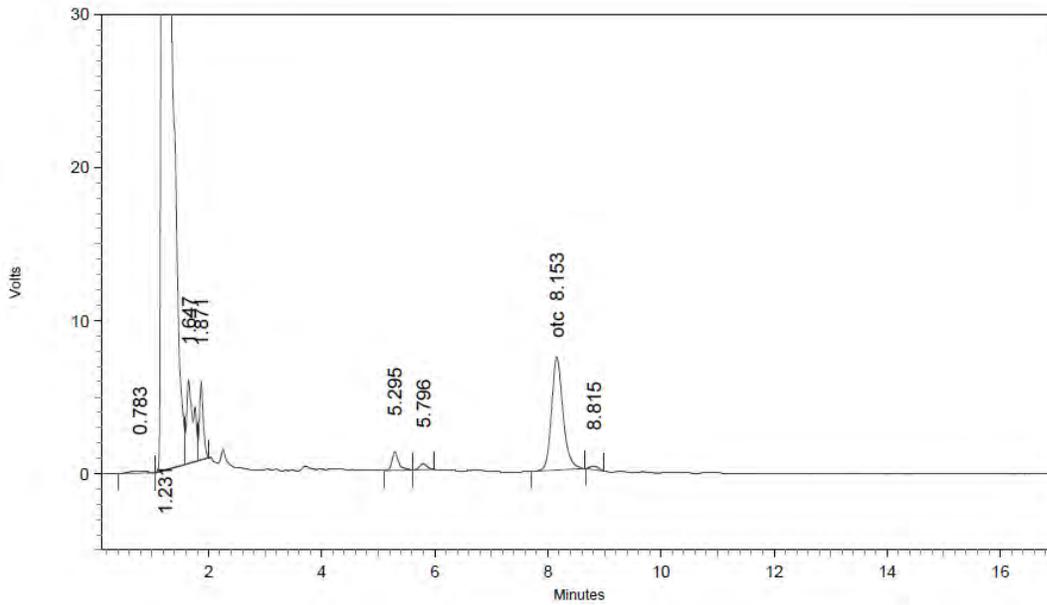


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.153	139987	7847.07



Z-5 OTC 6-JULIO-2016

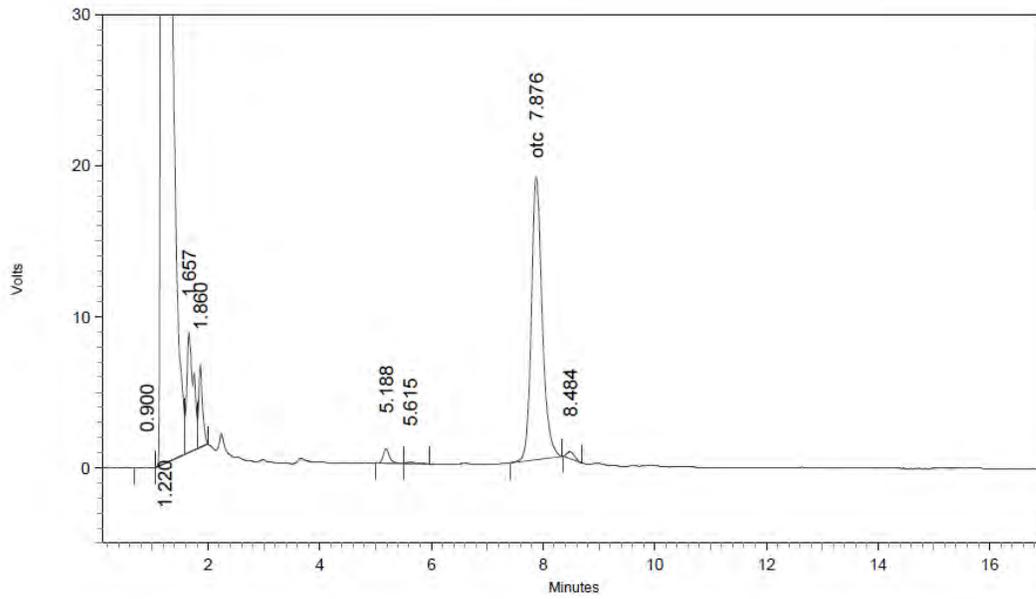


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.153	104028	8043.54



ZZ-1 OTC 7-JULIO-2016

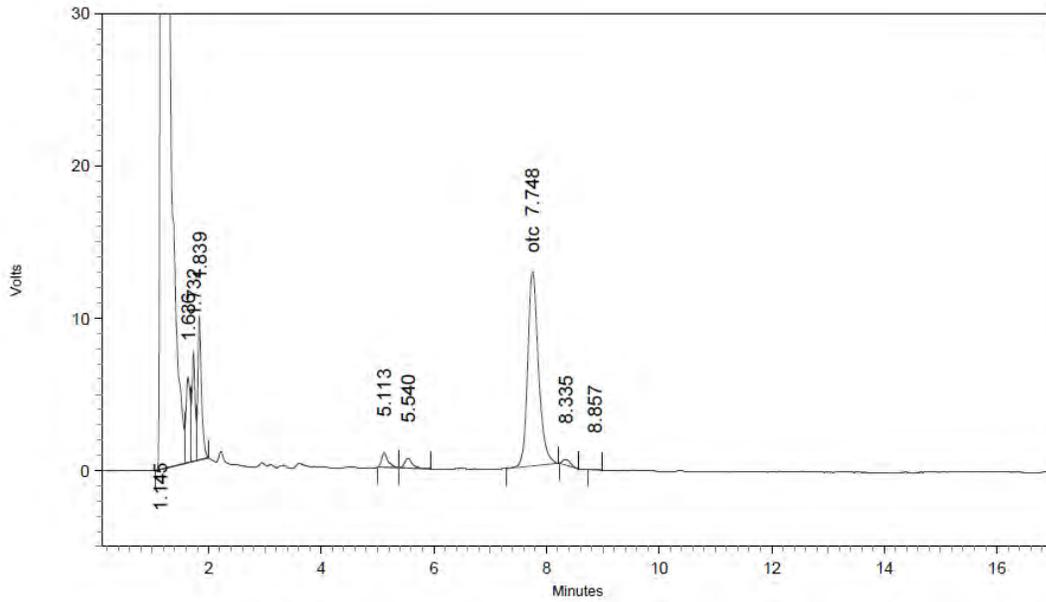


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.876	253382	8210.18



ZZ-2 OTC 7-JULIO-2016

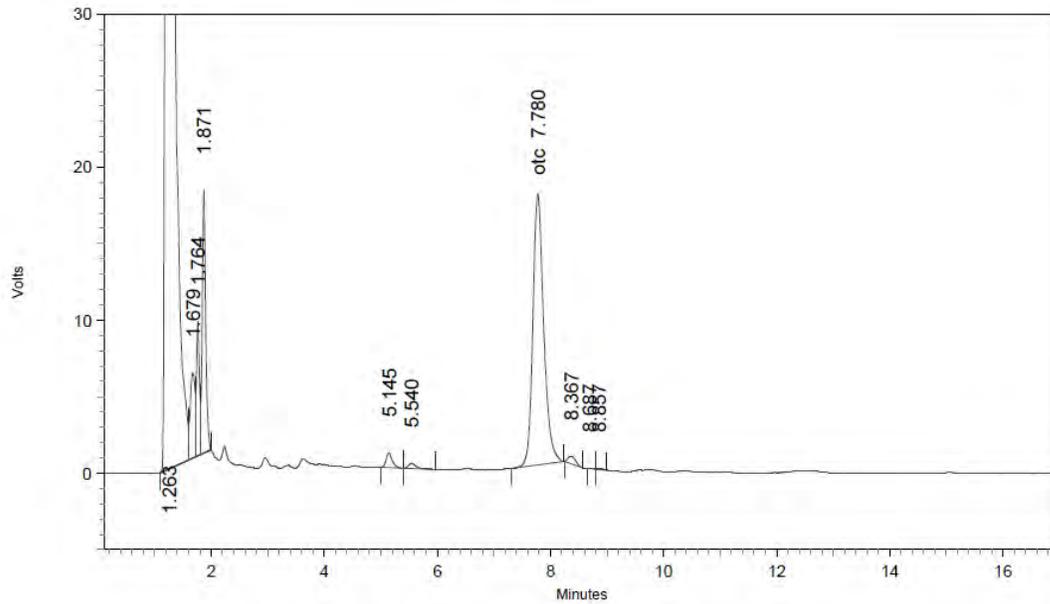


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.748	169931	8119.98



ZZ-3 OTC 7-JULIO-2016

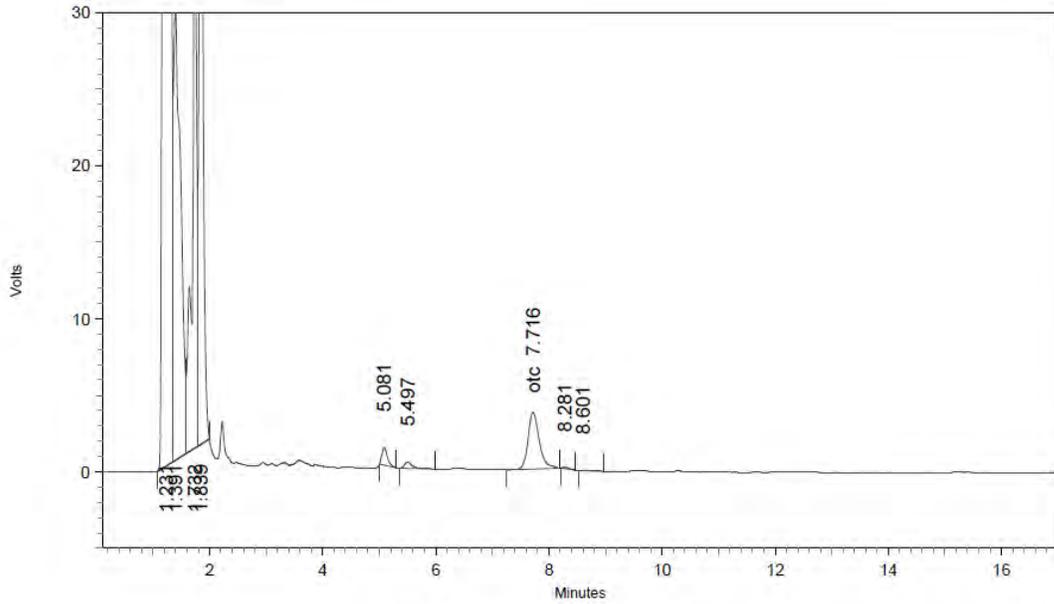


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.780	236324	8179.26



ZZ-4 OTC 7-JULIO-2016

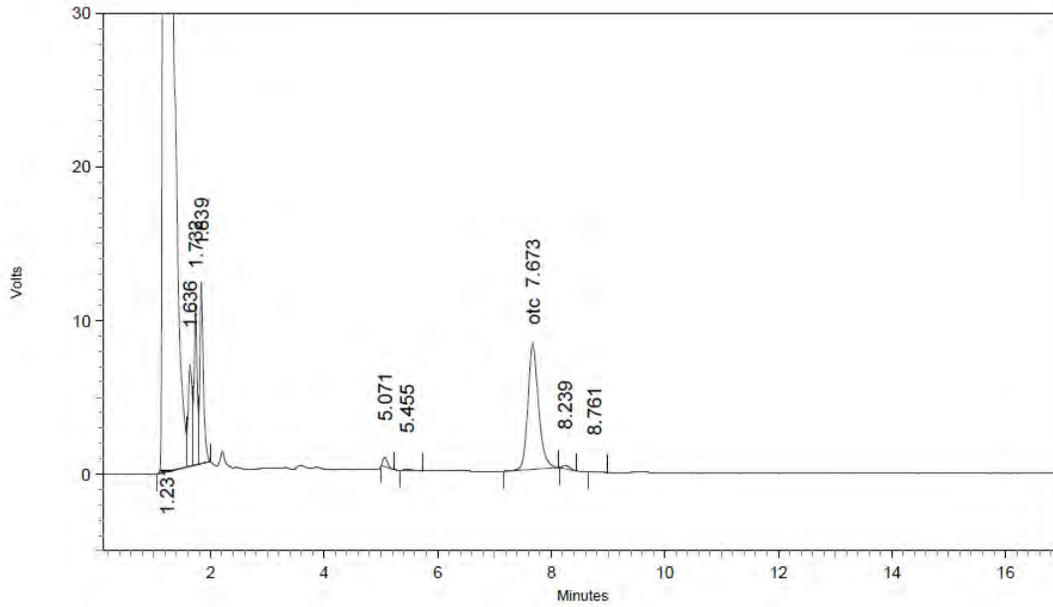


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.716	50843	7669.01



ZZ-5 OTC 7-JULIO-2016

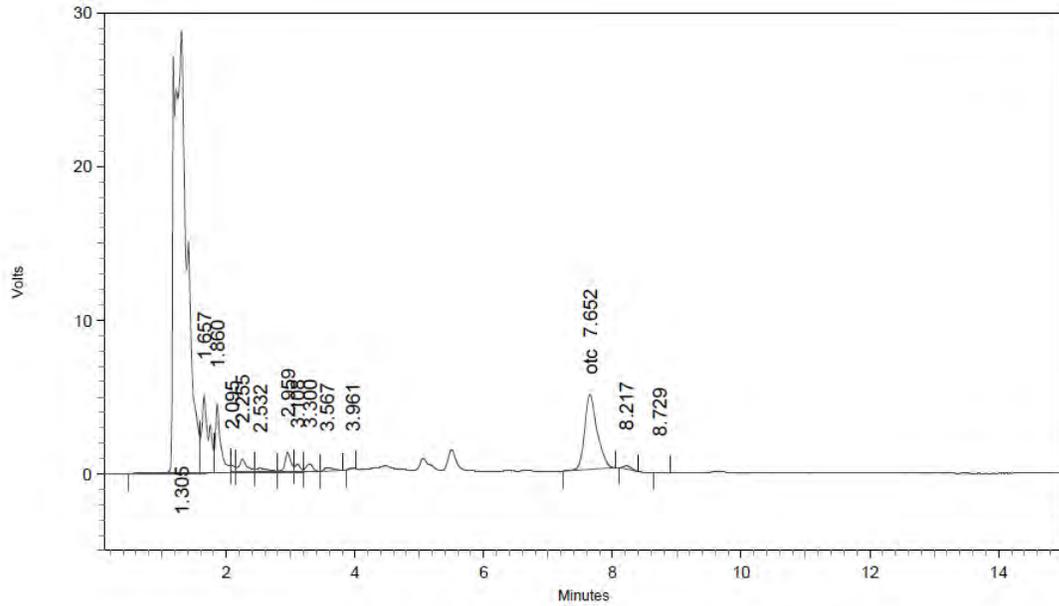


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.673	106354	8205.37



Y-6 OTC 16 junio-2016

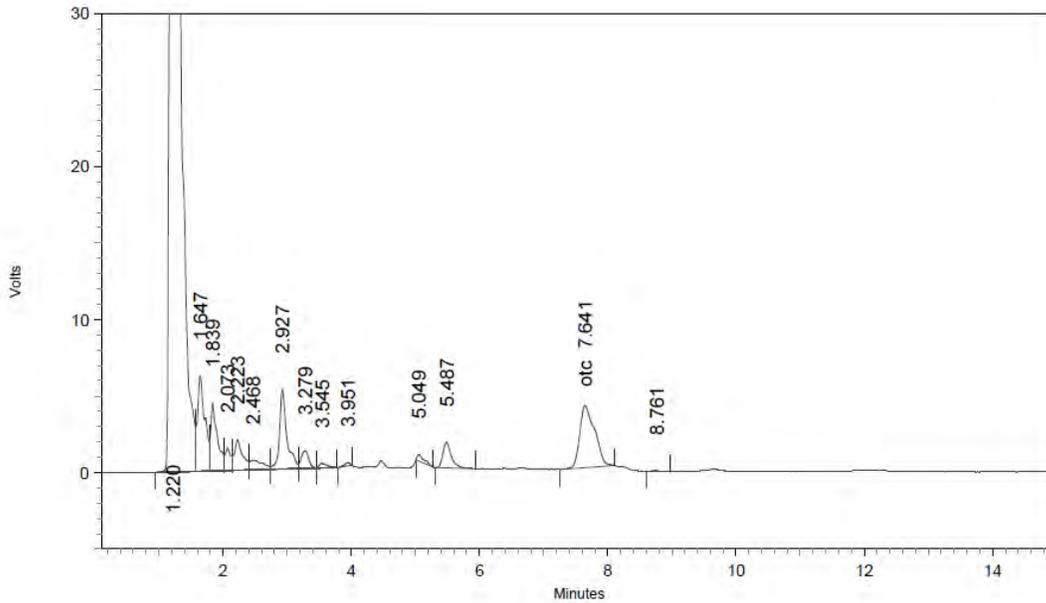


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.652	65460	7628.61



Y-7 OTC 16 junio-2016

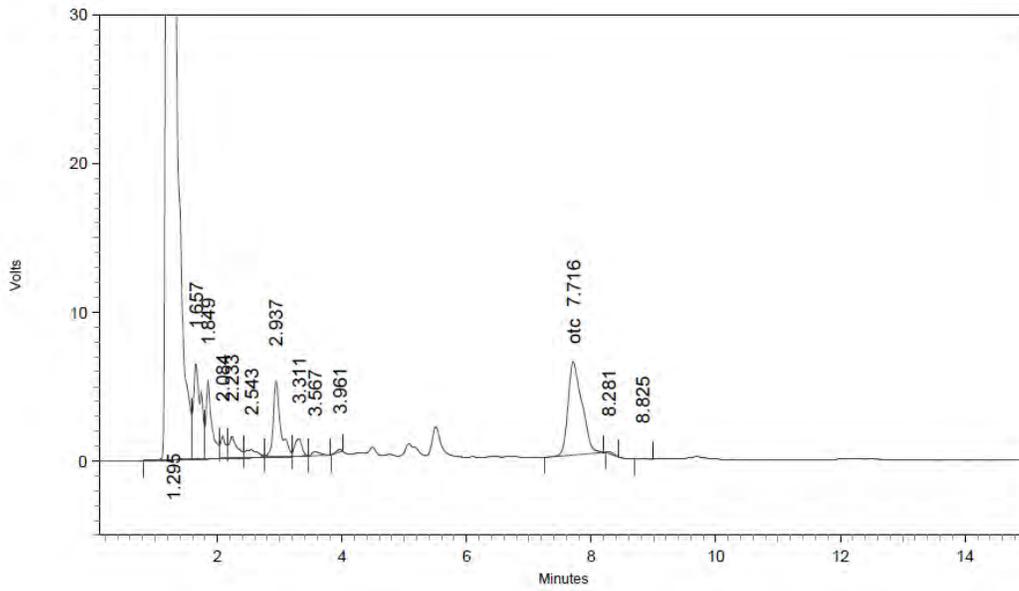


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.641	65725	4545.45



Y-8 OTC 16 junio-2016

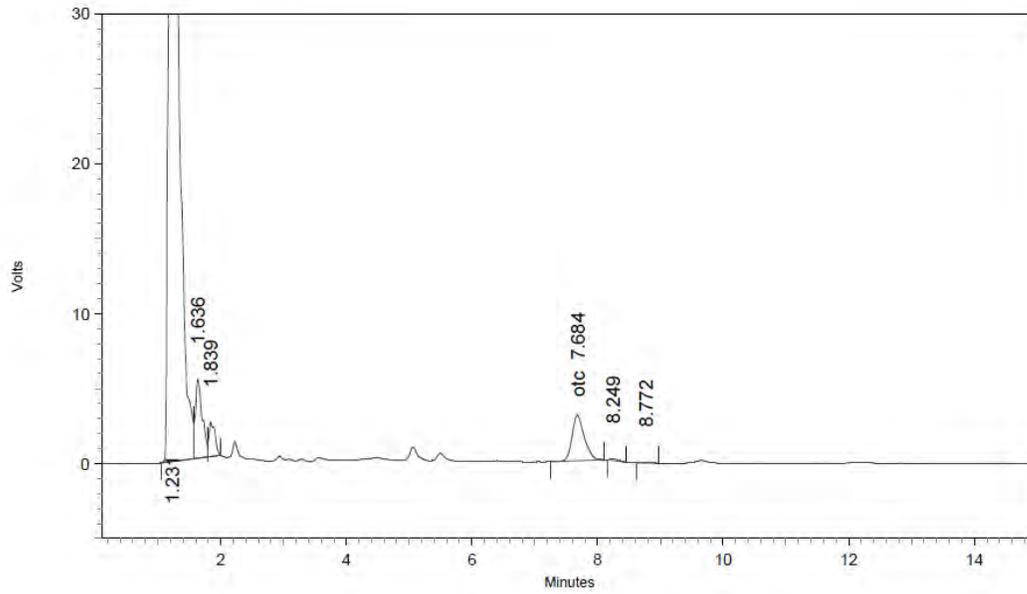


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.716	96920	5256.46



Y-9 OTC 16 junio-2016

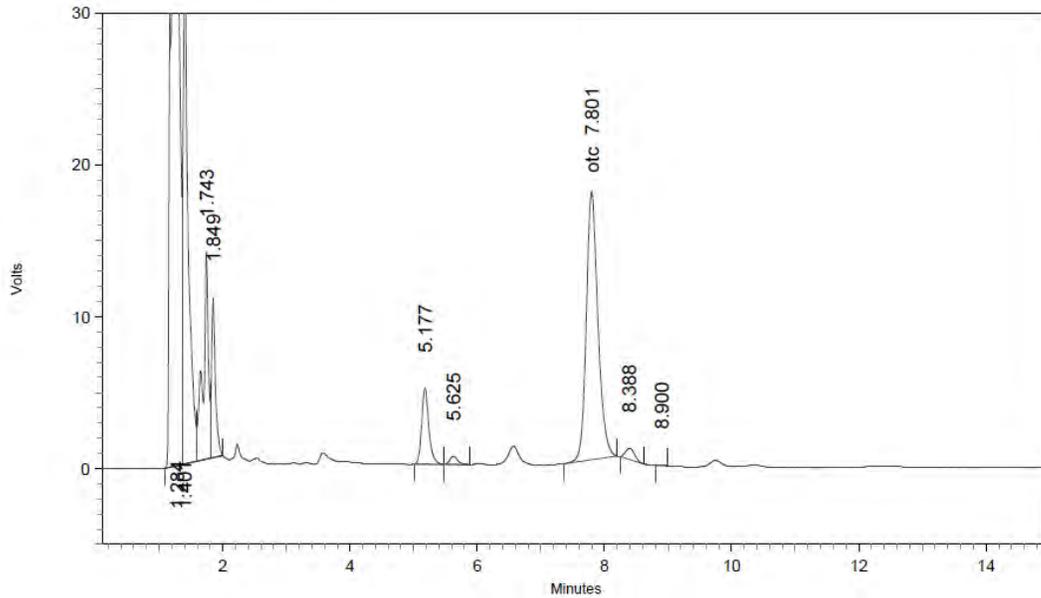


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.684	41006	7476.28



Y-10 OTC 16 junio-2016

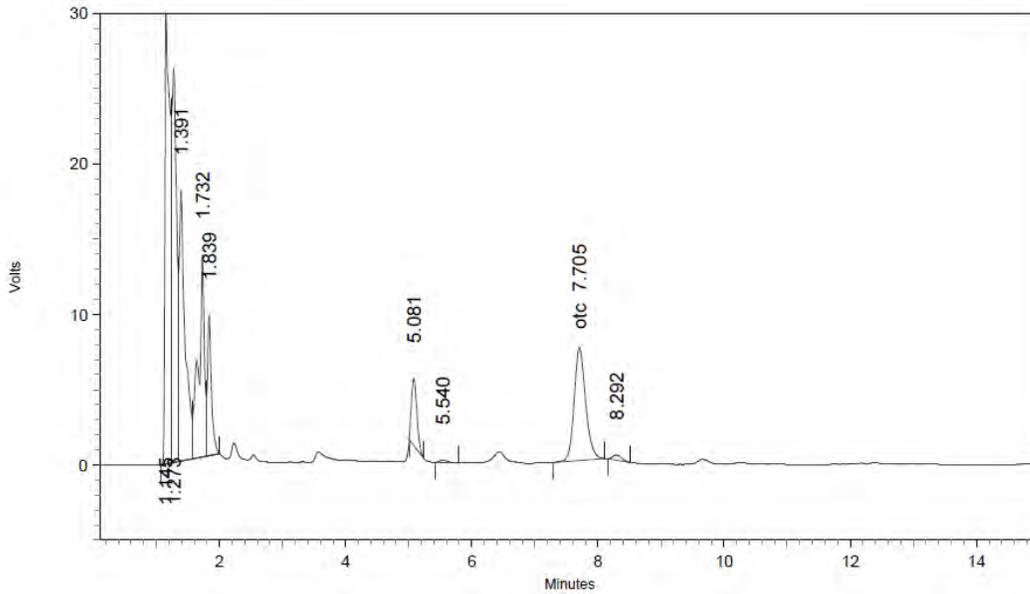


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.801	223726	9012.03



Z-6 OTC 16 junio-2016

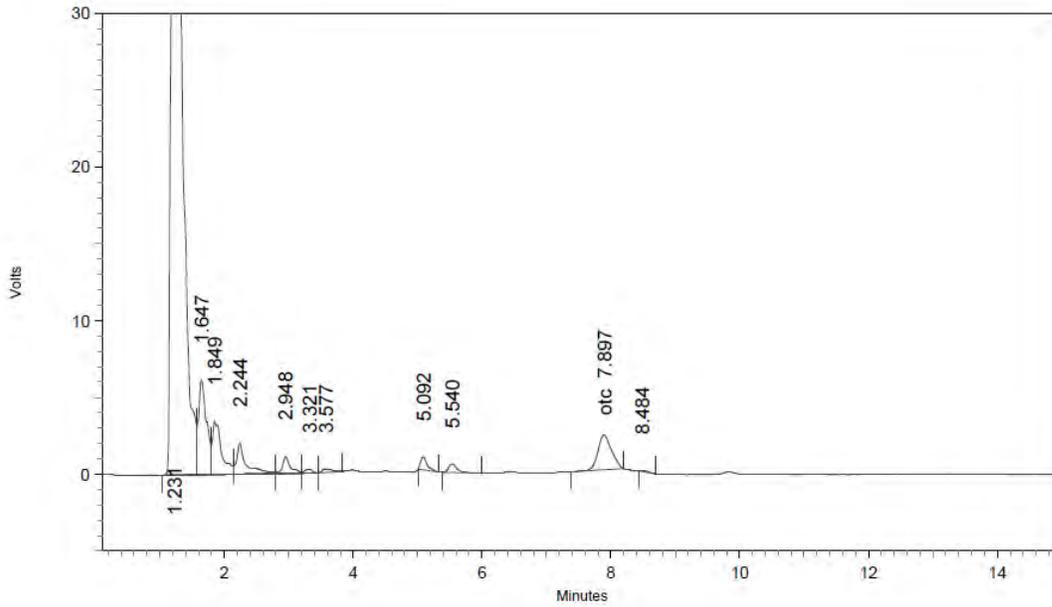


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.705	94169	8675.44



Z-7 OTC 16 junio-2016

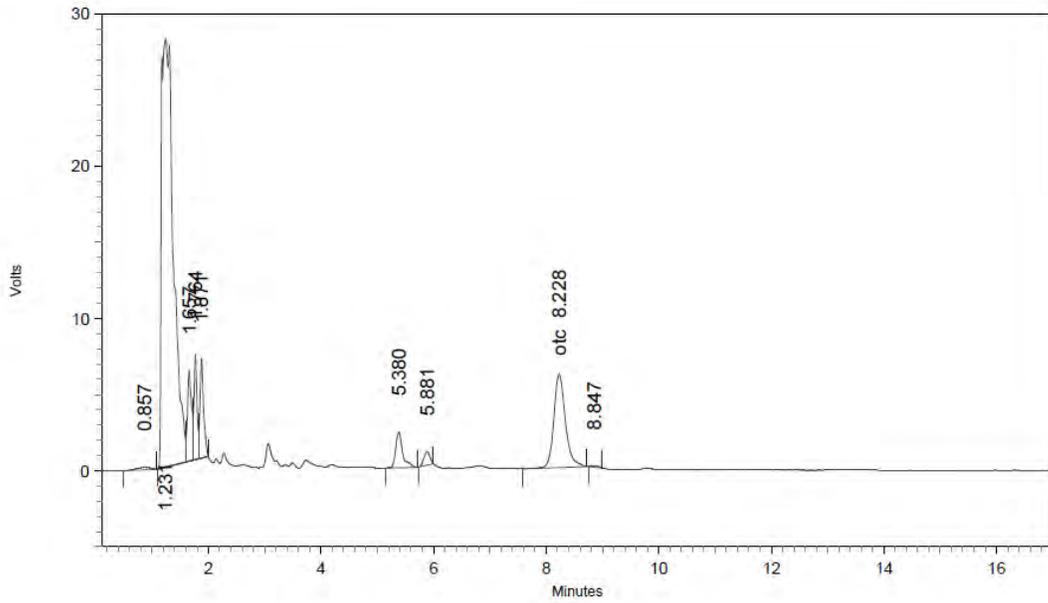


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.897	33675	6067.07



Z-8 OTC 23-Junio-2016

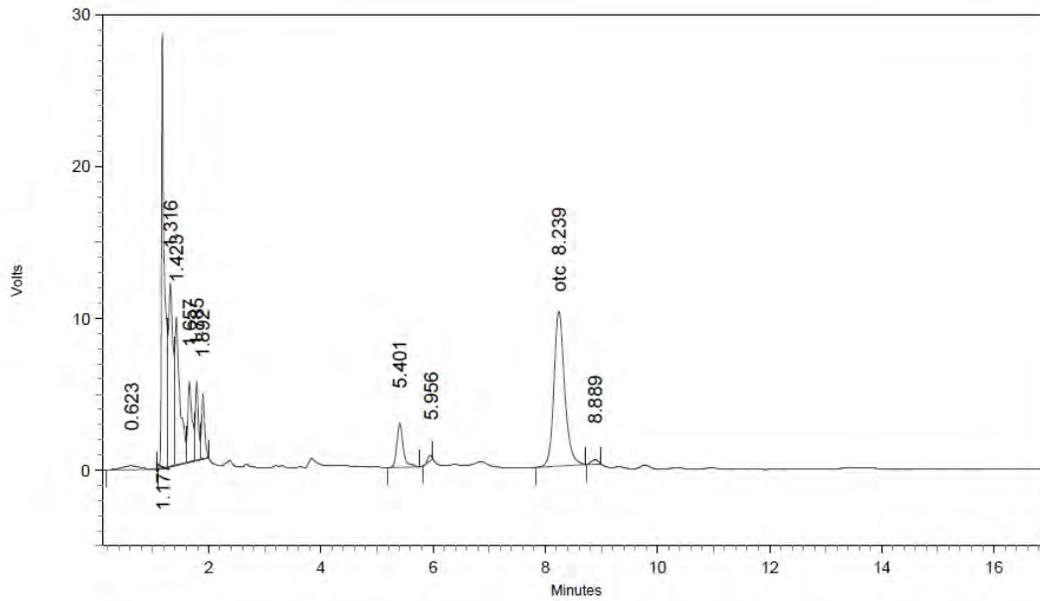


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.228	87014	8123.48



Z-9 OTC 23-Junio-2016

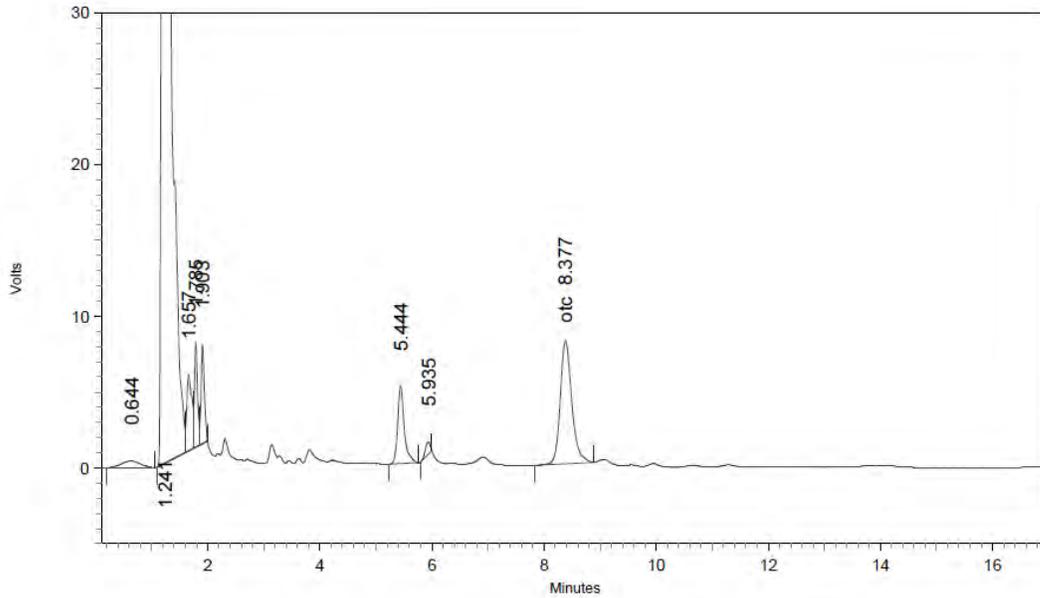


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.239	135055	9294.32



Z-10 OTC 23-Junio-2016

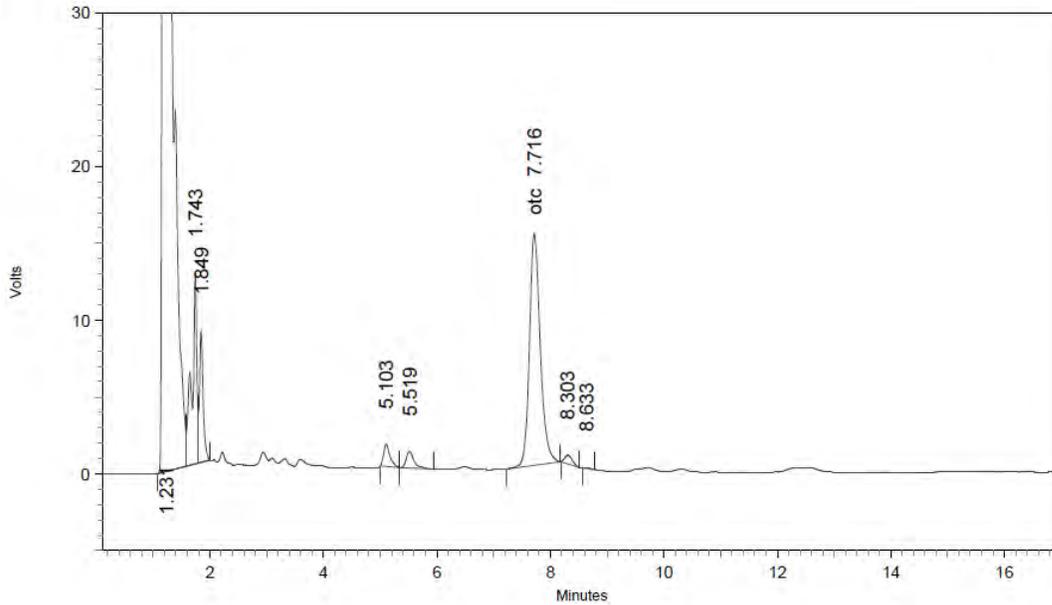


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.377	116345	8238.01



ZZ-6 OTC 7-JULIO-2016

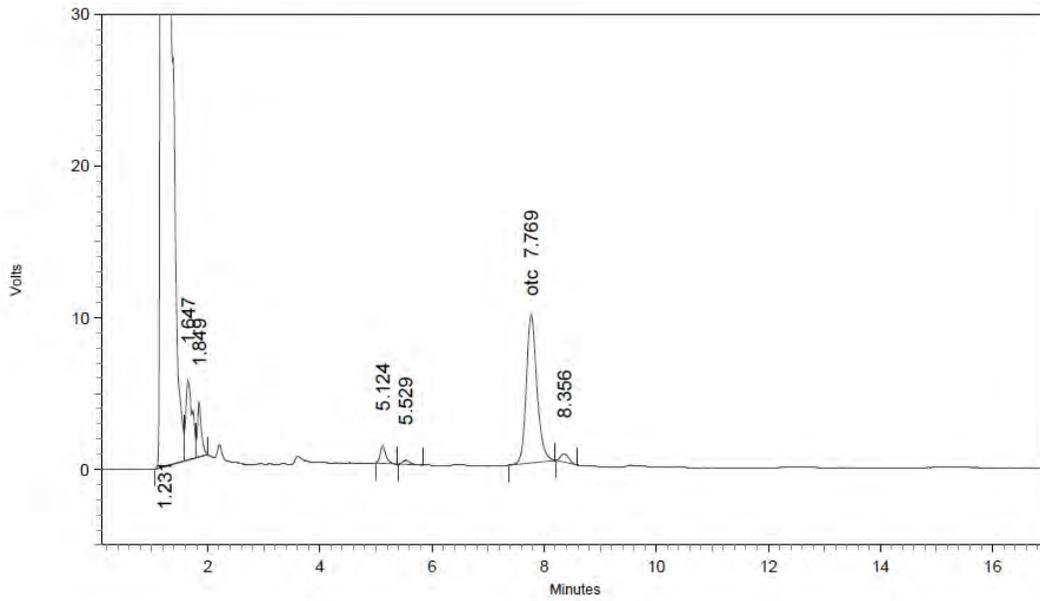


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.716	200026	8001.73



ZZ-7 OTC 7-JULIO-2016

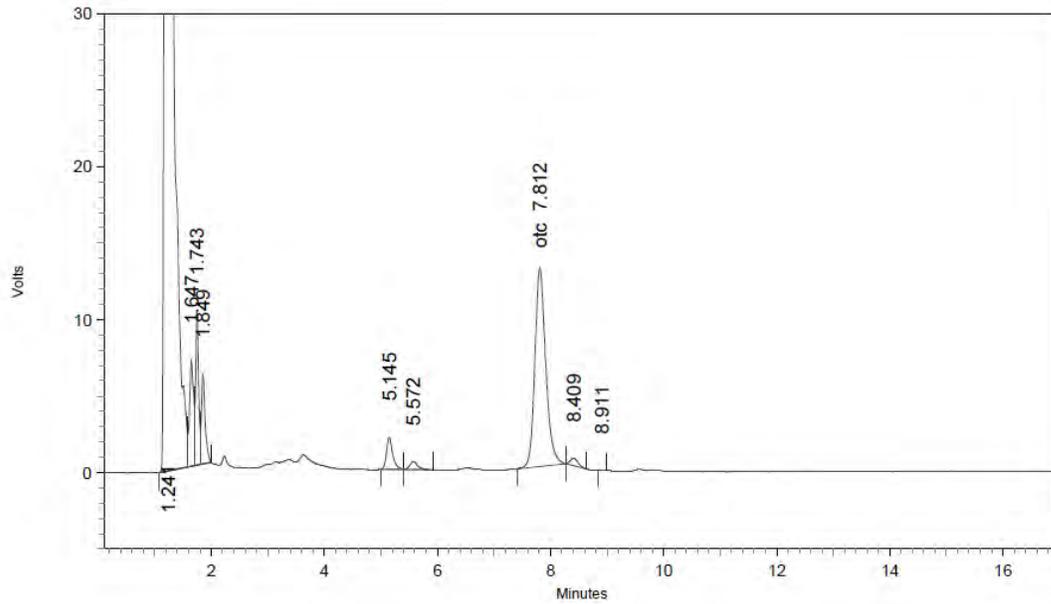


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.769	128557	8206.11



ZZ-8 OTC 7-JULIO-2016

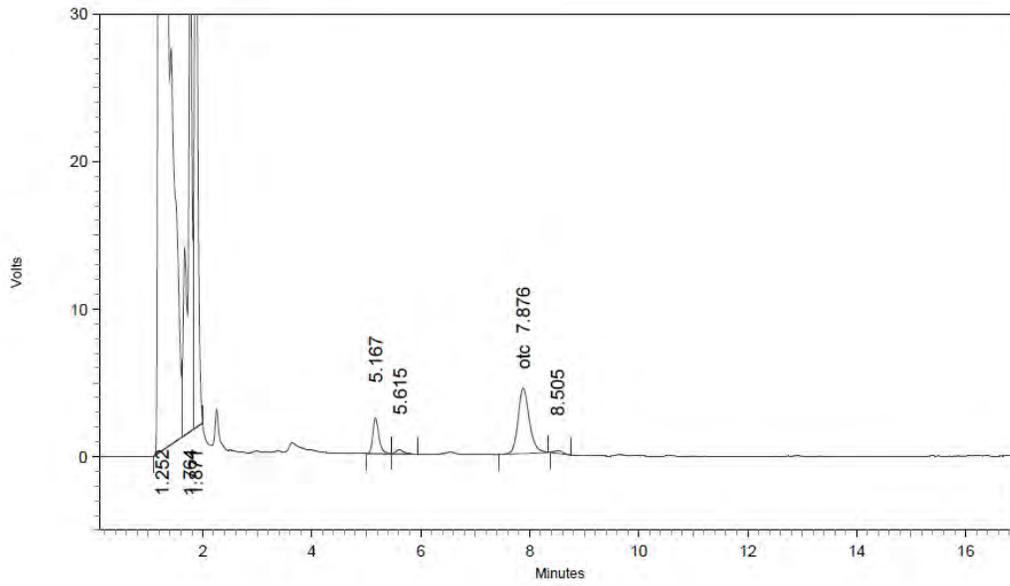


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.812	173800	8084.93



ZZ-9 OTC 7-JULIO-2016

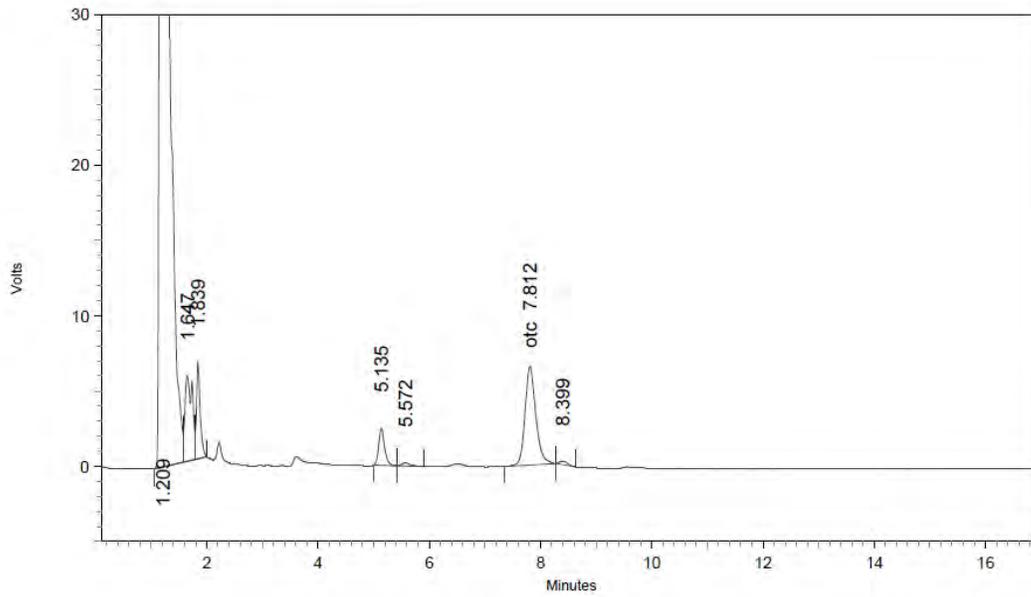


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.876	64126	7109.09



ZZ-10 OTC 7-JULIO-2016

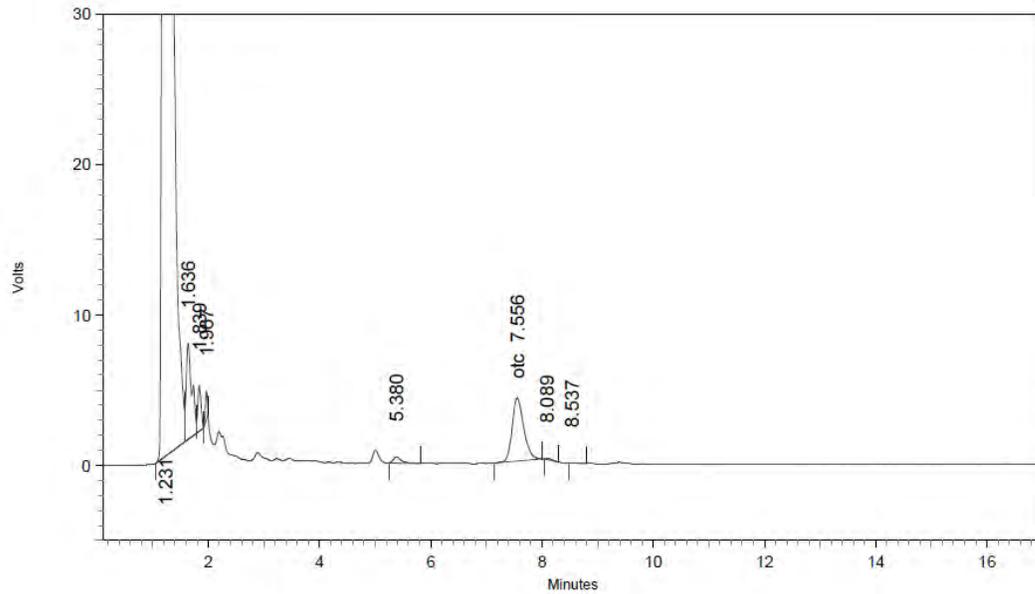


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.812	87956	8009.26



Y-11 OTC 12-JULIO-2016

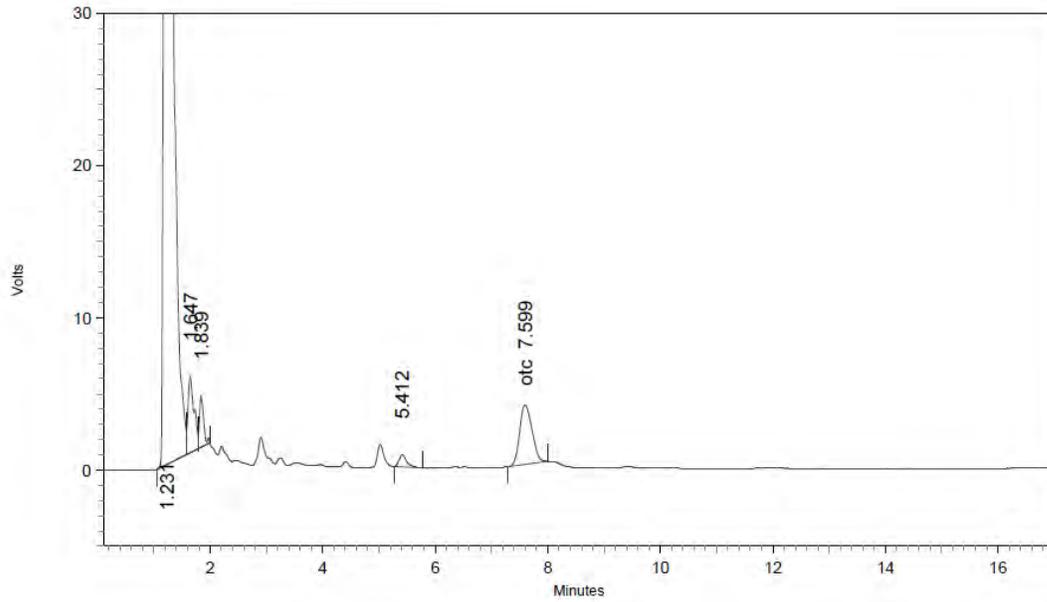


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.556	60791	6183.41



Y-12 OTC 12-JULIO-2016

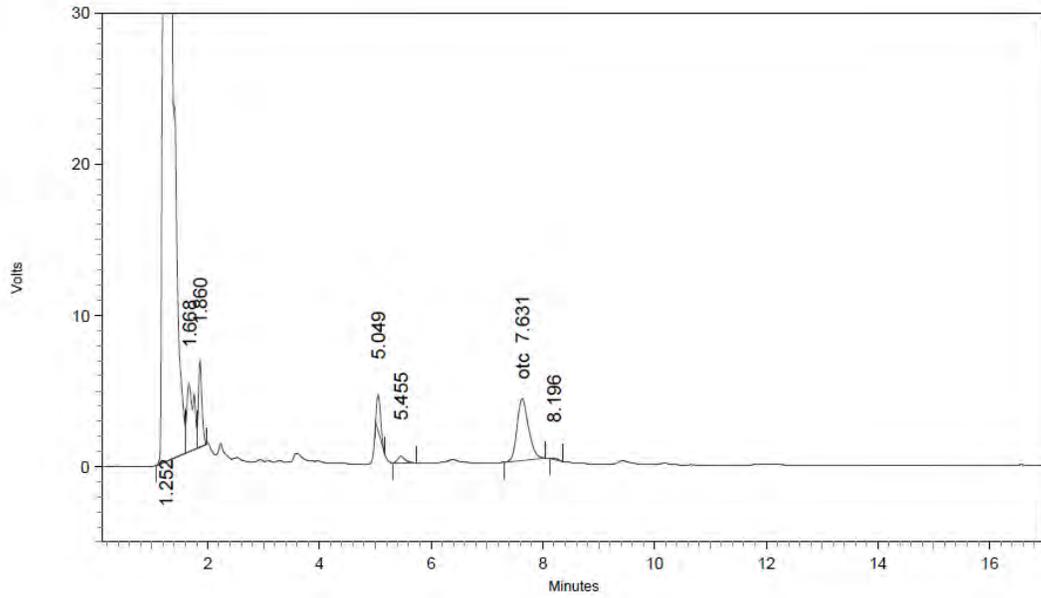


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.599	59570	5420.70



Y-13 OTC 12-JULIO-2016

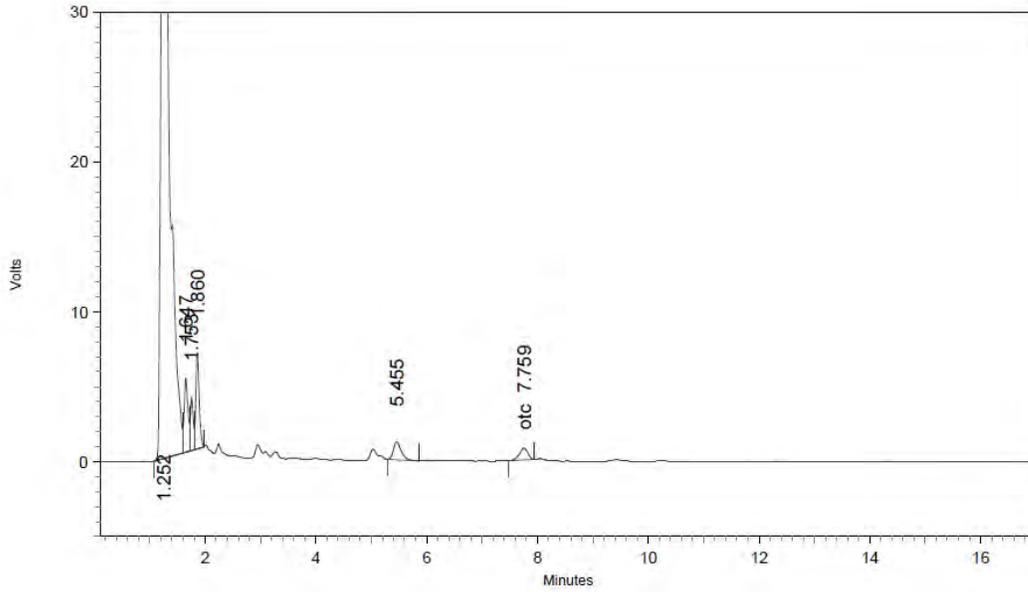


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.631	58545	6385.20



Y-14 OTC 12-JULIO-2016

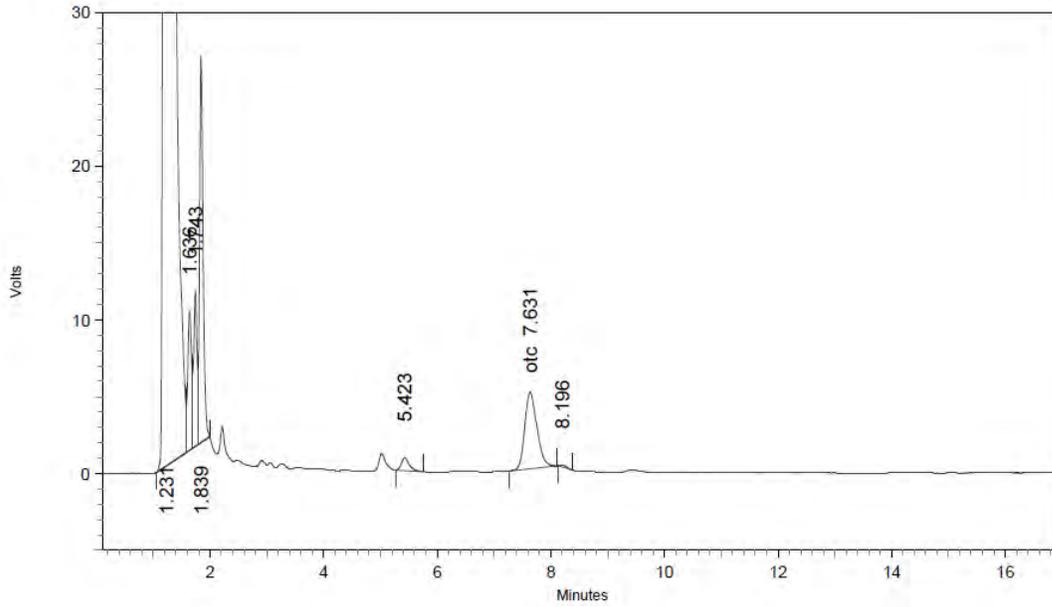


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.759	8378	11857.71



Y-15 OTC 12-JULIO-2016

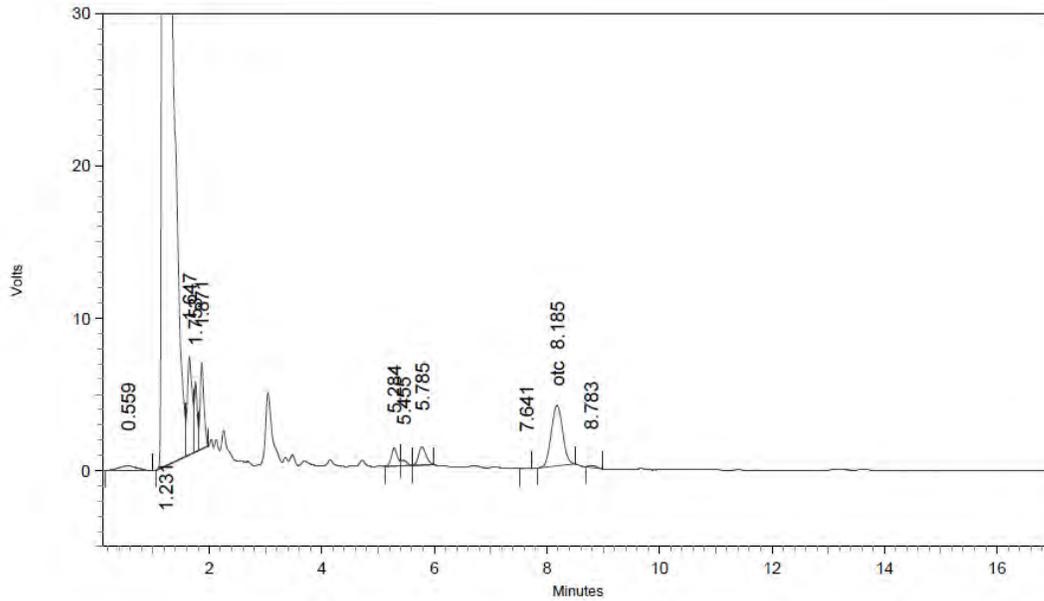


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.631	74193	5821.49



Z-11 OTC 6-JULIO-2016

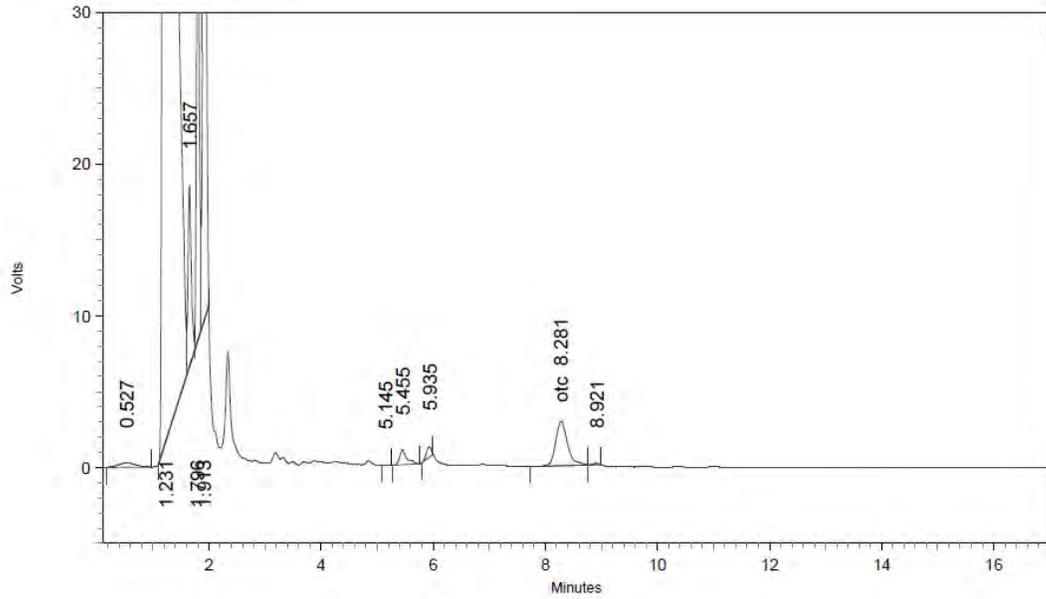


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.185	55772	7552.70



Z-12 OTC 6-JULIO-2016

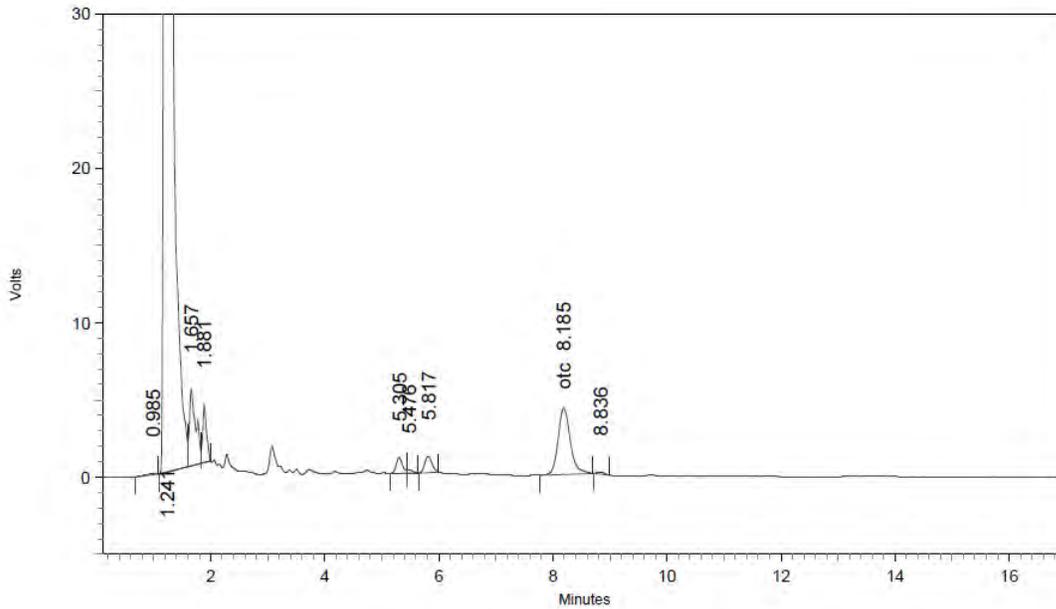


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.281	43135	7802.55



Z-13 OTC 6-JULIO-2016

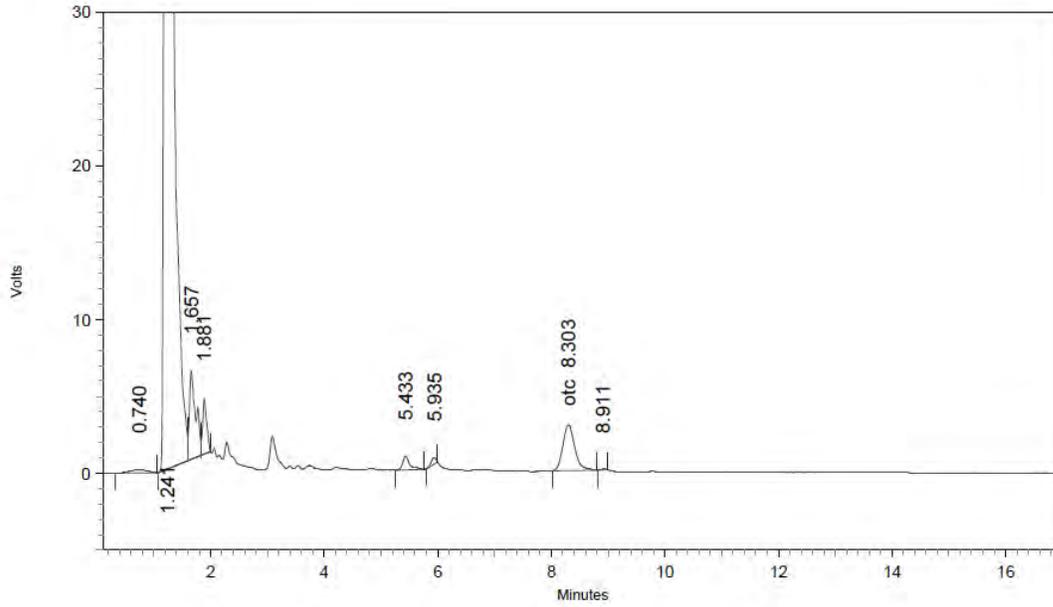


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.185	63756	7306.62



Z-14 OTC 6-JULIO-2016

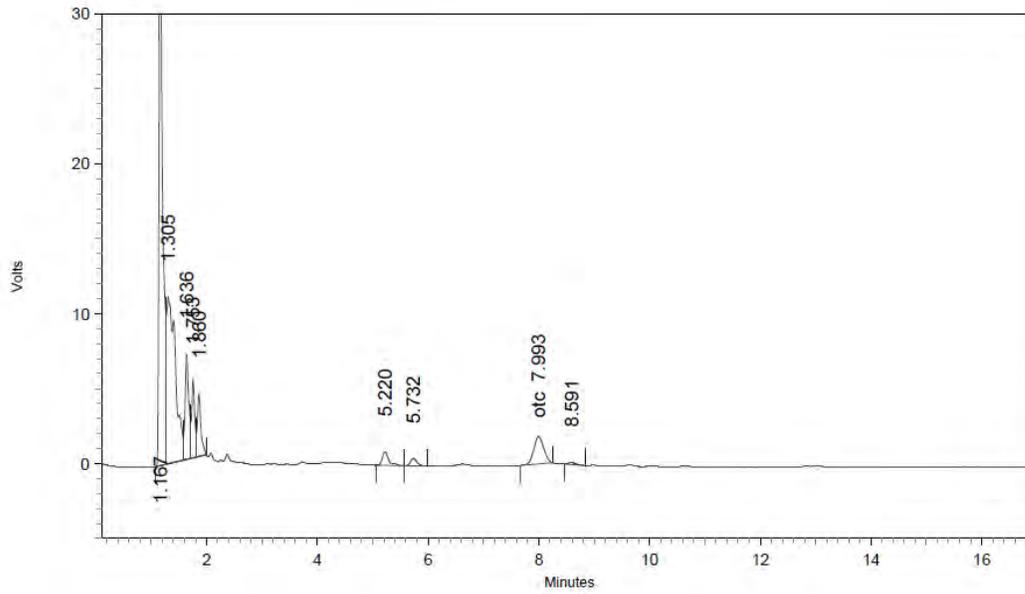


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.303	43360	7781.37



Z-15 OTC 7-JULIO-2016

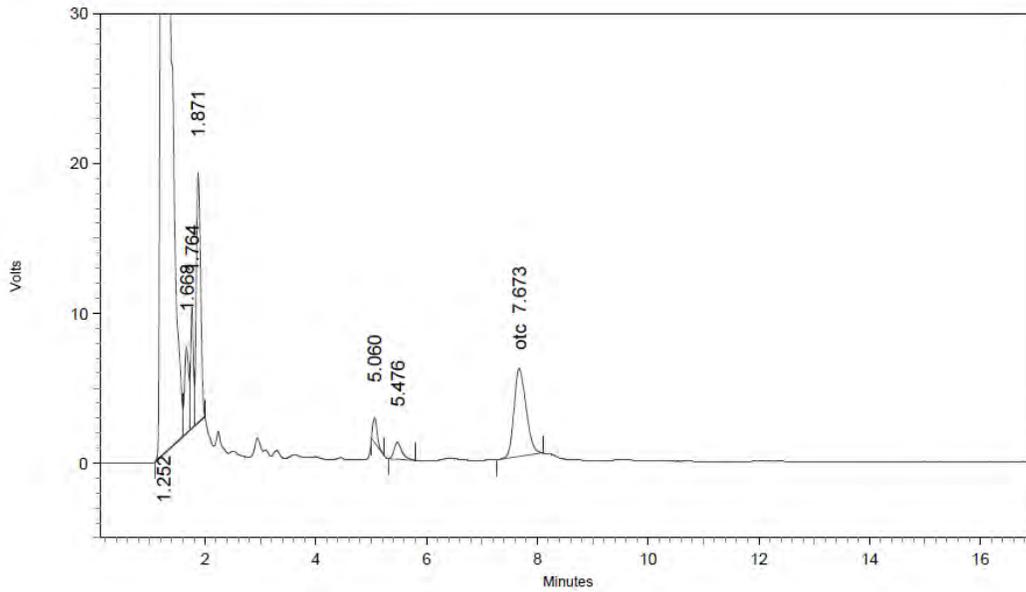


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.993	22825	8979.82



ZZ-11 OTC 12-JULIO-2016

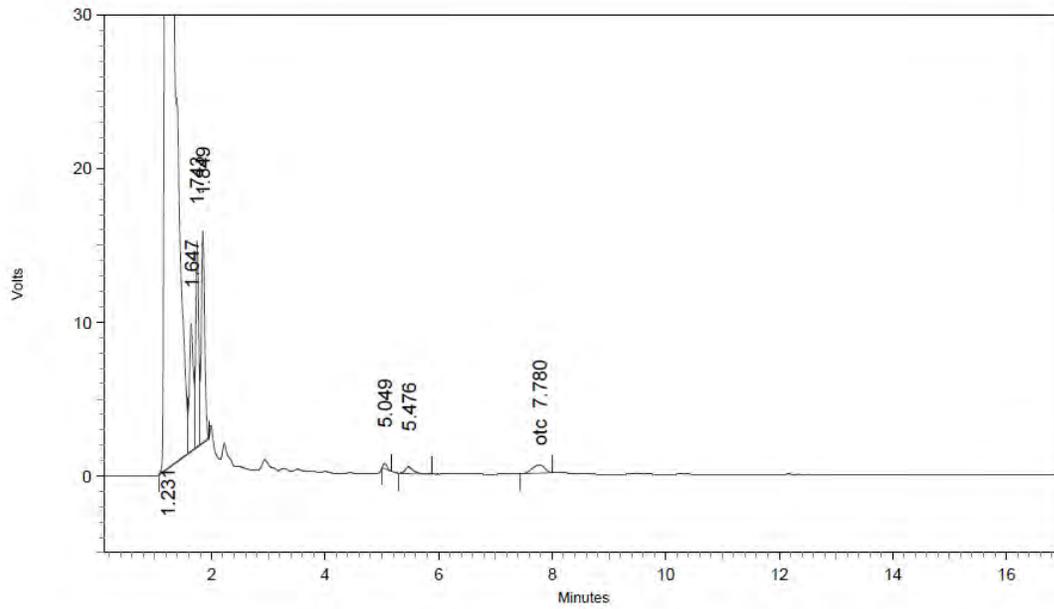


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.673	88551	5567.48



ZZ-12 OTC 12-JULIO-2016

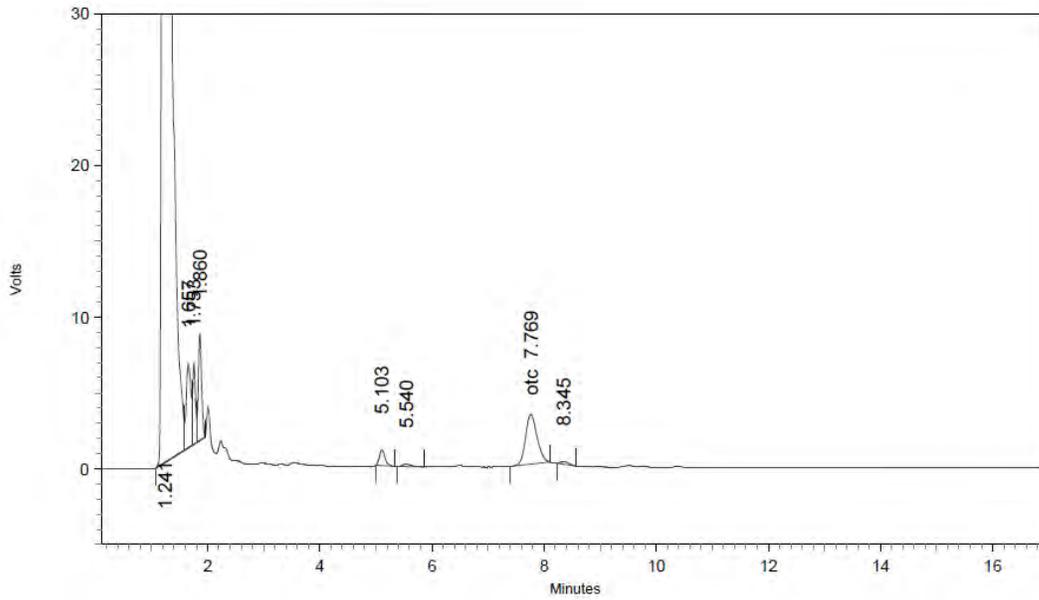


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.780	8260	5673.37



ZZ-13 OTC 12-JULIO-2016

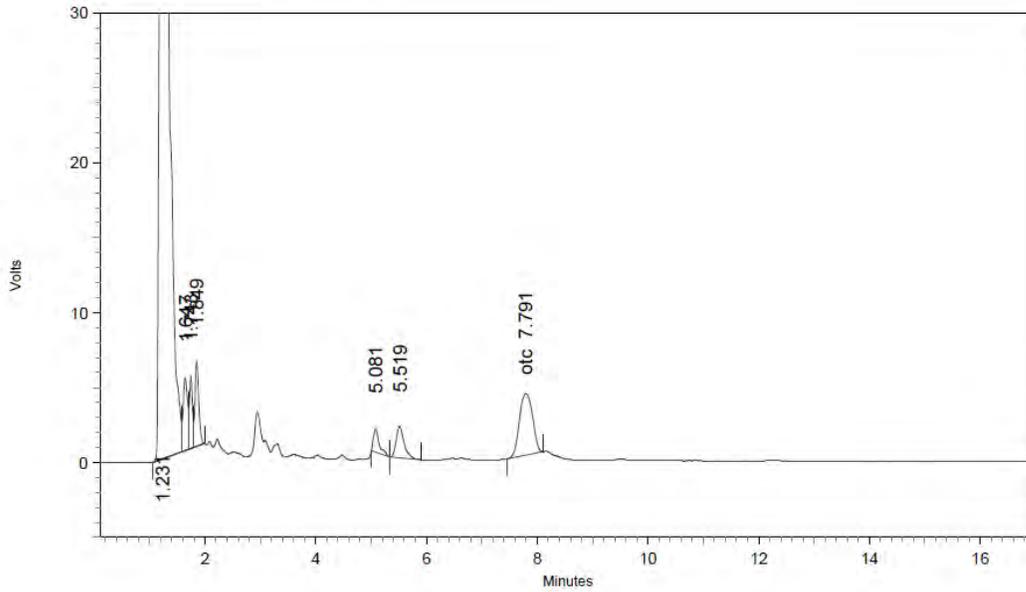


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.769	46912	6575.75



ZZ-14 OTC 12-JULIO-2016

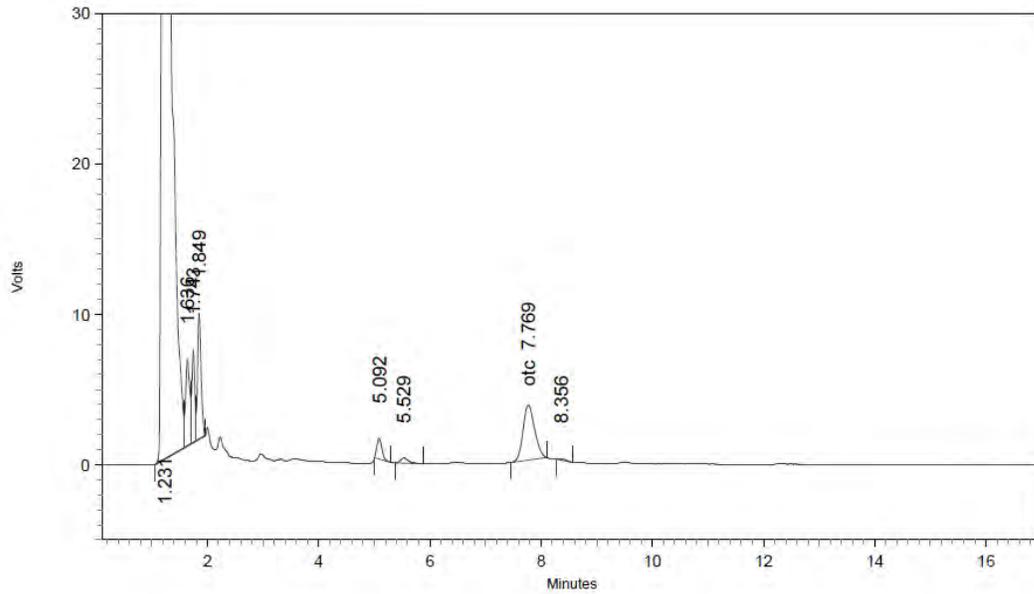


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.791	67524	5248.88



ZZ-15 OTC 12-JULIO-2016

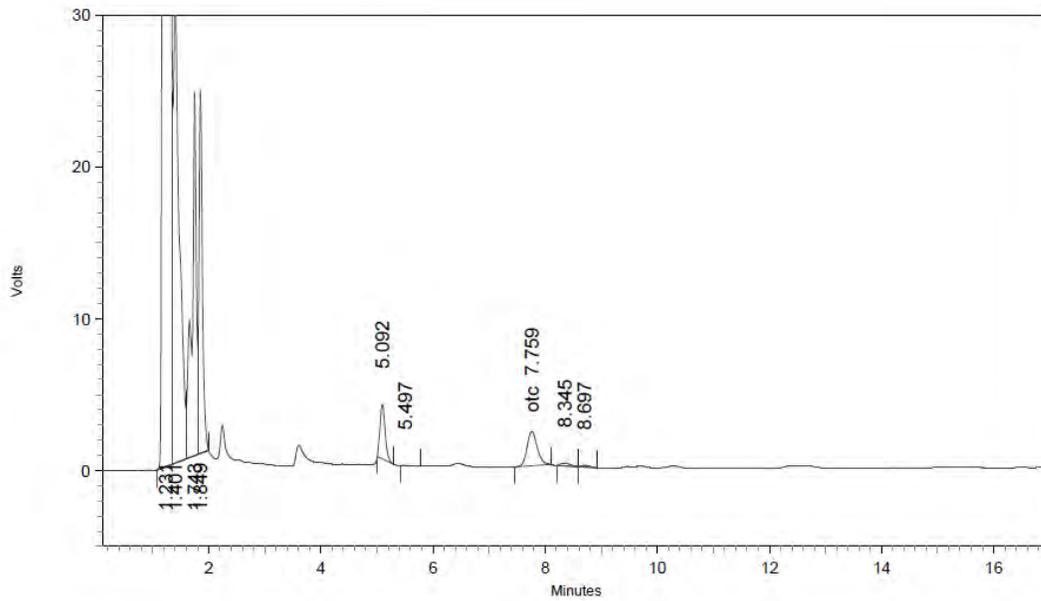


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.769	53032	6230.26



Y-16 OTC 6-JULIO-2016

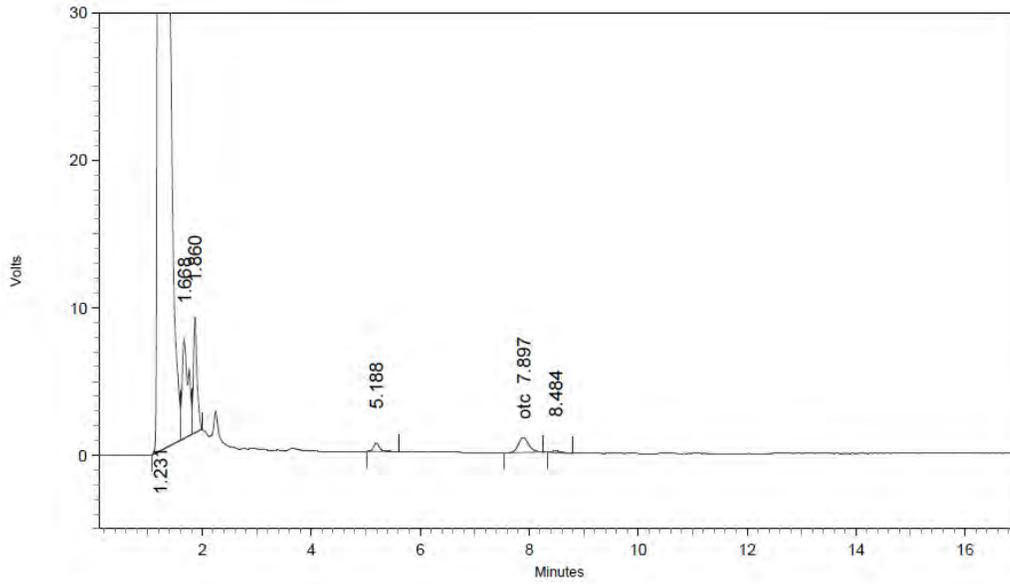


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.759	28556	8668.30



Y-17 OTC 6-JULIO-2016

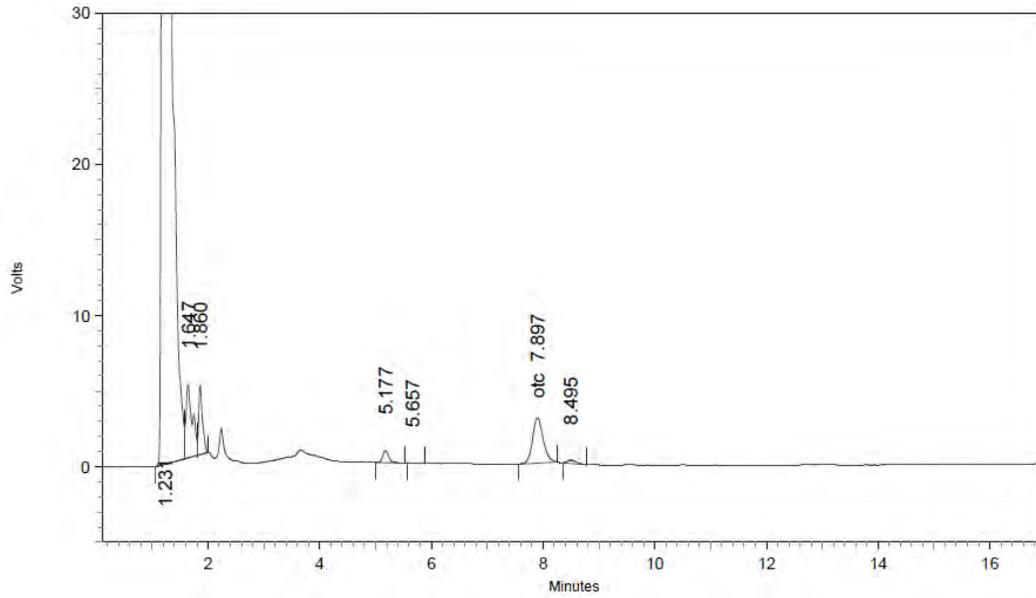


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.897	13652	7872.44



Y-18 OTC 6-JULIO-2016

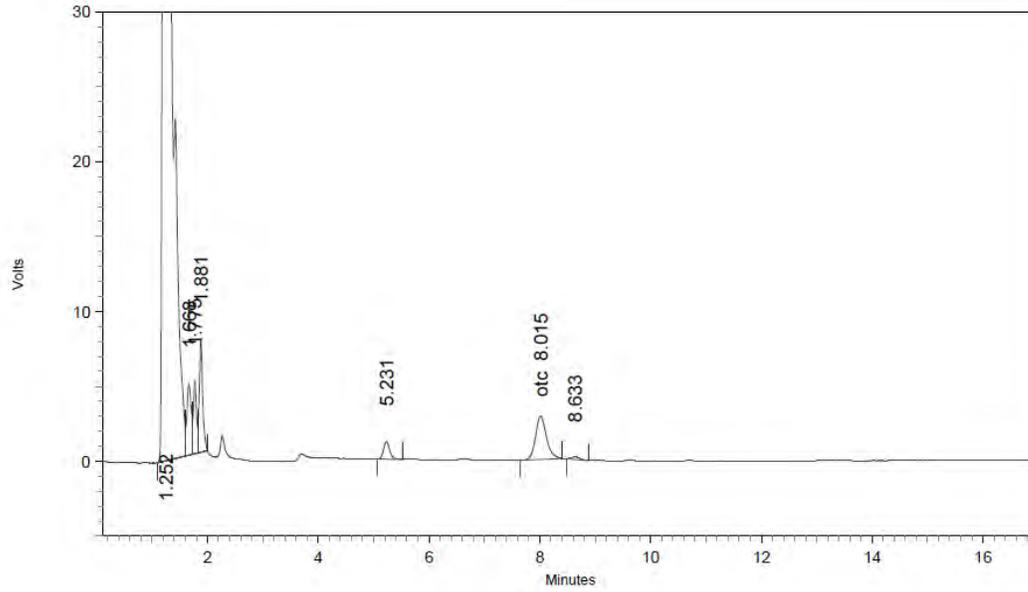


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.897	39650	8309.01



Y-19 OTC 6-JULIO-2016

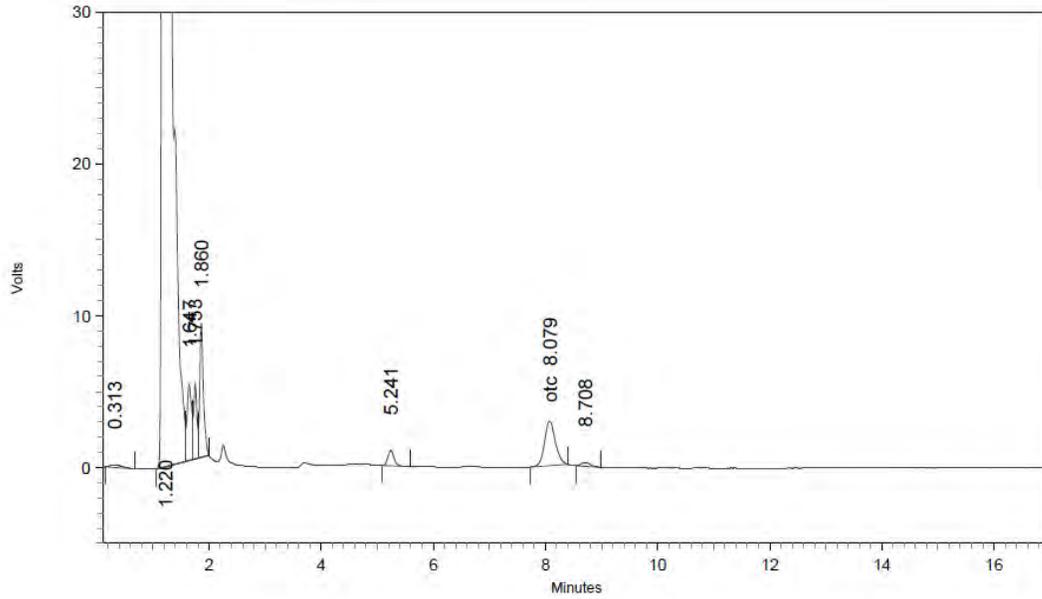


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.015	39558	8154.66



Y-20 OTC 6-JULIO-2016

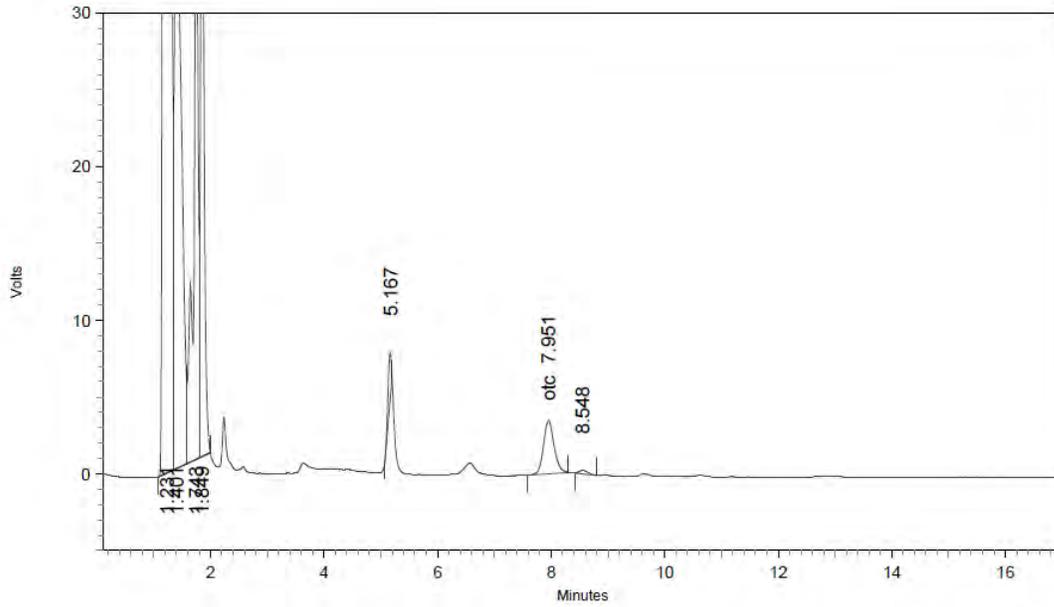


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.079	39491	8175.16



Z-16 OTC 7-JULIO-2016

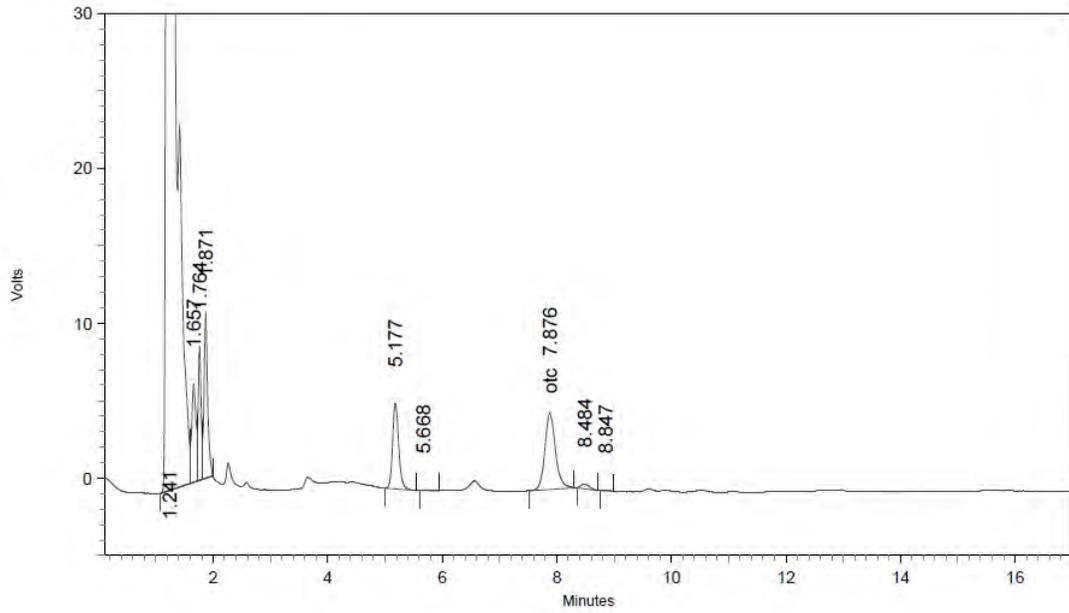


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.951	45064	8800.41



Z-17 OTC 7-JULIO-2016

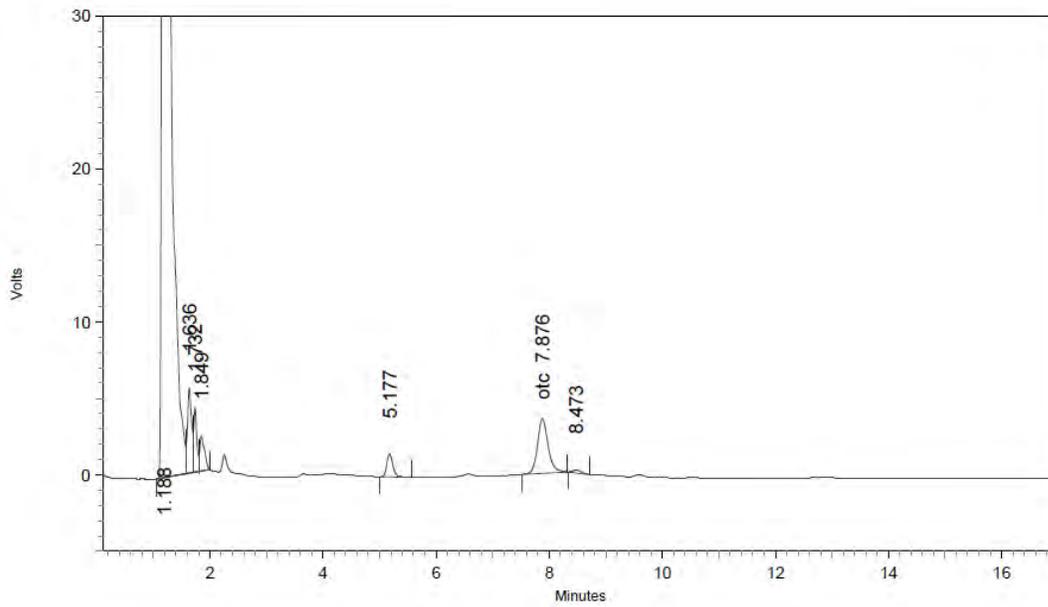


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.876	63459	8732.24



Z-18 OTC 7-JULIO-2016

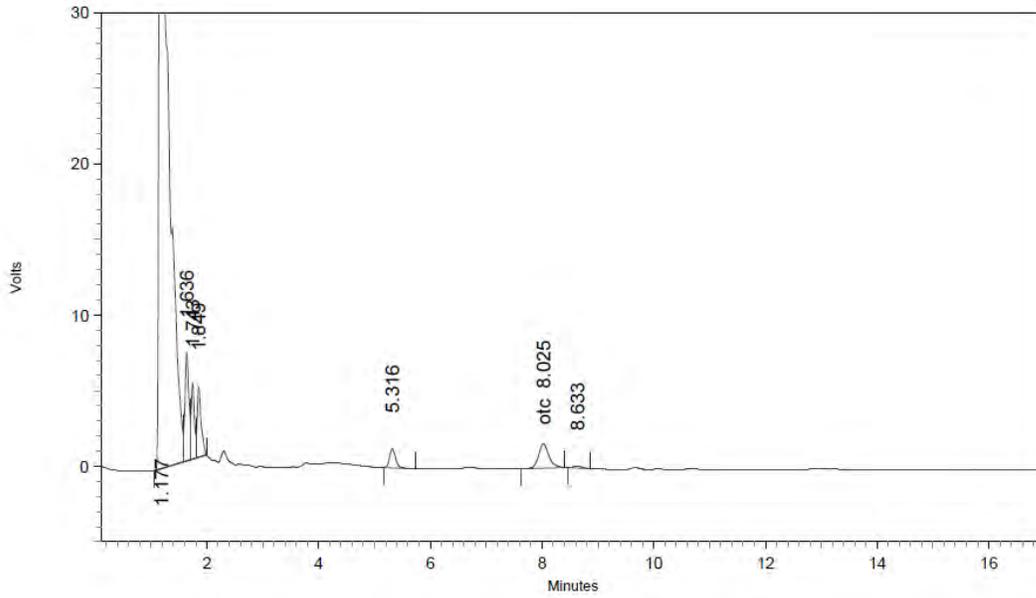


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.876	46814	8639.21



Z-19 OTC 7-JULIO-2016

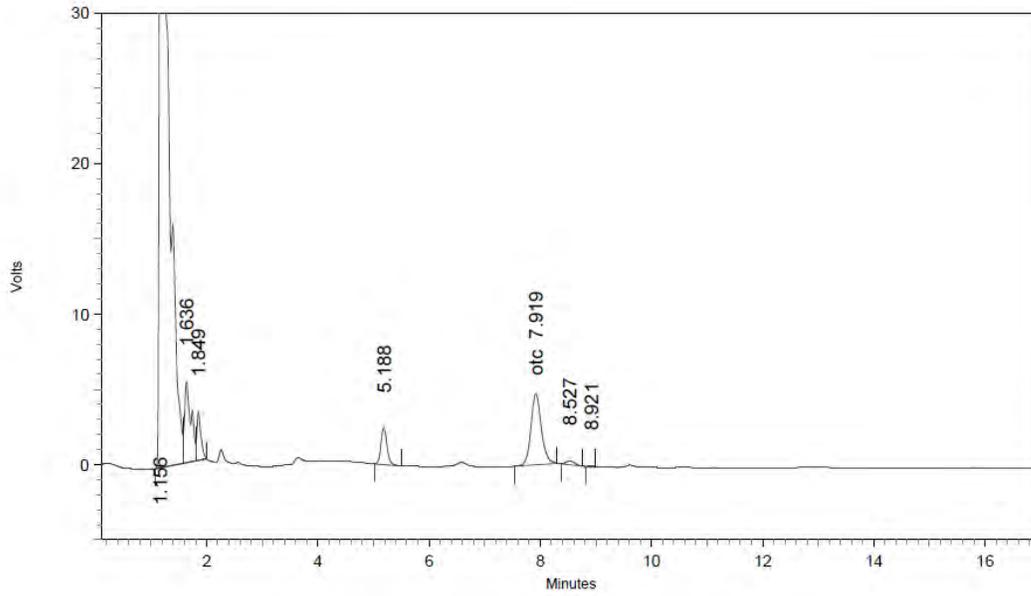


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.025	20662	9498.79



Z-20 OTC 7-JULIO-2016

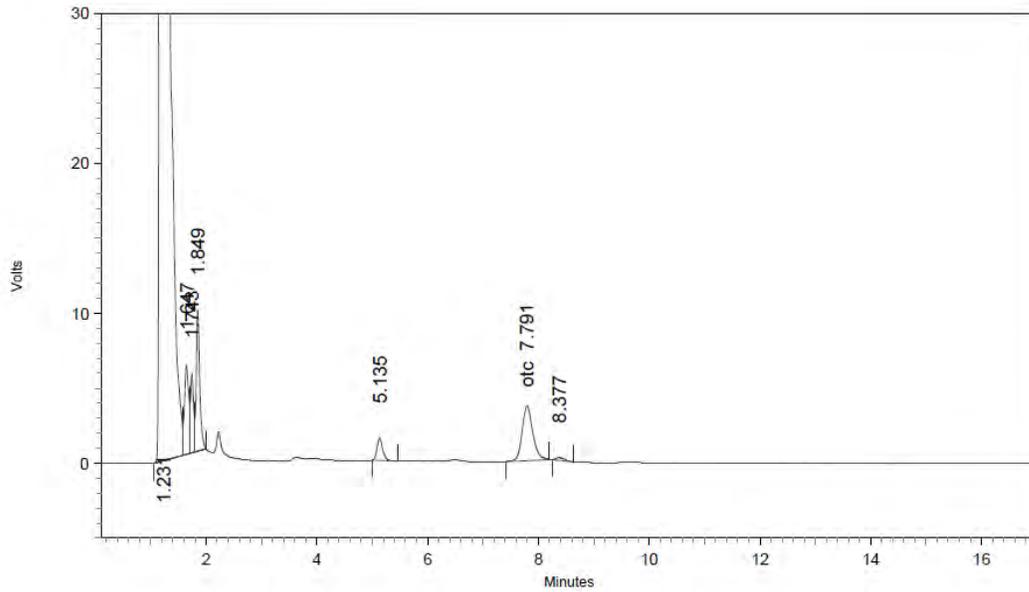


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.919	61313	8712.06



ZZ-16 OTC 7-JULIO-2016

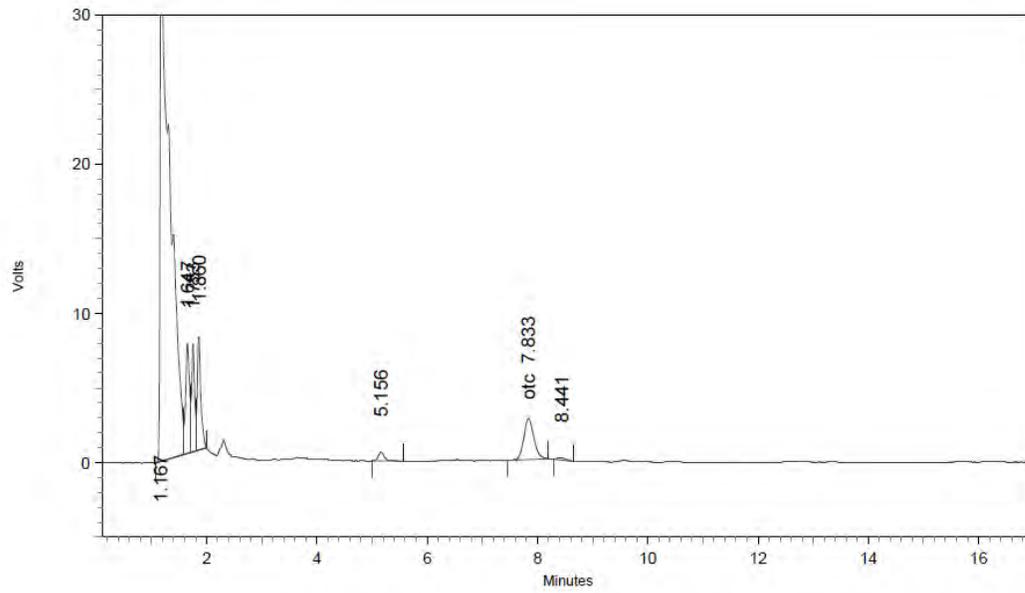


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.791	48347	8239.46



ZZ-17 OTC 7-JULIO-2016

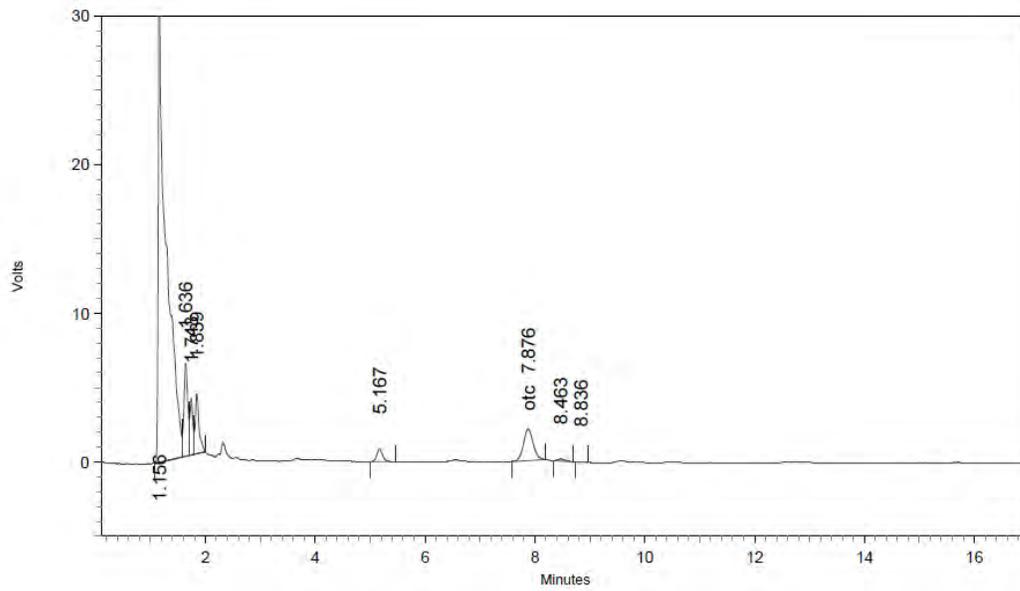


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.833	35202	8750.26



ZZ-18 OTC 7-JULIO-2016

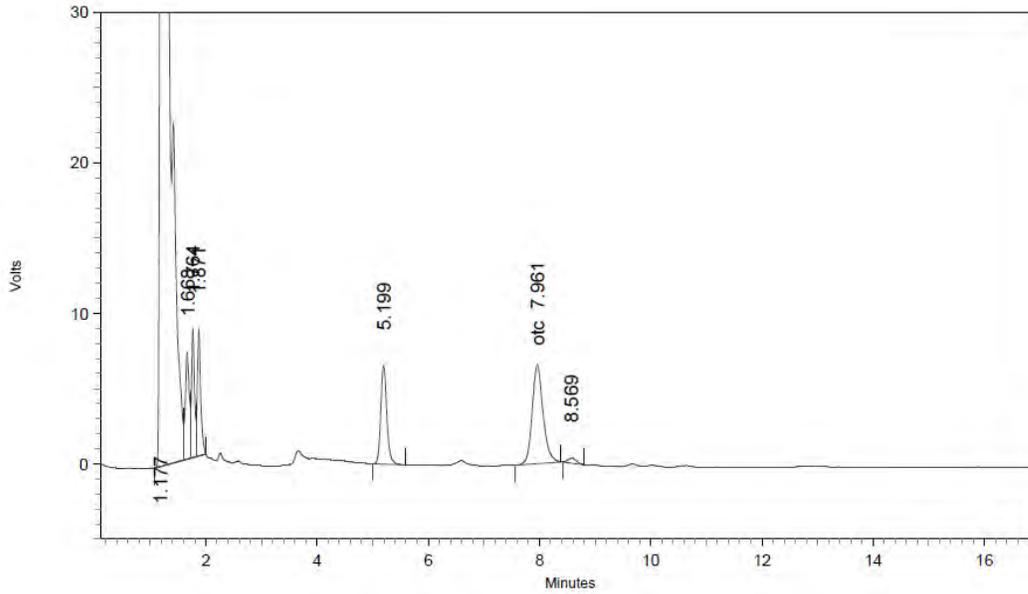


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.876	25985	9192.87



ZZ-19 OTC 7-JULIO-2016

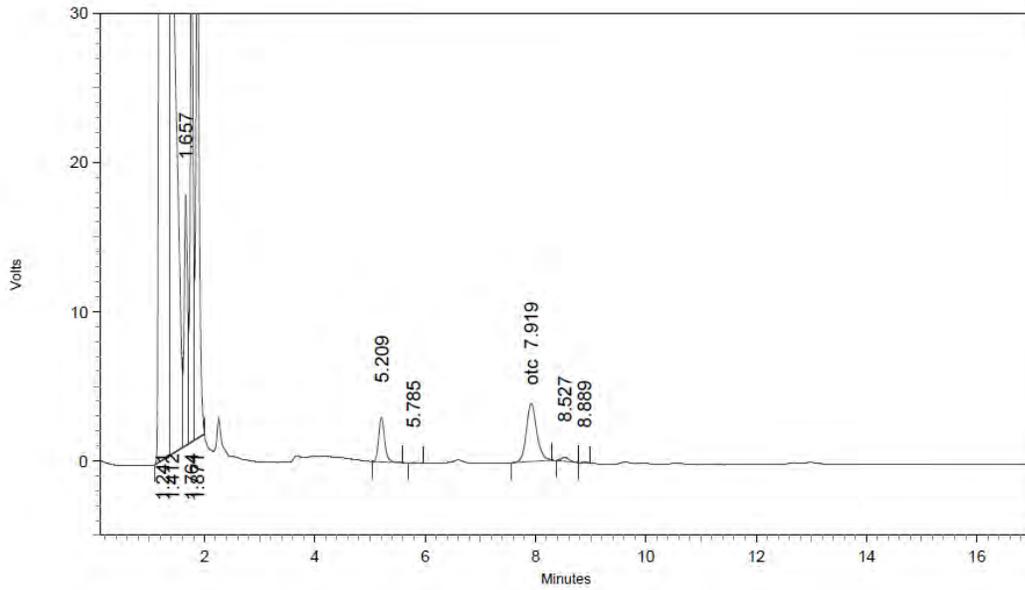


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.961	89051	8097.86



ZZ-20 OTC 7-JULIO-2016



2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.919	50871	8571.18



Anexo 8.19. Resultados de OTC en piel-músculo de Trucha para el cálculo de la curva de depleción de Magnadur en condiciones de campo.

Fecha	Nº Mx	Días	área	conc obtenida
analisis		post- inyección		ng/g
23/05/2016	TA-1	31	32.177	247,3
23/05/2016	TA-2	31	18.044	142,2
23/05/2016	TA-3	31	36.709	292,6
23/05/2016	TA-4	31	32.197	251,8
23/05/2016	TA-5	31	26.013	206,2
23/05/2016	TA-6	31	108.957	853,0
23/05/2016	TA-7	31	66.396	516,8
23/05/2016	TA-8	31	64.922	508,2
23/05/2016	TA-9	31	6.409	25,0
23/05/2016	TA-10	31	23.542	182,4
07/06/2016	TA-11	38	41.052	318,0
07/06/2016	TA-12	38	22.441	175,8
07/06/2016	TA-13	38	17.492	134,6
07/06/2016	TA-14	38	44.184	341,8
07/06/2016	TA-15	38	31.411	244,1
07/06/2016	TA-16	38	16.268	126,5
07/06/2016	TA-17	38	17.819	137,7
07/06/2016	TA-18	38	15.086	117,1
07/06/2016	TA-19	38	8.262	61,7
07/06/2016	TA-20	38	23.587	178,9
07/06/2016	TA-21	46	4.391	25,0
07/06/2016	TA-22	46	45.844	363,8
07/06/2016	TA-23	46	37.992	288,5
07/06/2016	TA-24	46	45.883	366,3
07/06/2016	TA-25	46	12.640	97,9
07/06/2016	TA-26	46	94.257	746,3

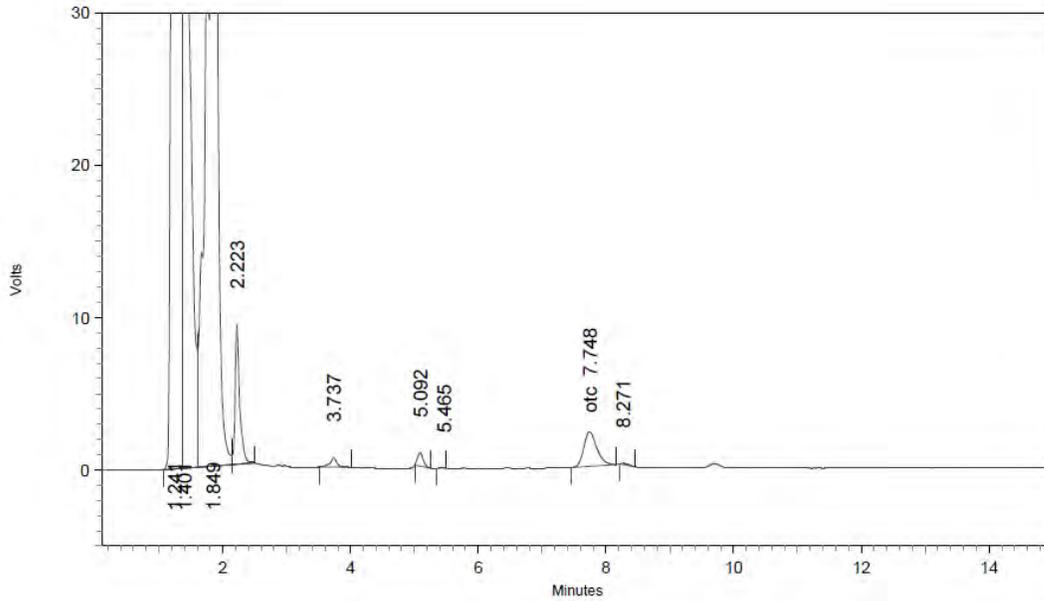


07/06/2016	TA-27	46	15.748	123,8
07/06/2016	TA-28	46	19.729	156,1
07/06/2016	TA-29	46	12.166	91,1
07/06/2016	TA-30	46	27.702	210,5
21/06/2016	TA-31	58	6.670	50,9
21/06/2016	TA-32	58	6.973	53,6
21/06/2016	TA-33	58	1.545	12,5
21/06/2016	TA-34	58	9.028	67,9
21/06/2016	TA-35	58	5.099	25,0
21/06/2016	TA-36	58	38.124	297,4
21/06/2016	TA-37	58	11.867	92,3
21/06/2016	TA-38	58	5.479	25,0
21/06/2016	TA-39	58	21.414	165,0
21/06/2016	TA-40	58	17.071	128,3



Anexo 8.20. Cromatogramas de curva de depleci3n Magnadur Trucha, condiciones de campo

TA-1 OTC 23-Mayo-2016

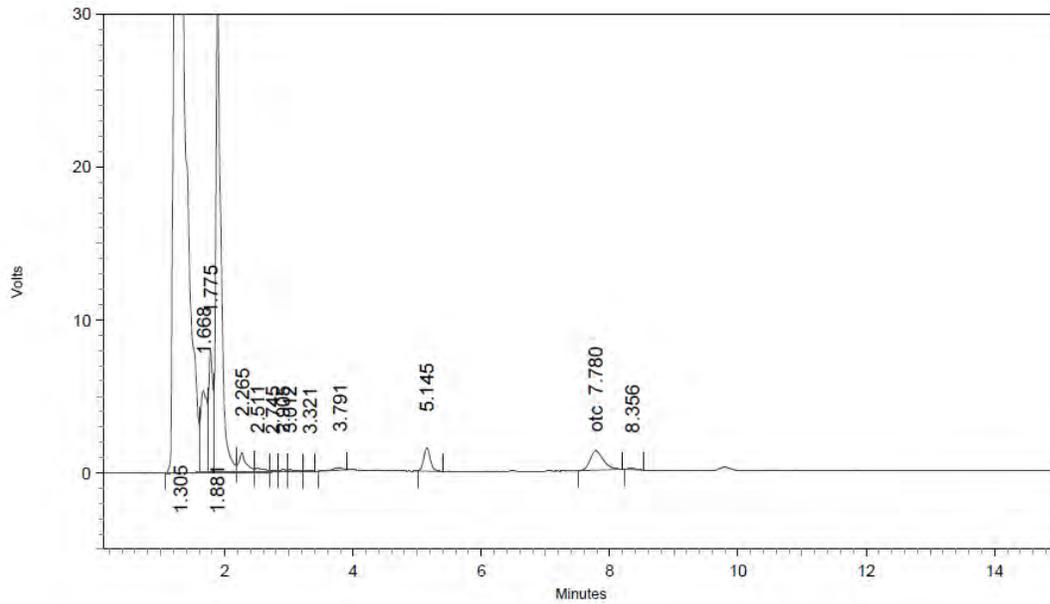


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.748	32177	6863.00



TA-2 OTC 23-Mayo-2016

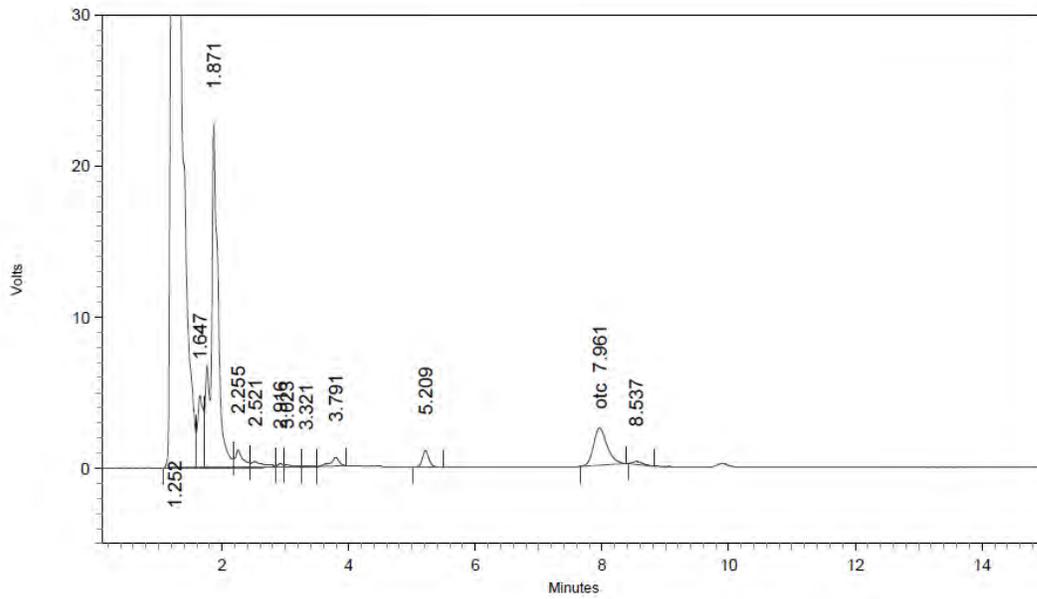


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.780	18044	6728.75



TA-3 OTC 23-Mayo-2016

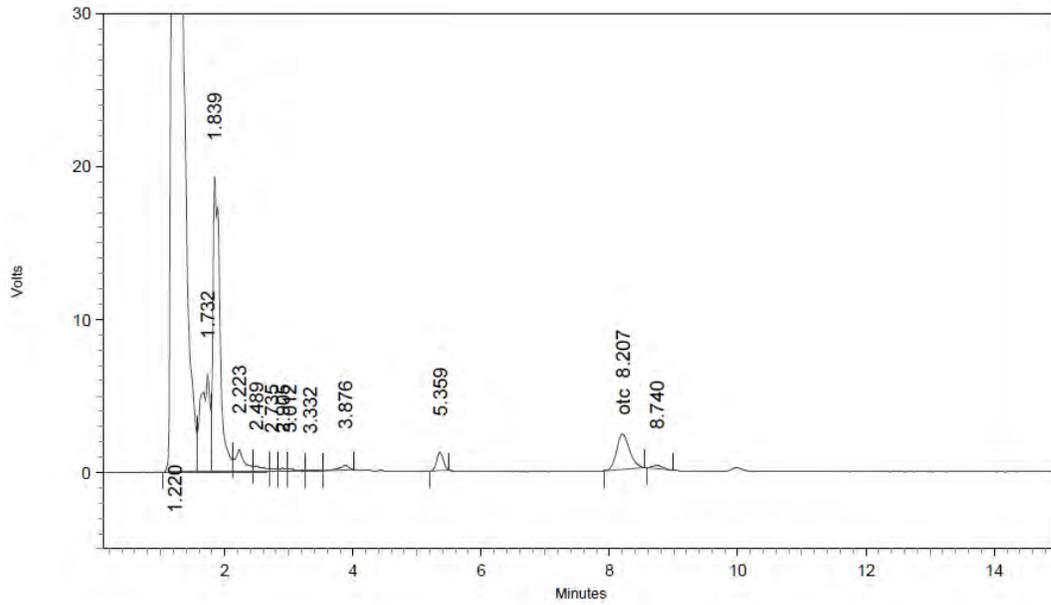


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.961	36709	6544.22



TA-4 OTC 23-Mayo-2016

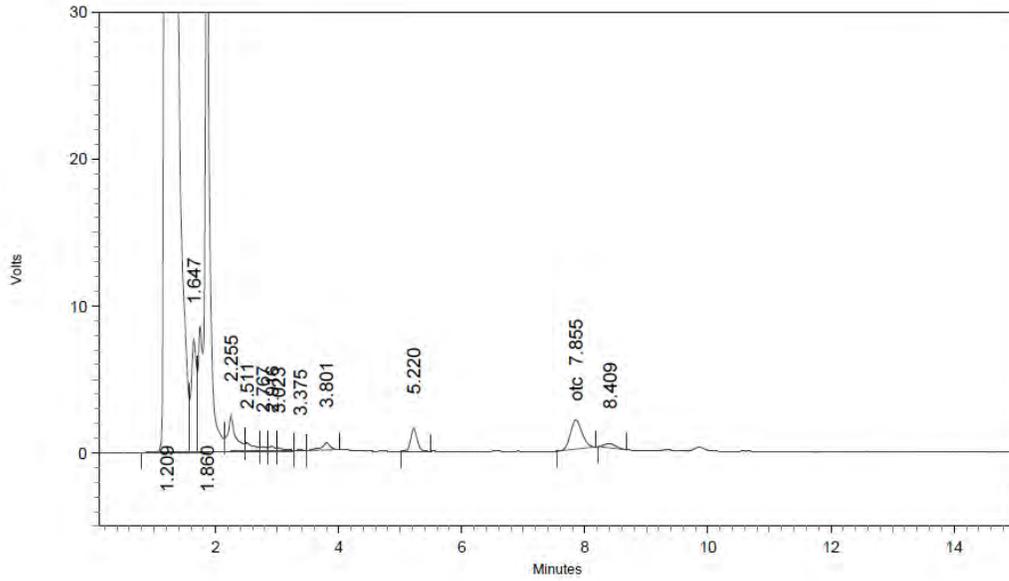


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.207	32197	7771.70



TA-5 OTC 23-Mayo-2016

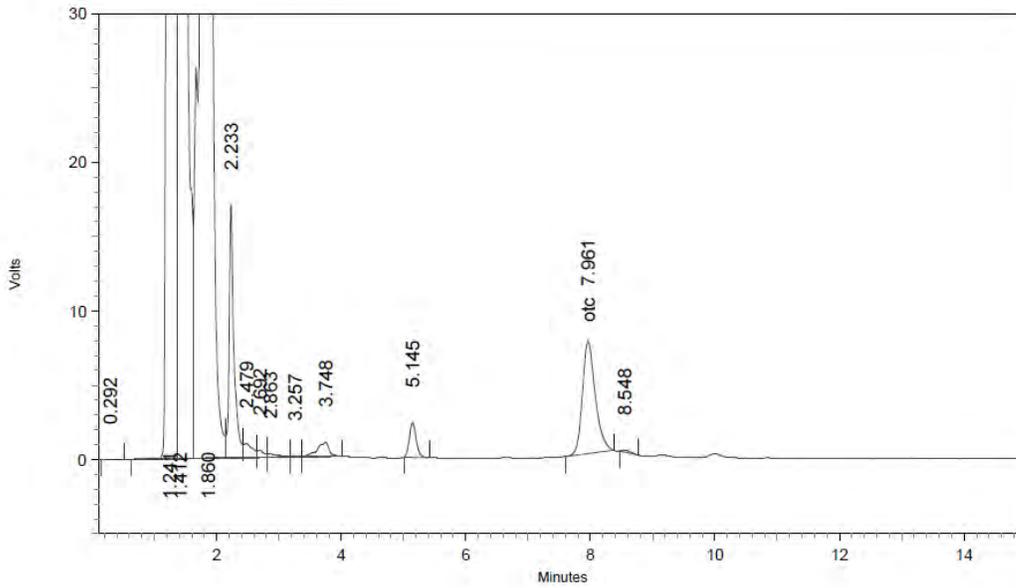


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.855	26013	7839.06



TA-6 OTC 23-Mayo-2016

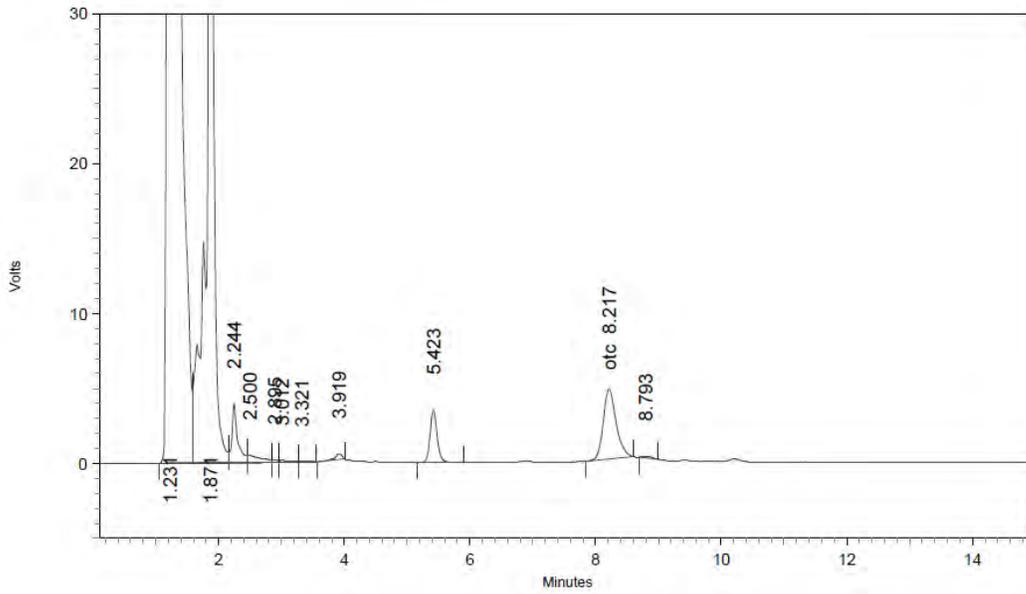


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.961	108957	7233.89



TA-7 OTC 23-Mayo-2016

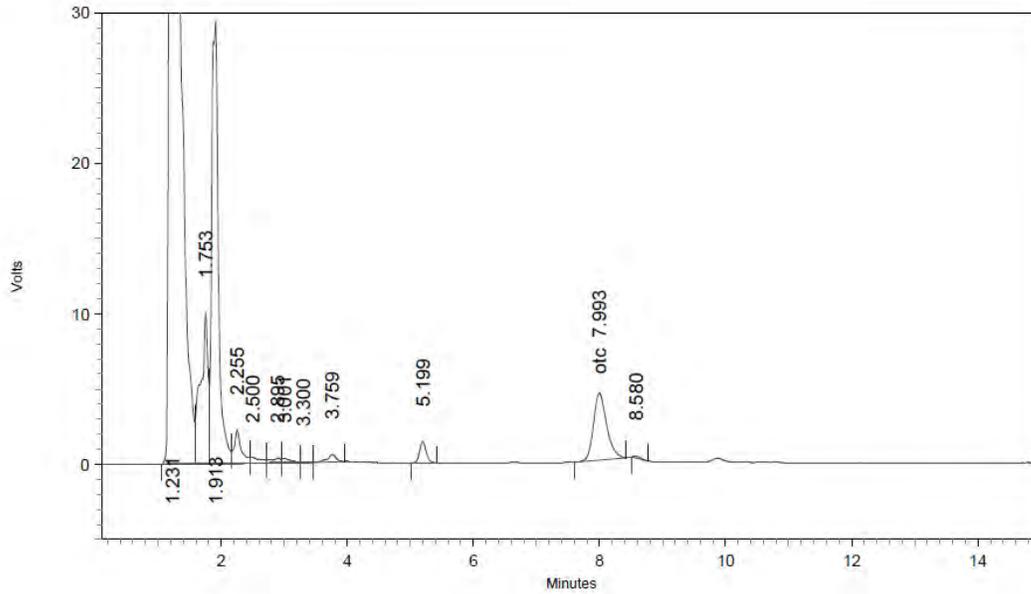


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.217	66396	7761.61



TA-8 OTC 23-Mayo-2016

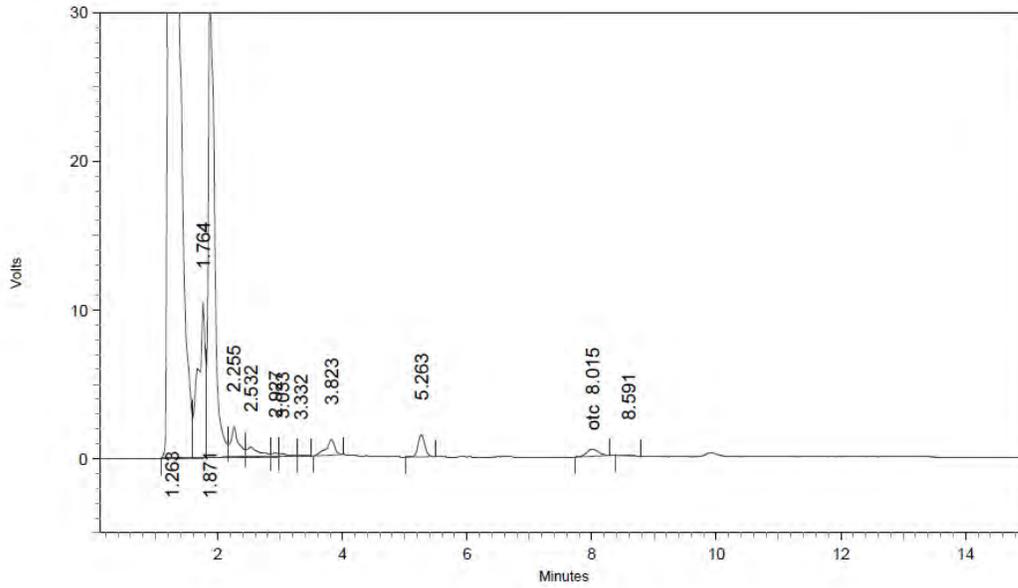


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.993	64922	7056.45



TA-9 OTC 23-Mayo-2016

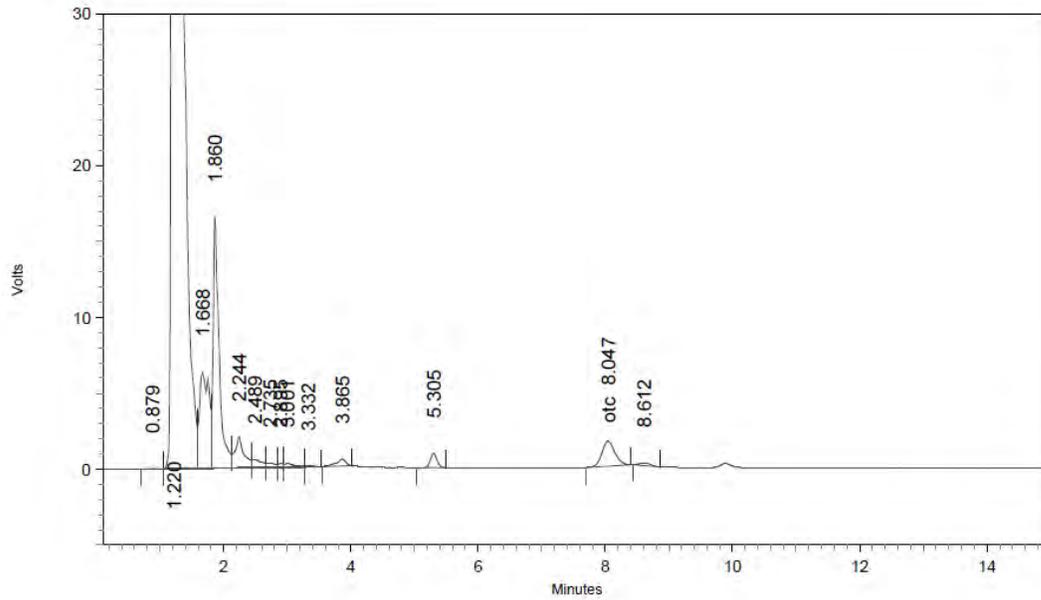


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.015	6409	8051.30



TA-10 OTC 23-Mayo-2016

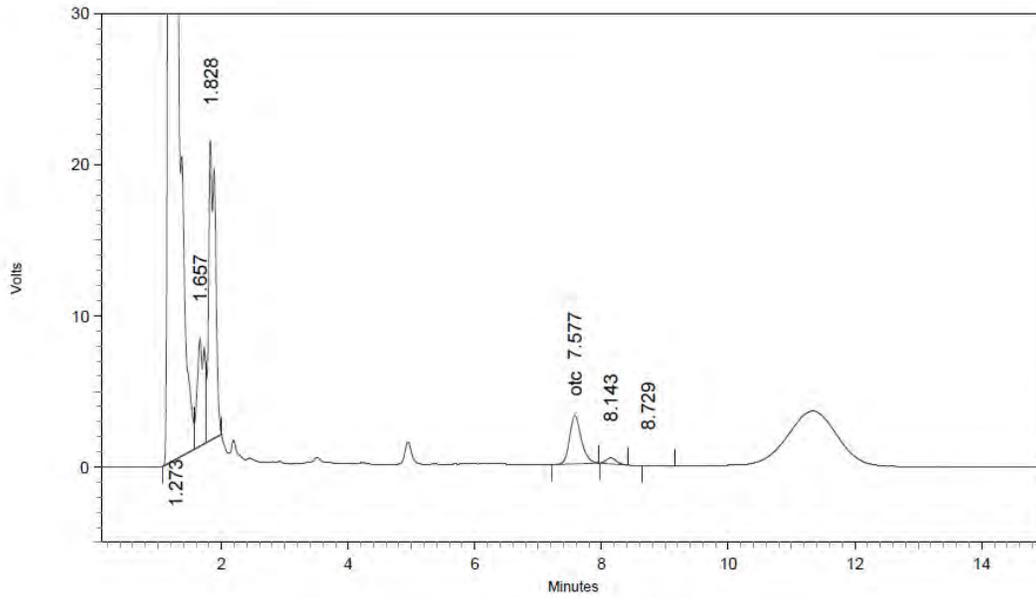


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.047	23542	7216.19



TA-11 OTC 8-Junio-2016

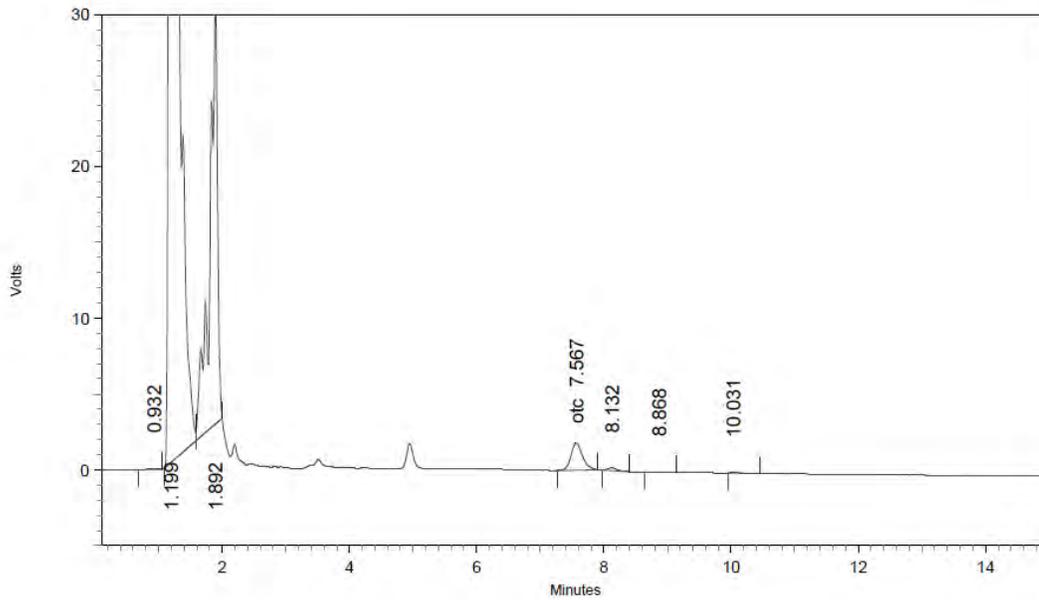


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.577	41052	8013.46



TA 12 OTC 8-Junio-2016

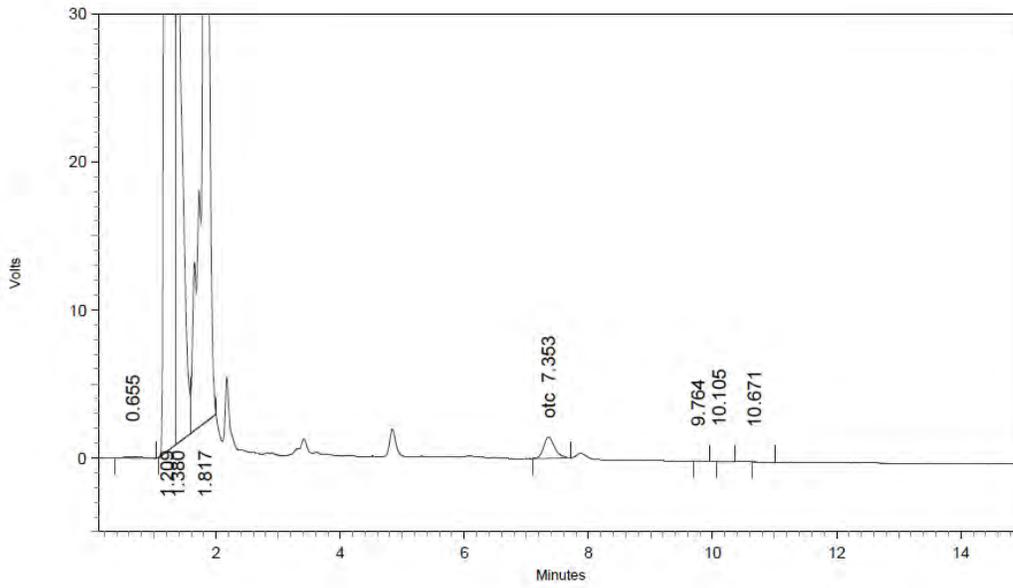


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.567	22441	8393.00



TA 13 OTC 8-Junio-2016

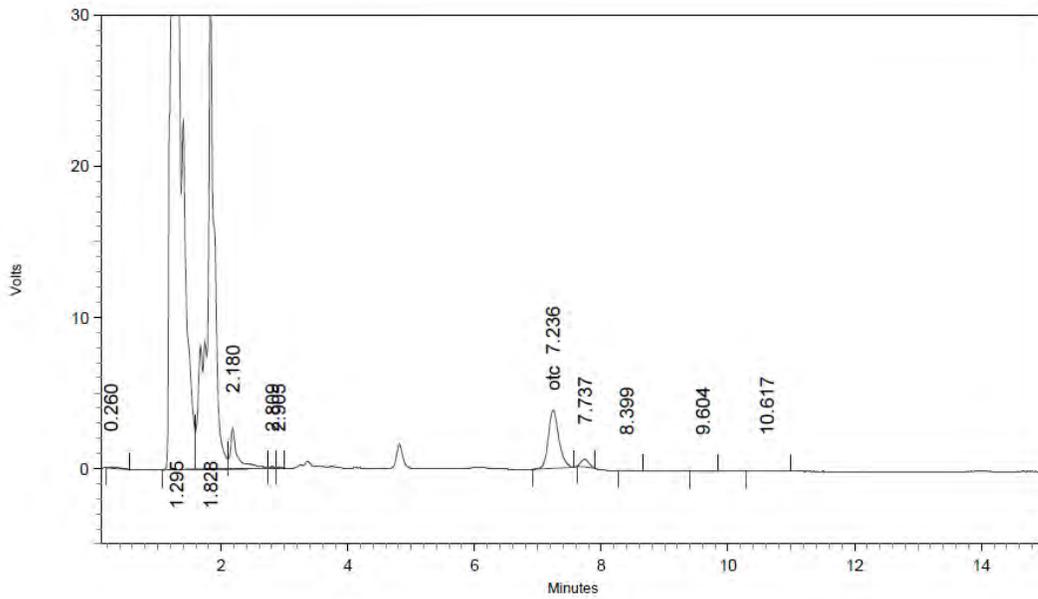


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.353	17492	8413.96



TA 14 OTC 8-Junio-2016

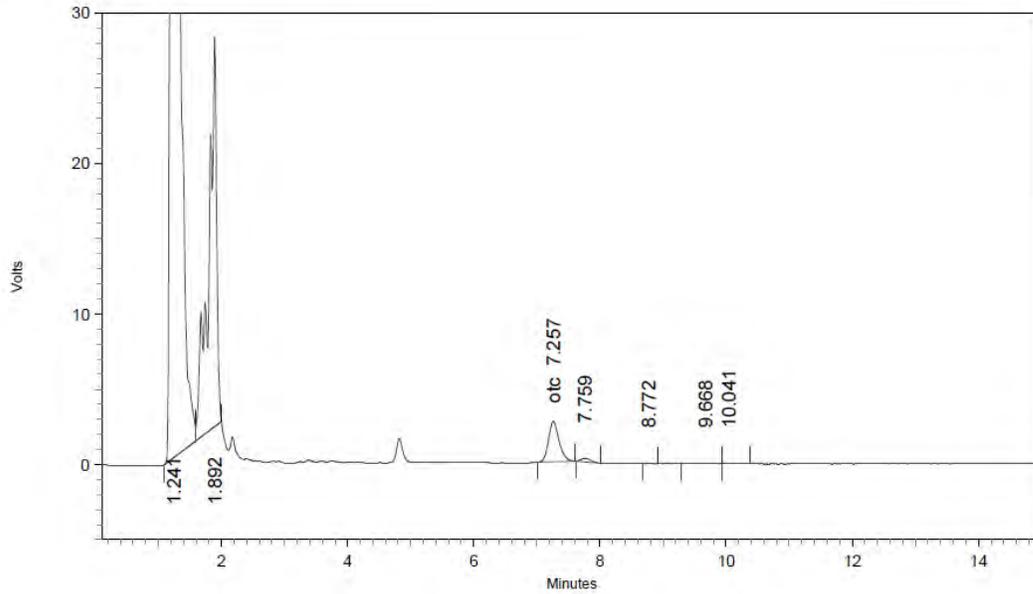


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.236	44184	9290.24



TA 15 OTC 8-Junio-2016

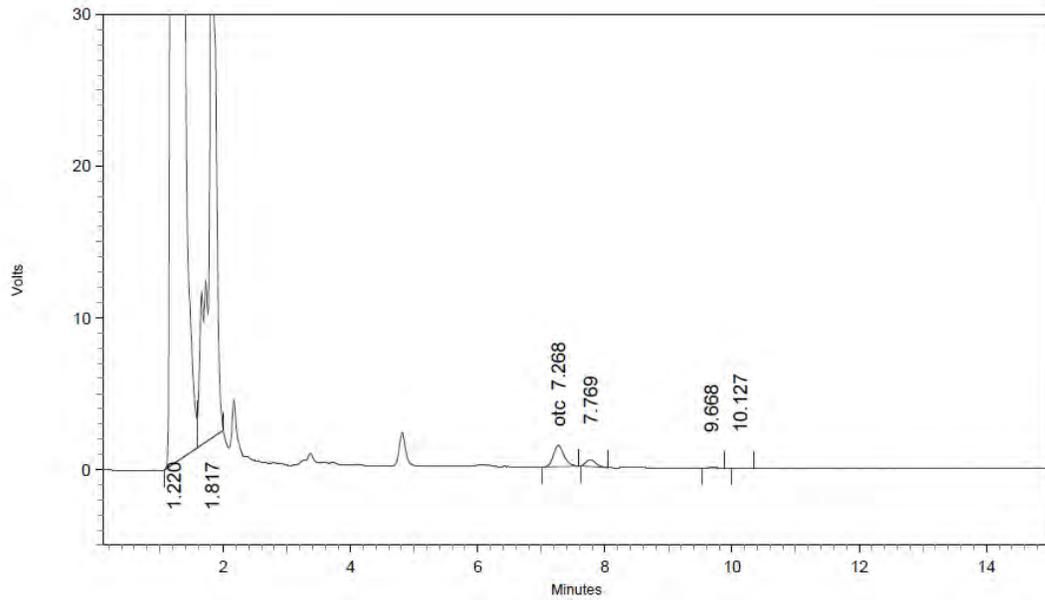


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.257	31411	8896.77



TA 16 OTC 8-Junio-2016

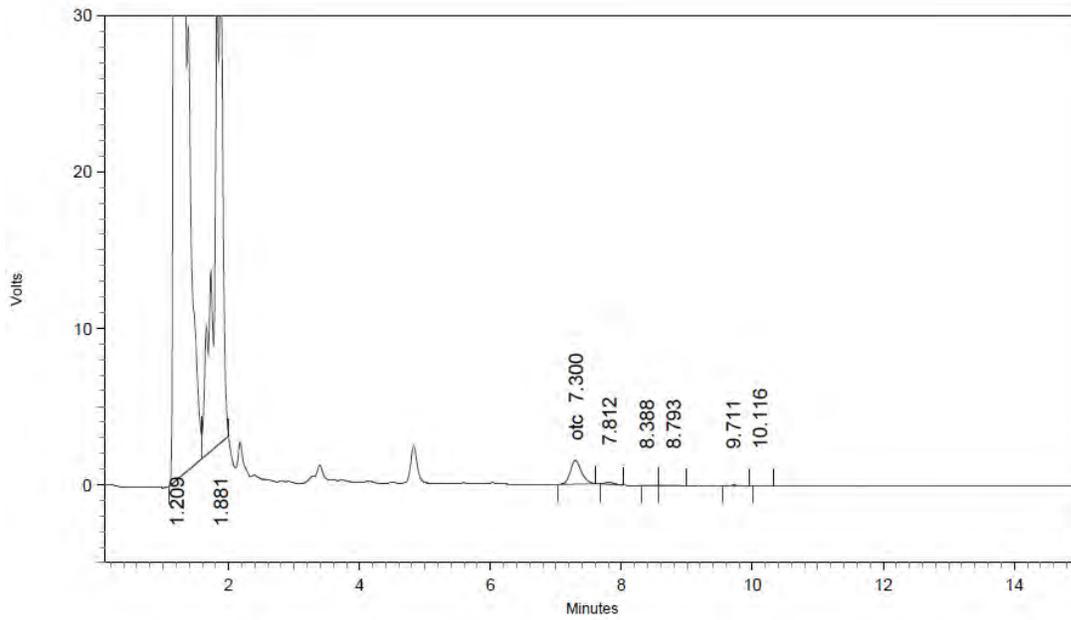


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.268	16268	8673.45



TA 17 OTC 8-Junio-2016

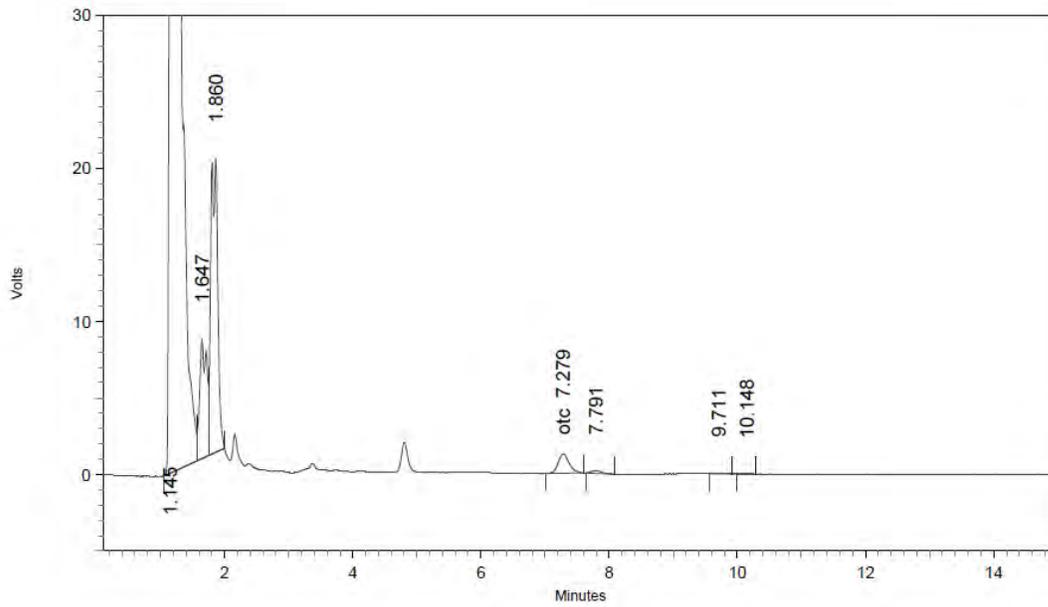


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.300	17819	8783.42



TA 18 OTC 8-Junio-2016

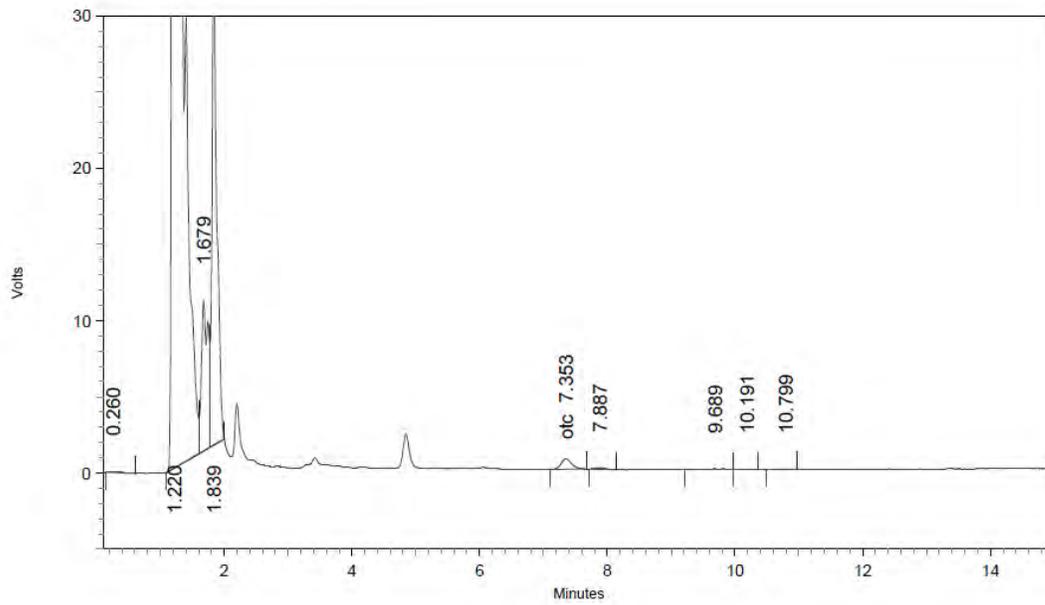


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.279	15086	8501.78



TA 19 OTC 8-Junio-2016

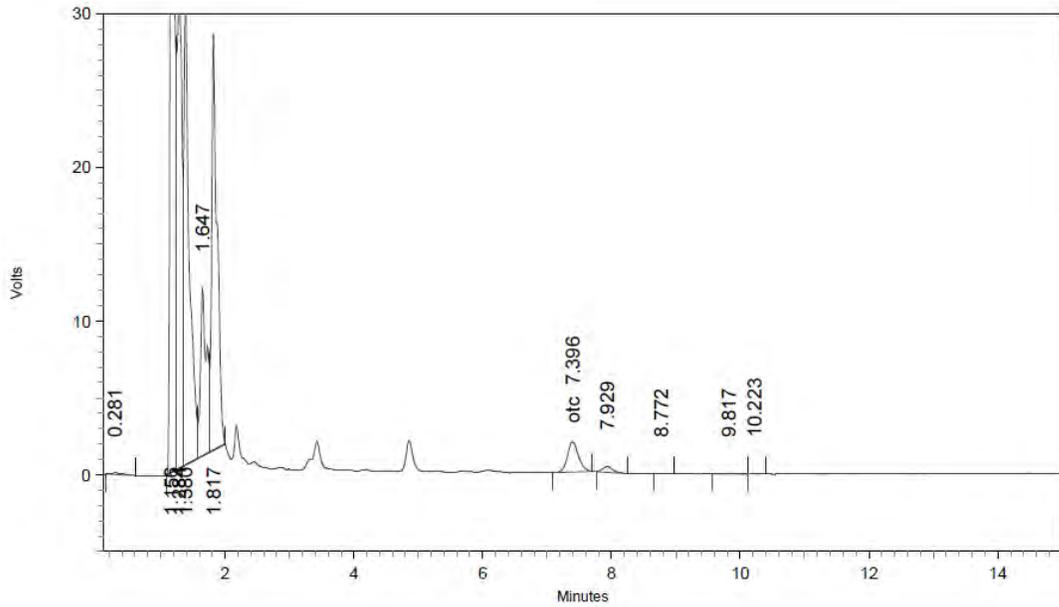


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.353	8262	8460.57



TA 20 OTC 8-Junio-2016

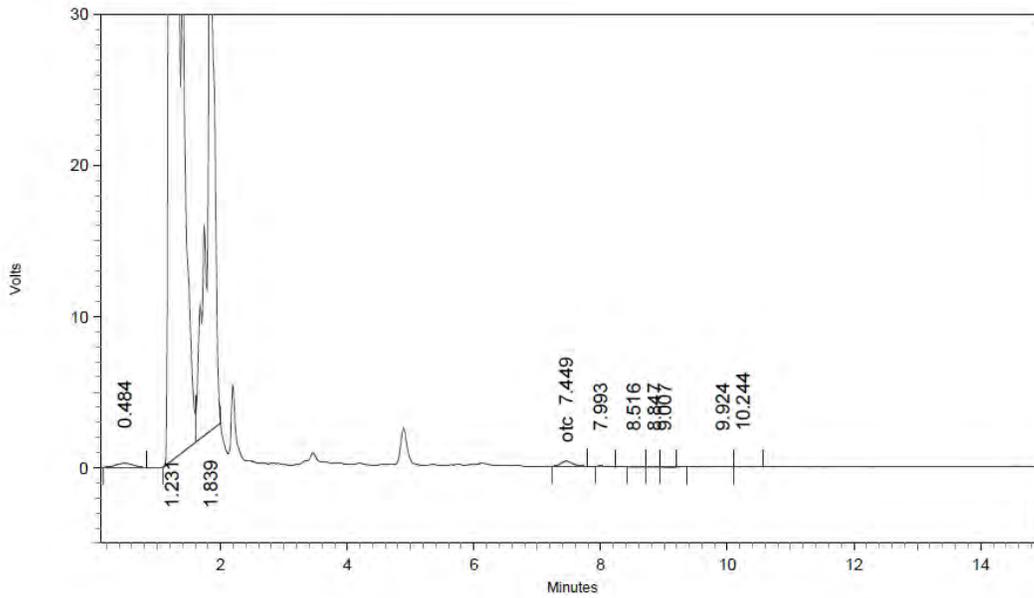


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.396	23587	8757.51



TA 21 OTC 8-Junio-2016

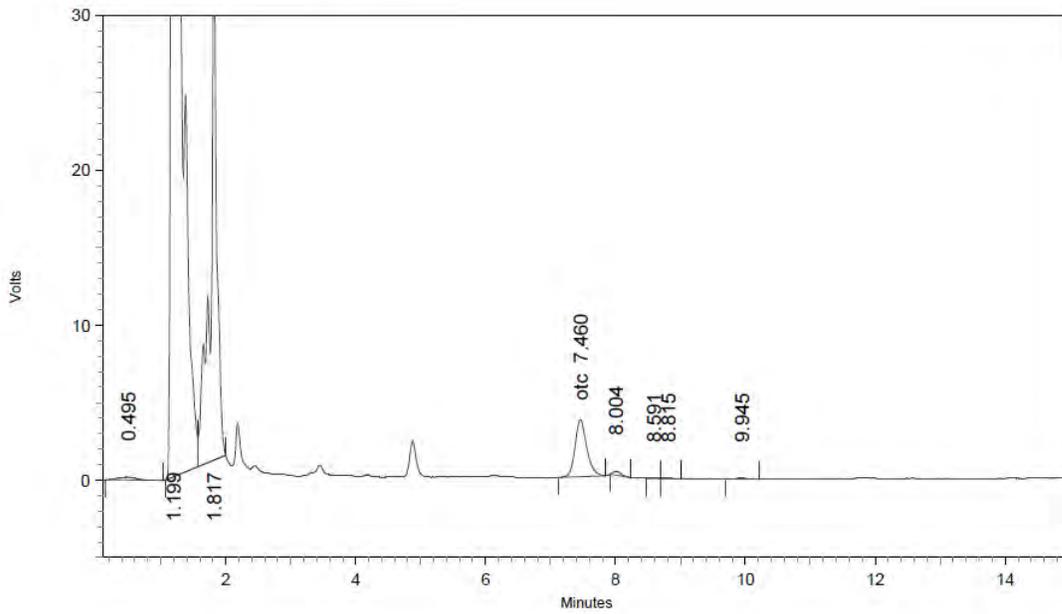


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.449	4391	8208.05



TA 22 OTC 8-Junio-2016

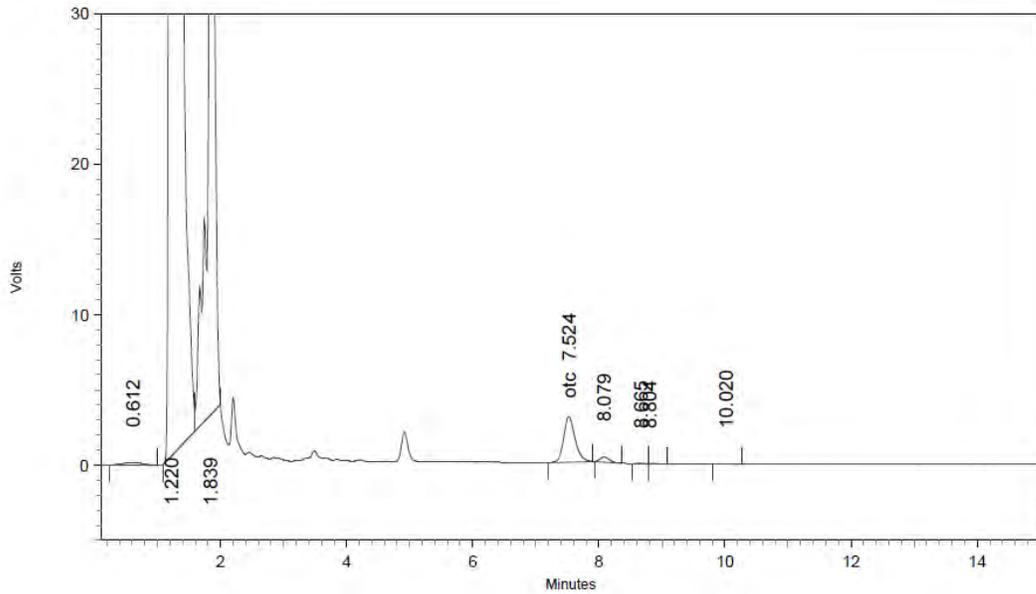


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.460	45844	8540.75



TA 23 OTC 8-Junio-2016

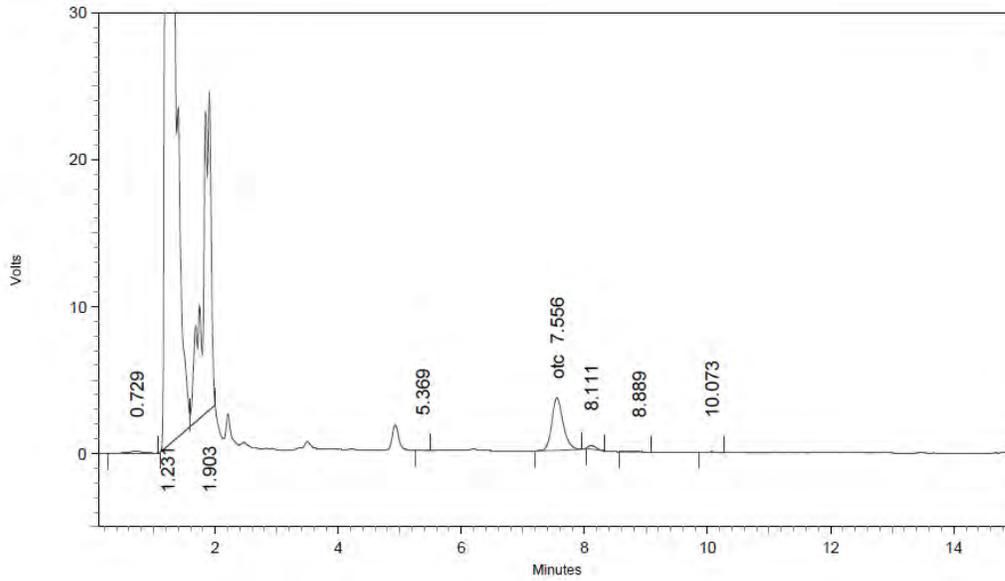


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.524	37992	8264.71



TA 24 OTC 8-Junio-2016

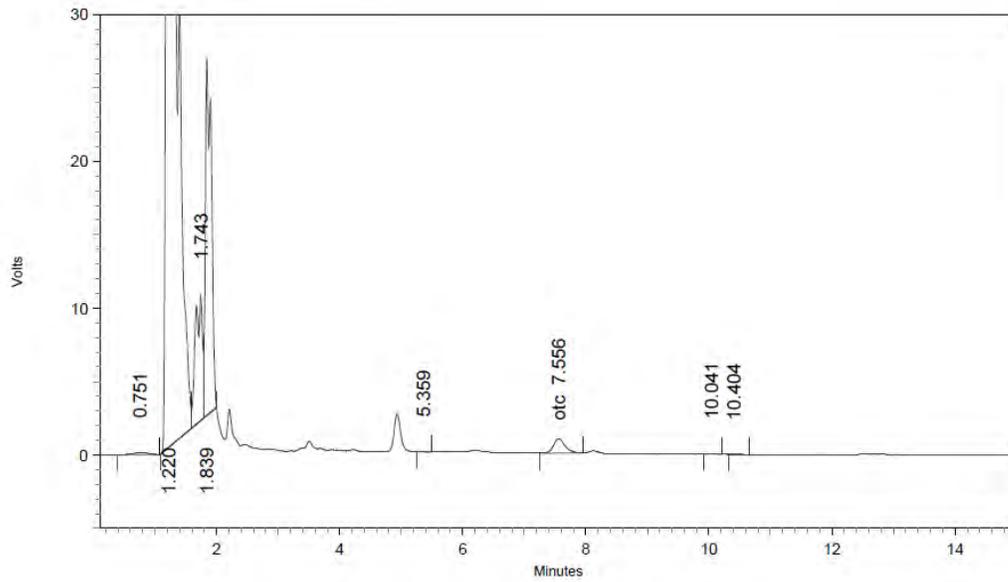


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.556	45883	8217.67



TA 25 OTC 8-Junio-2016

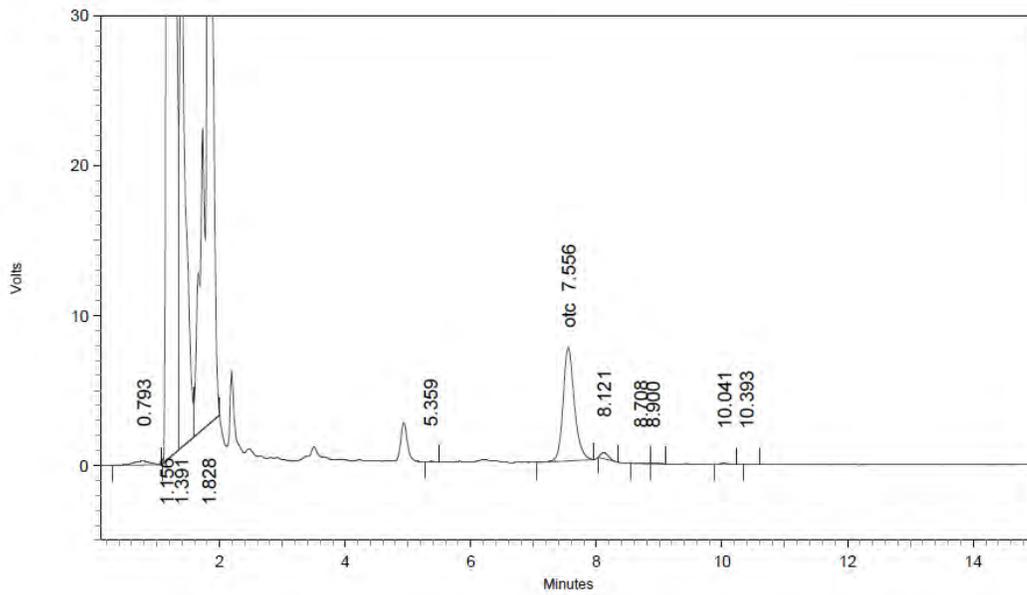


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.556	12640	7968.04



TA 26 OTC 8-Junio-2016

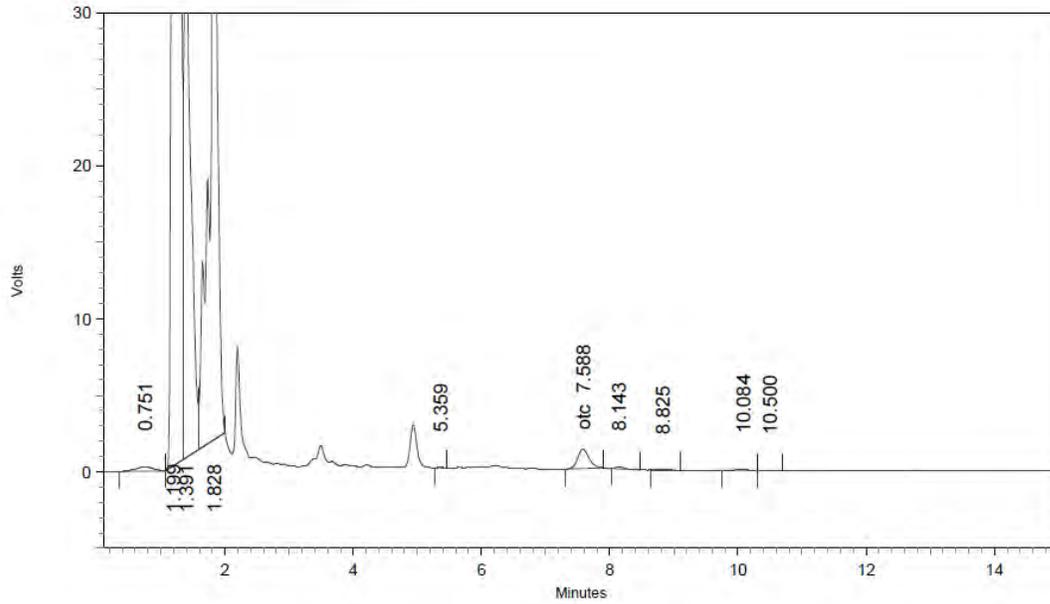


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.556	94257	8758.70



TA 27 OTC 8-Junio-2016

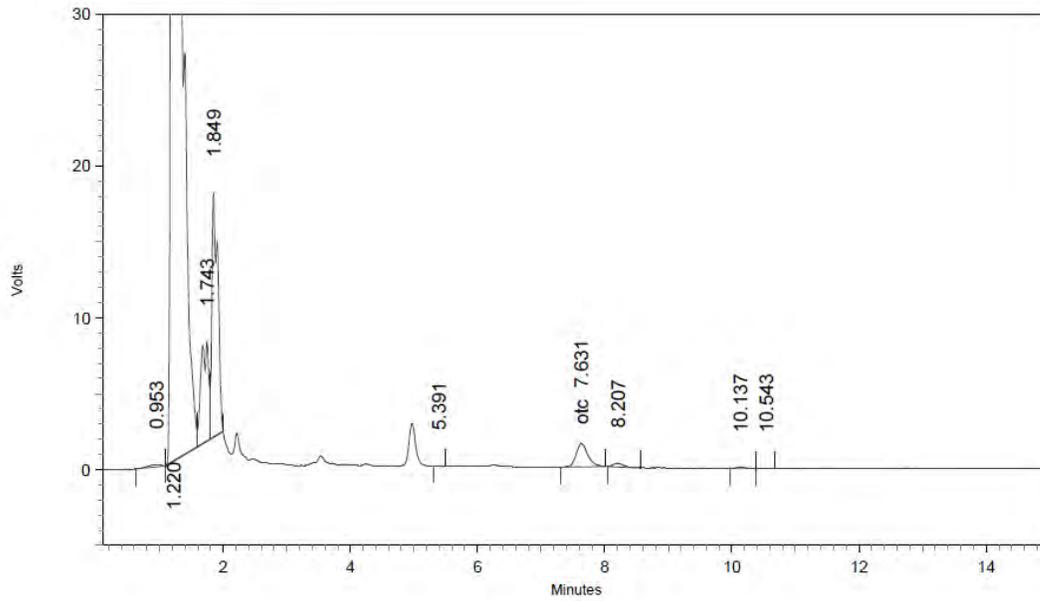


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.588	15748	8490.48



TA 28 OTC 8-Junio-2016

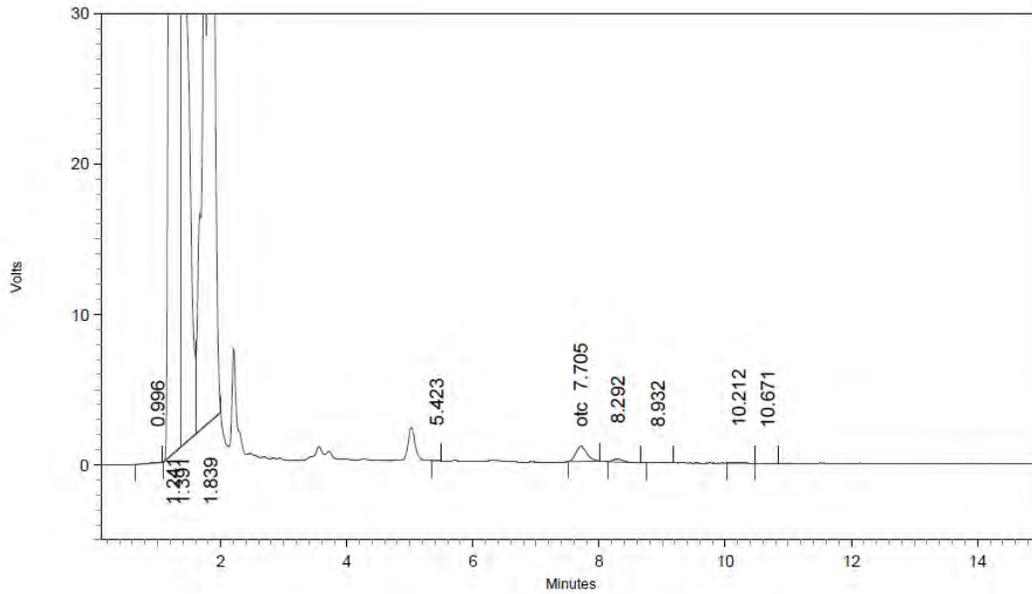


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.631	19729	8113.13



TA 29 OTC 8-Junio-2016

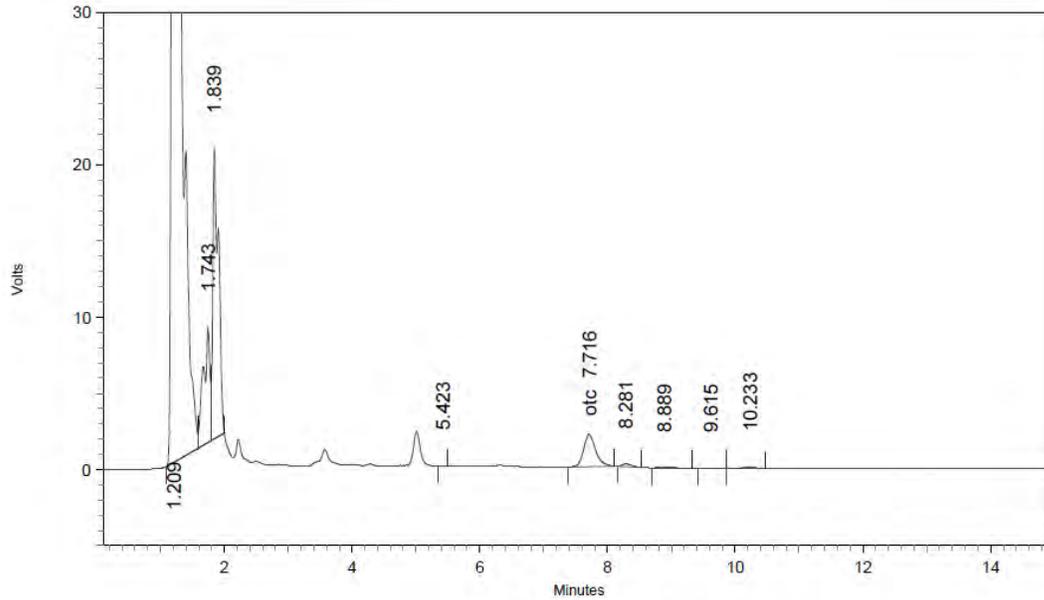


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.705	12166	8746.90



TA 30 OTC 8-Junio-2016

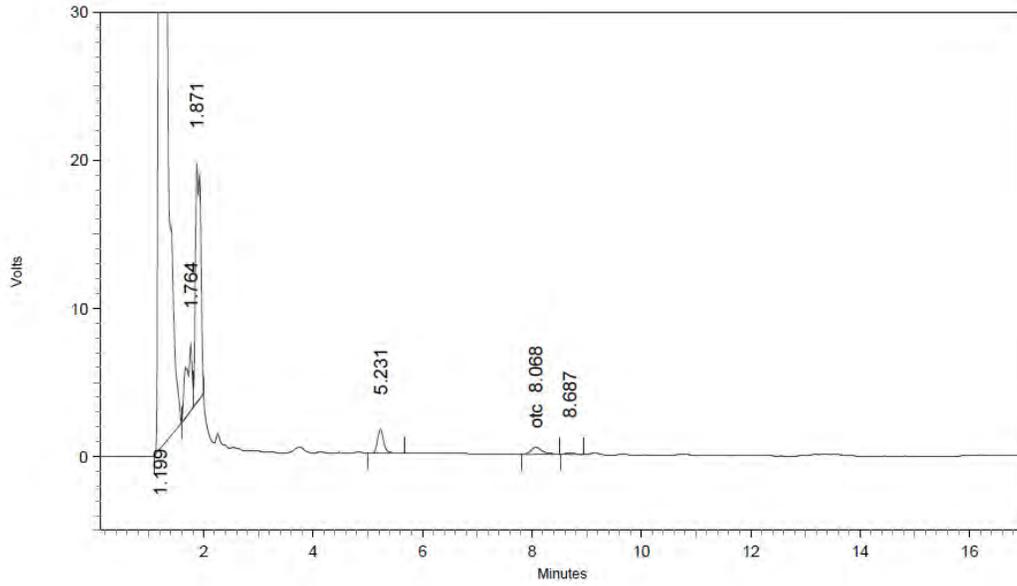


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.716	27702	8146.75



TA-31 OTC 22-Junio-2016

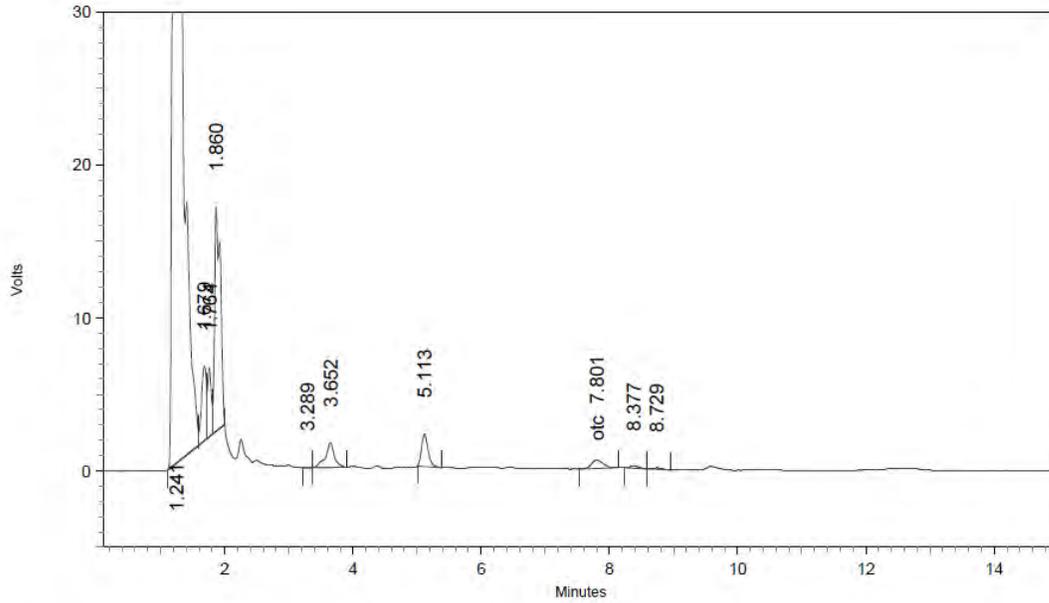


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.068	6670	8018.46



TA-32 OTC 21 Junio-2016

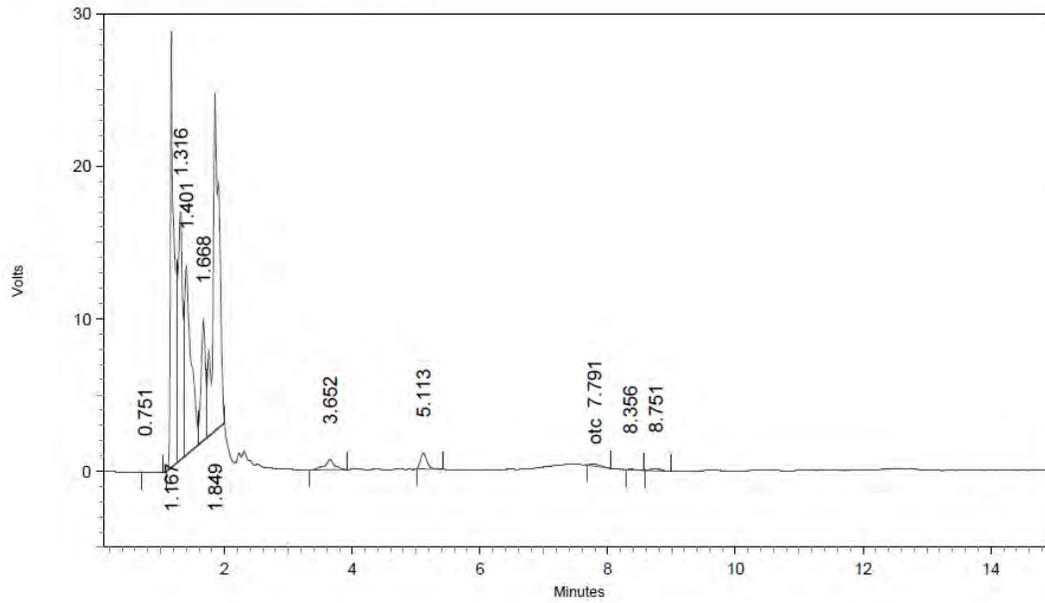


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.801	6973	8120.76



TA-33 OTC 21 Junio-2016

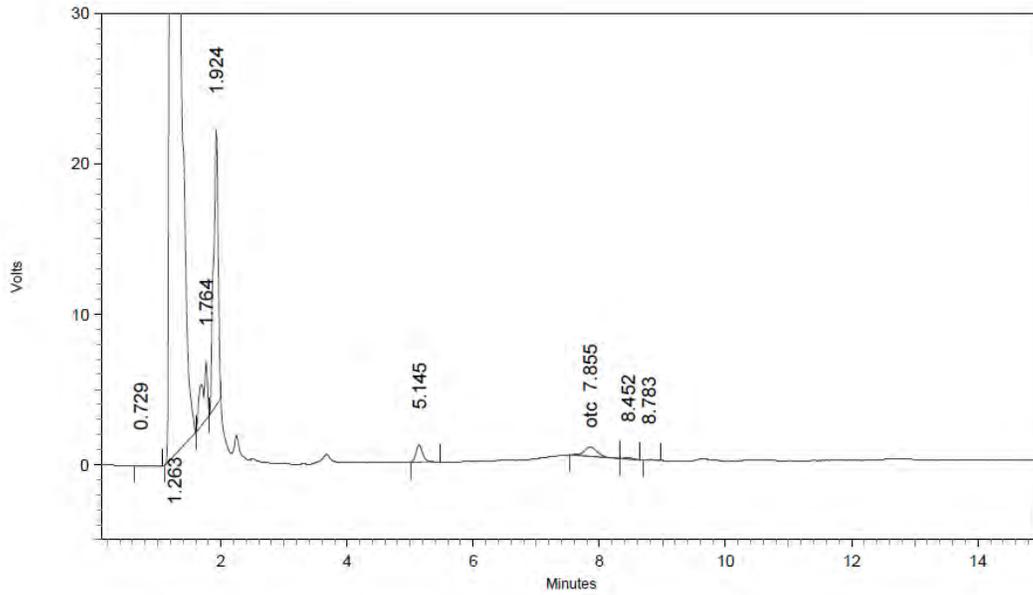


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.791	1545	10404.85



IA-34 OTC 21 Junio-2016

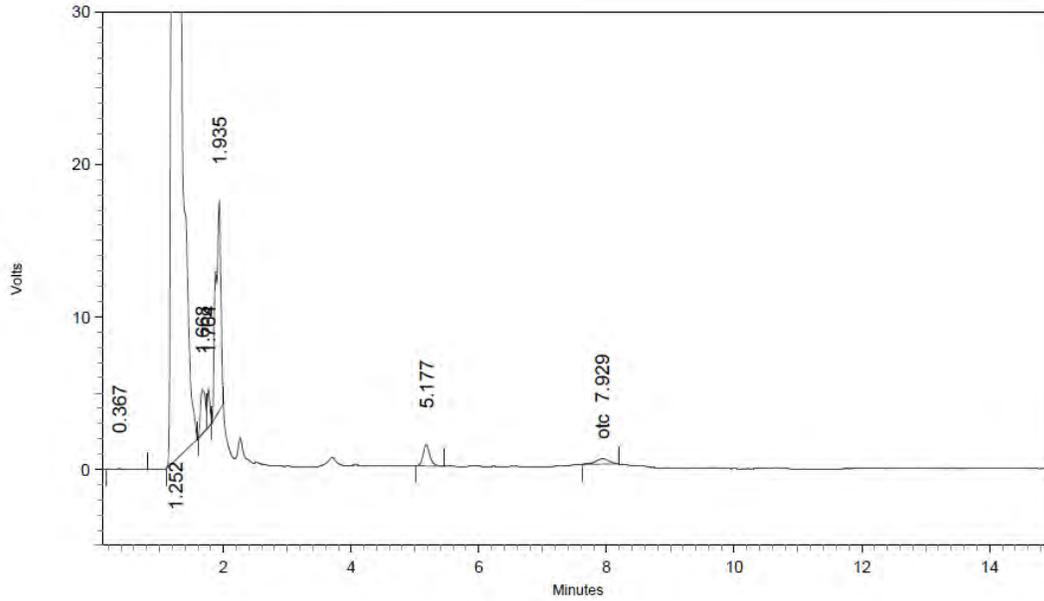


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.855	9028	7313.06



TA-35 OTC 21 Junio-2016

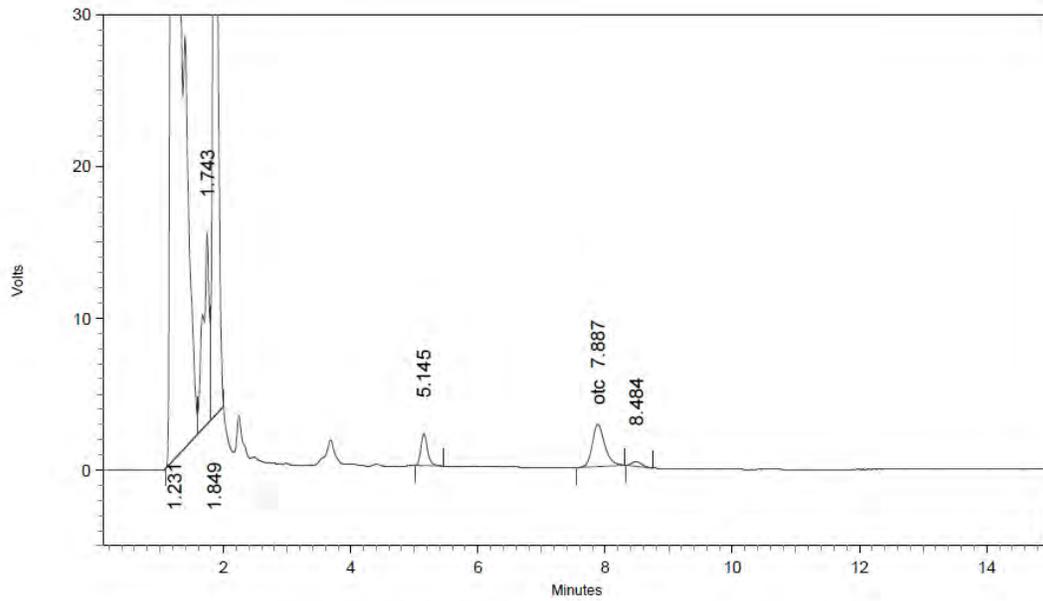


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.929	5099	7173.71



TA-36 OTC 21 Junio-2016

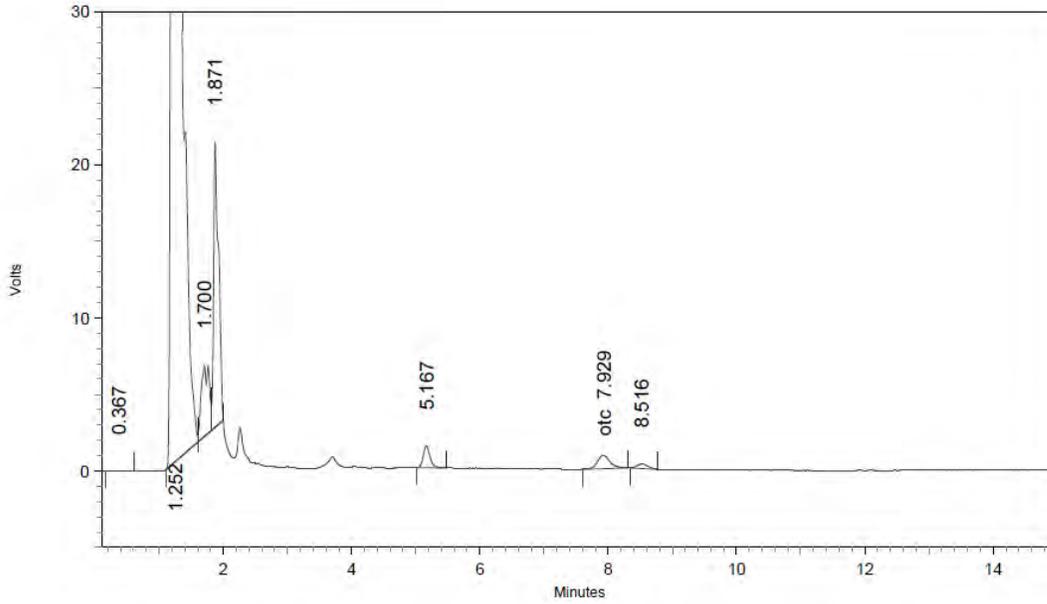


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.887	38124	7848.16



TA-37 OTC 21 Junio-2016

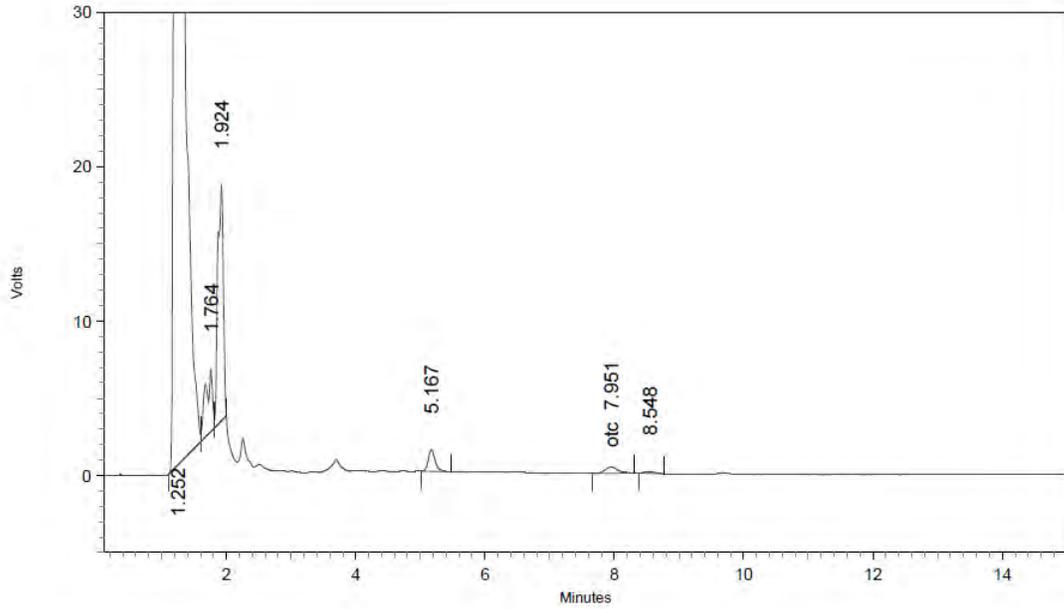


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.929	11867	7900.39



TA-38 OTC 21 Junio-2016

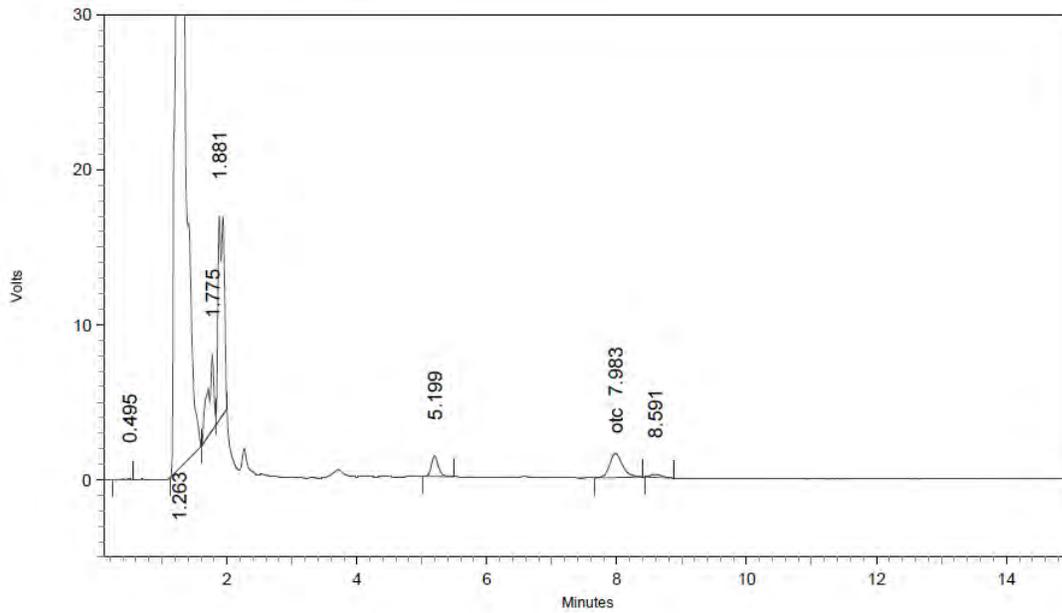


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.951	5479	8063.49



TA-39 OTC 21 Junio-2016

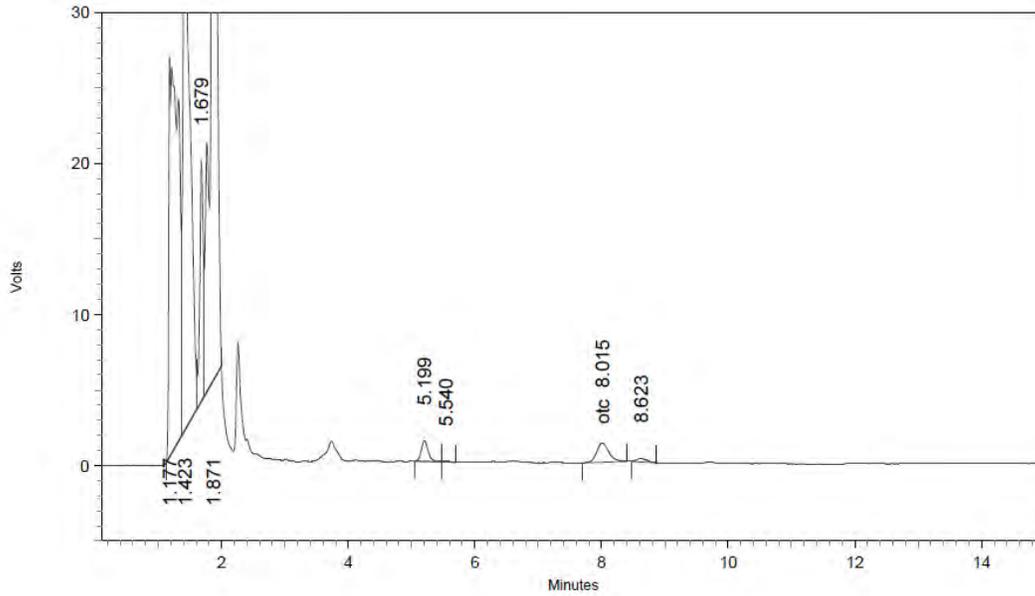


2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	7.983	21414	7877.91



TA-40 OTC 21 Junio-2016



2: 355 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Theoretical plates
otc	8.015	17071	8154.85

A N E X O 9

Acta de reunión de coordinación.



Valparaíso, 27 de mayo de 2015.

Acta reunión de coordinación N° 1

Proyecto FIPA N°2014-91: “Impactos asociados con el uso extra etiqueta del principio activo oxitetraciclina, vía intraperitoneal en centros de cultivo de salmónidos sobre el programa de control de fármacos vigente.”

Fecha de reunión : Miércoles, 27 de mayo de 2015

1. Asistencia reunión

- Luis Carroza (FIPA)
- Maureen Alcayaga (Subpesca)
- Sergio Contreras (IFOP)
- Luis Norambuena (IFOP)
- Patricio Medina (Sernapesca)
- Mario Algüerno (Sernapesca)

2. Temario reunión

El Sr. Sergio Contreras de IFOP realiza una presentación general del proyecto, presentando los objetivos, metodología, plan de trabajo y resultados esperados. Algunos aspectos especialmente tratados fueron los siguientes:

- **Productos terapéuticos a evaluar:**
 - Sernapesca menciona que actualmente existe un producto con principio activo oxitetraciclina (OTC) con registro para uso en salmónidos vía intraperitoneal, perteneciente al laboratorio farmacéutico Veterquímica. Sin embargo, persiste el uso en la industria salmonicultora de otros productos por medio de la figura extraetiqueta.



- Se requiere hacer una recopilación de información que permita conocer a nivel de campo, cuales son los productos y en qué proporción estos son utilizados.
 - Una vez conocida esa información, se deberían consensuar los productos que se evaluarán en el estudio.
- Estudios en condiciones controladas:
 - IFOP aclara que en los estudios de condiciones controladas se intentará evaluar más de un producto comercial. Los estudios en condiciones controladas deben ser lo más semejantes a las condiciones de los estudios en terreno, no obstante, debe considerarse que los primeros se realizan con peces sanos y los segundos con peces enfermos.
 - Los productos que se evaluarán en el estudio, se deberían consensuar para que se pueda hacer una correcta comparación con los abordados en los estudios de campo.
 - Estudios de campo:
 - IFOP indica que se propone muestrear al menos un centro de cultivo por especie (como máximo 3 por especie). Se indica que se solicitará a las empresas la información productiva de los tratamientos (principio activo utilizado, dosis, T° agua, tamaño de peces, etc.). Se aclara que la realización de este objetivo en las condiciones indicadas, depende de la disposición de las empresas productoras a colaborar con los estudios, permitiendo el acceso a sus instalaciones y a la entrega del número de peces necesarios. Se aclara que las empresas no pueden realizar el tratamiento con OTC inyectable, si los peces no presentan un cuadro infeccioso confirmado que justifique su utilización.
 - IFOP indica que se intentará muestrear centros de cultivo de zonas geográficas con diferentes temperaturas.



- IFOP indica que hay un compromiso previo con la empresa Salmones Antártica para realizar estos muestreos, sin embargo luego de recibir la información que se solicitará al Sernapesca, se analizará la factibilidad de agregar otras empresas.
- Otros:
 - Sernapesca indica que uno de los objetivos que dan origen al proyecto es generar información para que los veterinarios de las empresas puedan conocer los tiempos de resguardo necesarios cuando utilicen OTC inyectable.
 - La Subpesca solicita que se envíen algunas contramuestras al Laboratorio de Referencia de la U. de Chile.
 - El FIP solicita que si hay algún punto del proyecto que no se pueda cumplir o un eventual retraso en la entrega de informes, se comunique con anticipación por escrito, justificando la situación.
 - La Subpesca solicita al IFOP que confeccione las actas de las reuniones de coordinación.

3. Acuerdos

- IFOP realizará una solicitud formal al Sernapesca (con copia al FIP), cuya finalidad es obtener información de las diferentes presentaciones de oxitetraciclina intraperitoneal que se están utilizando en la industria, sus dosis y las empresas que la utilizaron.
- Una vez conocida esa información, IFOP enviará a Subpesca y Sernapesca una propuesta de los productos terapéuticos a evaluar.
- Antes del inicio de los estudios, los protocolos desarrollados por IFOP para los estudios en condiciones controladas y de campo, serán presentados a Subpesca y Sernapesca para que hagan entrega de sus comentarios.



- IFOP enviará dentro las posibilidades técnicas de disponibilidad de muestra suficiente, parte de las muestras obtenidas en los estudios, al Laboratorio de Referencia de la Universidad de Chile.
- Previo a la ejecución del punto anterior, tanto Subpesca como Sernapesca se comprometen a contactar a los encargados de dicho laboratorio, para verificar la factibilidad de recepción y las condiciones que ello implique.

A N E X O 10

Personal participante por actividad.



ANEXO 10: Asignación de personal profesional y técnico

Distribución horas hombre por mes

Sergio Contreras Lynch		Horas hombre / Mes																				
Actividades por objetivo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Obj.1	Revisión bibliográfica y de normativas	45	45																			
	Identificación del tipo de muestra para estudios de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal.	32	32																			
	Elaboración de protocolos de estudio		32	32																		
	Estudio de depleción en condiciones controladas				32	32	32	32	32	32	32											
	Generación de curvas de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal en condiciones controladas						32	32	32	32	32	32										
	Estudio de depleción en condiciones de campo				32	32	32	32	32	32	32											
	Generación de curvas de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal en condiciones de campo						32	32	32	32	32	32										
Obj.2	Análisis y comparación de las curvas de depleción obtenidas bajo condiciones controladas versus las obtenidas bajo condiciones de campo												45	45								
	Identificación y evaluación de los impactos del uso extra etiqueta de oxitetraciclina aplicada intraperitonealmente sobre el actual programa de control de fármacos.														45	45	45					
	Propuesta de ajustes para que el uso extra etiqueta de oxitetraciclina intraperitoneal.														45	45	45					
Act. Gral.	Reunión de coordinación	8																				
	Informes de avance					24					24											
	Taller de presentación y discusión de resultados																		16			
	Informe prefinal																	24				
	Informe final																			24		



Luis Norambuena Subiabre		Horas hombre / Mes																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Actividades por objetivo																						
Obj.1	Revisión bibliográfica y de normativas	16	16																			
	Identificación del tipo de muestra para estudios de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal.	16	16																			
	Elaboración de protocolos de estudio		16	16																		
	Estudio de depleción en condiciones controladas				32	32	32	32	32	32	32											
	Generación de curvas de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal en condiciones controladas						45	45	45	45	45	45										
	Estudio de depleción en condiciones de campo				24	24	24	24	24	24	24											
	Generación de curvas de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal en condiciones de campo						45	45	45	45	45	45										
Obj.2	Análisis y comparación de las curvas de depleción obtenidas bajo condiciones controladas versus las obtenidas bajo condiciones de campo												24	24								
	Identificación y evaluación de los impactos del uso extra etiqueta de oxitetraciclina aplicada intraperitonealmente sobre el actual programa de control de fármacos.														24	24	24					
	Propuesta de ajustes para que el uso extra etiqueta de oxitetraciclina intraperitoneal.														16	16	16					
Act. Gral.	Reunión de coordinación	8																				
	Informes de avance					16					16											
	Taller de presentación y discusión de resultados																		16			
	Informe prefinal																	16				
	Informe final																			16		



Mylena Menanteau Mancilla / Claudia Spinetto		Horas hombre / Mes																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17				
Actividades por objetivo																						
Obj.1	Revisión bibliográfica y de normativas	5	5																			
	Identificación del tipo de muestra para estudios de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal.	10	10																			
	Elaboración de protocolos de estudio		5	5																		
	Estudio de depleción en condiciones controladas				45	45	45	45	45	45	45											
	Generación de curvas de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal en condiciones controladas						20	20	20	20	20	20										
	Estudio de depleción en condiciones de campo				45	45	45	45	45	45	45											
	Generación de curvas de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal en condiciones de campo						20	20	20	20	20	20										
Obj.2	Análisis y comparación de las curvas de depleción obtenidas bajo condiciones controladas versus las obtenidas bajo condiciones de campo												20	20								
	Identificación y evaluación de los impactos del uso extra etiqueta de oxitetraciclina aplicada intraperitonealmente sobre el actual programa de control de fármacos.														20	20	20					
	Propuesta de ajustes para que el uso extra etiqueta de oxitetraciclina intraperitoneal.														10	10	10					
Act. Gral.	Reunión de coordinación	8																				
	Informes de avance					16					16											
	Taller de presentación y discusión de resultados																			16		
	Informe prefinal																	16				
	Informe final																				16	



Mario Rivas Flores		Horas hombre / Mes																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Actividades por objetivo																						
Obj.1	Revisión bibliográfica y de normativas	8	8																			
	Identificación del tipo de muestra para estudios de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal.	8	8																			
	Elaboración de protocolos de estudio		8	8																		
	Estudio de depleción en condiciones controladas				45	45	45	45	45	45	45											
	Generación de curvas de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal en condiciones controladas																					
	Estudio de depleción en condiciones de campo				45	45	45	45	45	45	45											
	Generación de curvas de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal en condiciones de campo																					
Obj.2	Análisis y comparación de las curvas de depleción obtenidas bajo condiciones controladas versus las obtenidas bajo condiciones de campo																					
	Identificación y evaluación de los impactos del uso extra etiqueta de oxitetraciclina aplicada intraperitonealmente sobre el actual programa de control de fármacos.																					
	Propuesta de ajustes para que el uso extra etiqueta de oxitetraciclina intraperitoneal.																					
Act. Gral.	Reunión de coordinación	8																				
	Informes de avance					16				16												
	Taller de presentación y discusión de resultados																				16	
	Informe prefinal																				16	
	Informe final																					16



Renato Oyarzún Martínez		Horas hombre / Mes																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Actividades por objetivo																						
Obj.1	Revisión bibliográfica y de normativas																					
	Identificación del tipo de muestra para estudios de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal.																					
	Elaboración de protocolos de estudio																					
	Estudio de depleción en condiciones controladas				30	30	30	30	30	30	30											
	Generación de curvas de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal en condiciones controladas						0	0	0	0	0	0										
	Estudio de depleción en condiciones de campo				30	30	30	30	30	30	30											
	Generación de curvas de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal en condiciones de campo						0	0	0	0	0	0										
Obj.2	Análisis y comparación de las curvas de depleción obtenidas bajo condiciones controladas versus las obtenidas bajo condiciones de campo																					
	Identificación y evaluación de los impactos del uso extra etiqueta de oxitetraciclina aplicada intraperitonealmente sobre el actual programa de control de fármacos.														8	8	8					
	Propuesta de ajustes para que el uso extra etiqueta de oxitetraciclina intraperitoneal.														8	8	8					
Act. Gral.	Reunión de coordinación	8																				
	Informes de avance					16					16											
	Taller de presentación y discusión de resultados																		16			
	Informe prefinal																16					
	Informe final																		16			



Carolina Asencio Almonacid		Horas hombre / Mes																				
Actividades por objetivo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Obj.1	Revisión bibliográfica y de normativas	24	24																			
	Identificación del tipo de muestra para estudios de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal.	16	16																			
	Elaboración de protocolos de estudio		16	16																		
	Estudio de depleción en condiciones controladas				16	16	0	0	0	0	0											
	Generación de curvas de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal en condiciones controladas						0	0	0	0	0	0										
	Estudio de depleción en condiciones de campo				16	16	0	0	0	0	0											
	Generación de curvas de depleción de oxitetraciclina vía intraperitoneal en condiciones de campo						0	0	0	0	0	0										
Obj.2	Análisis y comparación de las curvas de depleción obtenidas bajo condiciones controladas versus las obtenidas bajo condiciones de campo												0	0								
	Identificación y evaluación de los impactos del uso extra etiqueta de oxitetraciclina aplicada intraperitonealmente sobre el actual programa de control de fármacos.														0	0	0					
	Propuesta de ajustes para que el uso extra etiqueta de oxitetraciclina intraperitoneal.														0	0	0					
Act. Gral.	Reunión de coordinación	24																				
	Informes de avance					16					0											
	Taller de presentación y discusión de resultados																		0			
	Informe prefinal																	0				
	Informe final																			0		

A N E X O 11

Memoria de cálculo costeo propuesta.



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO / DIVISIÓN INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA

Anexo 11: Memoria de cálculo costeo propuesta						
Centro de actividad		HH				Detalle
		Unidad	Valor	Consumo	Costo	
Productores	Toma de muestra	\$/hr	3.000	2	6.000	Considera valor HH de operario. Se consideran 2 personas trabajando 1 hr
	Envío de muestra	\$/hr	7.500	2	15.000	Considera valor HH de profesional. Se consideran 1 persona trabajando 2 hr
	Coordinación	\$/hr	7.500	2	15.000	Considera valor HH de profesional. Se consideran 1 persona trabajando 2 hr
	Traslado personal					No hay diferencia por mayor n de muestra
Laboratorios	Análisis de muestra	\$/hr				El valor de la muestra es unitario y costo de HH está incorporado en valor de análisis
Sernapesca	Revisión de la información	\$/hr	7.500	1	7.500	Considera valor HH de profesional. Se consideran 1 persona trabajando 1 hora
	Análisis de información	\$/hr	15.000	1	15.000	Considera valor HH jefe departamento (\$15000) y 1 profesional (\$7500). Se considera trabajo de 1 hora para profesional y 30 min. de jefatura
	Toma de decisiones	\$/hr	15.000	1	15.000	Considera valor HH jefe departamento (\$15000) y 1 profesional (\$7500). Se considera trabajo de 1 hora para profesional y 30 min. de jefatura
					73.500	
Centro de actividad		Insumos				Detalle
		Unidad	Valor	Consumo	Costo	
Productores	Toma de muestra	unidad	9.855	10	98.550	Se considera valor de cada pez extra de USD\$15 para peso precosecha de S. salar de 4,5 kg. Considera solo costo adicional de 10 peces
	Envío de muestra	unidad	6.000	2	12.000	Se consideran 2 cajas de aislapol de 70 lb más 10 gelpack por caja
	Coordinación					
	Traslado personal					
Laboratorios	Análisis de muestra					El valor de la muestra es unitario y costo de insumos está incorporado en valor de análisis
Sernapesca	Revisión de la información					
	Análisis de información					
	Toma de decisiones					
					110.550	
Centro de actividad		Servicios				Detalle
		Unidad	Valor	Consumo	Costo	
Productores	Toma de muestra					
	Envío de muestra	unidad	30.000	1	30.000	Considera 10 peces en flete aéreo para tramo Balmaceda-Puerto Montt
	Coordinación					
	Traslado personal					
Laboratorios	Análisis de muestra	unidad	105.000	10	1.050.000	Considera el costo de análisis de 10 peces, incluyendo servicio de asistencia en centro durante el muestreo. Considera análisis por HPLC-MS
Sernapesca	Revisión de la información					
	Análisis de información					
	Toma de decisiones					
					1.080.000	
Costo total modificación					1.264.050	Por cada 10 peces extras por evento de muestreo por jaula.



Resumen por centro de actividad y producto					
		HH	Insumos	servicios	Total
Productores	Toma de muestra	6.000	98.550		104.550
	Envio de muestra	15.000	12.000	30.000	57.000
	Coordinaci3n	15.000			15.000
	Traslado personal				
Laboratorios	Análisis de muestra			1.050.000	1.050.000
Sernapesca	Revisi3n de la informaci3n	7.500			7.500
	Análisis de informaci3n	15.000			15.000
	Toma de decisiones	15.000			15.000

A N E X O 12

Base de Datos FIPA N° 2014-91.
(Incluida en el CD al inicio del documento)

A N E X O 13

Lista de participantes de taller de difusión



Taller difusión resultados estudio FIPA 2014-91 - Seminario "Efectos del uso intraperitoneal de oxitetraciclina sobre el programa de control de fármacos en la industria salmonicultura."

División de Investigación en Acuicultura
Puerto Montt, Hotel Gran Pacifico, Salón Patagonia

Día: miércoles 28 de septiembre de 2016

13	Alicia Fuentes Araya	Veterinaria	[Signature]
14	Karen Sánchez Lombardi	Veterinaria	K. Sánchez L.
15	Samuel Valderrama	"	[Signature]
16	Pablo Berner	✓	[Signature]
17	Pamela Pechao	Diagnóstica	[Signature]
18	José Leonardo S.	Diagnóstica	[Signature]
19	Francisco Gallardo	Diagnóstica	[Signature]
20	Daniel Vivar	SALMONES COPAQUELAN	[Signature]
21	Sonia Stolz	Fish Vet group	[Signature]
22	Gustavo Uribe	GERAN	[Signature]
23	CHRISTIAN ORTIZ	FISH VET group	[Signature]
24	Daniel Quirz	SALMONES COPAQUELAN	[Signature]
25	Franco Ute	BAYER	[Signature]



Taller difusión resultados estudio FIPA 2014-91 - Seminario "Efectos del uso intraperitoneal de oxitetraciclina sobre el programa de control de fármacos en la industria salmonicultura."

División de Investigación en Acuicultura
Puerto Montt, Hotel Gran Pacífico, Salón Patagonia

Día: miércoles 28 de septiembre de 2016

26	Leonardo Guzmán	IFOP	[Signature]
27	Daniel Covares	Salmeres Austral	[Signature]
28	Diego Hidalgo	Canachilca	[Signature]
29	JAIRO SANTANA	Comunidades	[Signature]
30	Lorella Corti	Canan Chaca	[Signature]
31	Rodrigo Rojas	Salmeres Austral	[Signature]
32	Roberto Rojas	Unidad	[Signature]
33	Rubén Muñoz	U. Chilca	[Signature]
34	ANMG Riquelme	Asi	[Signature]
35	Salomé A. Quiñero	ADL	[Signature]
36	GERARDO CABRERA F.	AGUASAN	[Signature]
37	Concepción Cabra Larach	Aguasanch	[Signature]
38	Paulo Díaz Ch	Multisport	[Signature]



Taller difusión resultados estudio FIPA 2014-91 - Seminario "Efectos del uso intraperitoneal de oxitetraciclina sobre el programa de control de fármacos en la industria salmonicultura."

División de Investigación en Acuicultura
Puerto Montt, Hotel Gran Pacífico, Salón Patagonia

Día: miércoles 28 de septiembre de 2016

39	Cristian Daza Jn	USARMV-CH	Chil.
40	Patricio Moreno	Veterinario	Chileno
41	Katherine Subiabre	IFOP	Chil.
42	Noelia Vega	IFOP	Chil.
43	Osvaldo Valenzuela	AQUACULTUR	Chil.
44	Jorge Parco P.	VIAMEI	Chil.
45	Eduardo Hoffa	Europharma	Chil.
46	Margarita González J.	IFOP	Chil.
47			
48			
49			
50			
51			

A N E X O 14

Presentación de resultados en taller de difusión



Depleción y tiempos de resguardo, luego de la administración intraperitoneal de Oxitetraciclina en tres especies de salmónidos

Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura 2014-91

*Luis Norambuena Subiabre
Departamento de Salud Hidrobiológica
Instituto de Fomento Pesquero*

Puerto Montt, 28 de Septiembre de 2016





Objetivo general

Evaluar los posibles impactos asociados con el uso extra etiqueta del principio activo oxitetraciclina, administrado por vía intraperitoneal, en centros de cultivo de salmónidos sobre el programa de control de fármacos vigente.

Objetivos específicos

Determinar las curvas de depleción del principio activo oxitetraciclina vía intraperitoneal, bajo condiciones de campo.

Analizar las curvas de depleción obtenidas y evaluar los impactos que éstas podrían tener sobre el actual programa de control de fármacos vigente.



Introducci3n

- La principal enfermedad que afecta a la industria salmonicultora es la Piscirickettsiosis.
- En el 2015, dentro de las mortalidades producidas por causas infecciosas en salm3n del Atl3ntico, Trucha arcofiris y salm3n Coho, el 78,9%, 82,9% y 59,3%, respectivamente fue por Piscirickettsiosis.



Introducci3n cont.

- El principal tratamiento utilizado es OTC vfa oral.
- Desventajas de la OTC oral:
 - Los peces enfermos no comen (subdosificaci3n)
 - Baja biodisponibilidad en los peces debido a la formaci3n de complejos con iones Ca^{2+} y Mg^{2+} presentes en gran cantidad en el agua salada.
 - Se libera una gran cantidad de OTC al medio ambiente, la cual puede permanecer en el sedimento por meses.



Introducción cont.



- Tratamiento de OTC vía i.p.:
 - Extraetiqueta
 - Octubre 2014, Terrivet F-200 Veterquímica (Reg. SAG N° 2252-B)
- Ventajas de la OTC i.p:
 - Dosificación individual homogénea
 - No deja residuos de OTC no consumida (alimento)
 - Peces enfermos y sanos se tratan de igual manera



Introducción cont.

- Desventajas de la OTC i.p:
 - Mayor costo, dado principalmente por el manejo.
 - Falta de estudios de los tiempos de resguardo luego de la administración de OTC i.p. a las dosis habitualmente utilizadas.





The slide features a blue background with three orange rounded rectangular boxes. In the top left corner, there is a logo for the 'Fondo de Investigaci3n Pesquera y Acuicultura' (FIPA) under the 'Ministerio de Economía, Fomento y Turismo' of the 'Gobierno de Chile'. In the top right corner, there is the IFOP logo. The three boxes are titled 'Productos evaluados', 'Especies', and 'Estudios', each containing a list of items.

Fondo de Investigaci3n Pesquera y Acuicultura
Ministerio de Economía, Fomento y Turismo
Gobierno de Chile

IFOP

Productos evaluados

- Magnadur
- Liquamicina
- Terrivet F-200

Especies

- *S. salar*
- *O. mykiss*
- *O. kisutch*

Estudios

- 9 en condiciones controladas
- 1 en condiciones de campo



Resultados



Estudio de depleción de Liquamicina en s. Coho Condiciones controladas

- ✓ Se utilizaron 3 estanques de 2 m³, con 47 ejemplares de salmón Coho cada uno, con un peso promedio de 1.040 ± 400 g.
- ✓ Inicialmente se realizó un muestreo de 3 peces de cada estanque, los que fueron utilizados como muestras blanco (Tiempo 0).
- ✓ Se inyectó intraperitonealmente 0,2 ml de Liquamicina, que corresponde aproximadamente a 39 mg de OTC/Kg de P.V.
- ✓ Se realizaron los 8 muestreos programados, de 5 peces por estanque y por tiempo de muestreo, a los 12, 20, 33, 40, 47, 54, 59 y 74 días post tratamiento con el objetivo de realizar la respectiva curva de depleción.

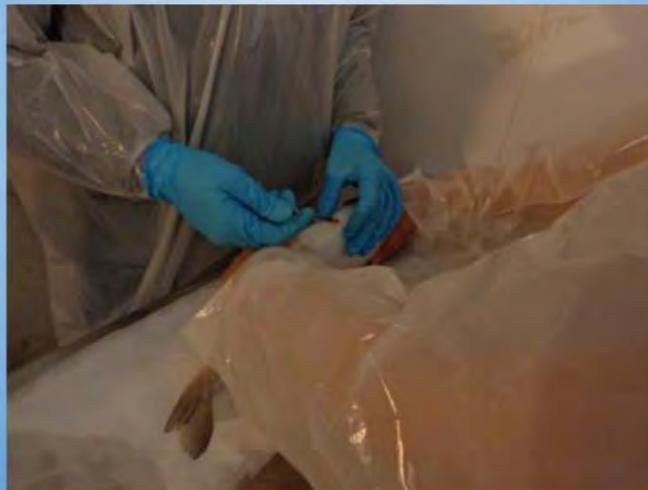


Estudio de depleci3n de Liquamicina en s. Coho Condiciones controladas.





Estudio de depleci3n de Liquamicina en s. Coho Condiciones controladas.





Estudio de depleci3n de Liquamicina en s. Coho Condiciones controladas.

- ✓ Se realiz3 un corte transversal al eje del pescado, por detr3s de la aleta dorsal y otro detr3s de la aleta anal (muestra normal).
- ✓ Adicionalmente, se realiz3 un corte transversal al eje del pescado, por detr3s de la aleta dorsal y otro detr3s de la aleta pectoral (punto de inyecci3n).
- ✓ Se obtuvieron los filetes sin tejido cartilaginoso y 3seo, siendo uno de los flancos del pez la muestra y el otro la contramuestra.
- ✓ Se realizaron los an3lisis de OTC con HPLC-DAD.
- ✓ Con los 4 primeros tiempos de muestreo se compar3 los resultados de los dos tipos de muestra.



Comparaci3n de resultados de las muestras normales y punto de inyecci3n.

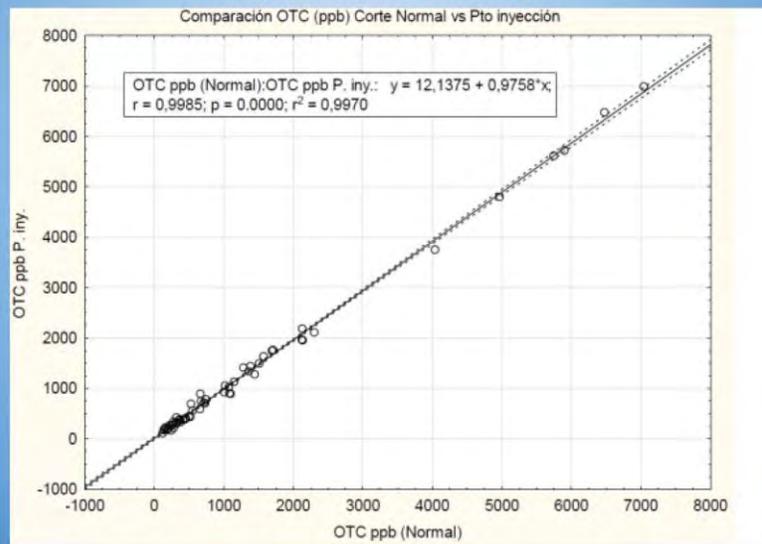




Table 1. Experimental conditions for each depletion trial.

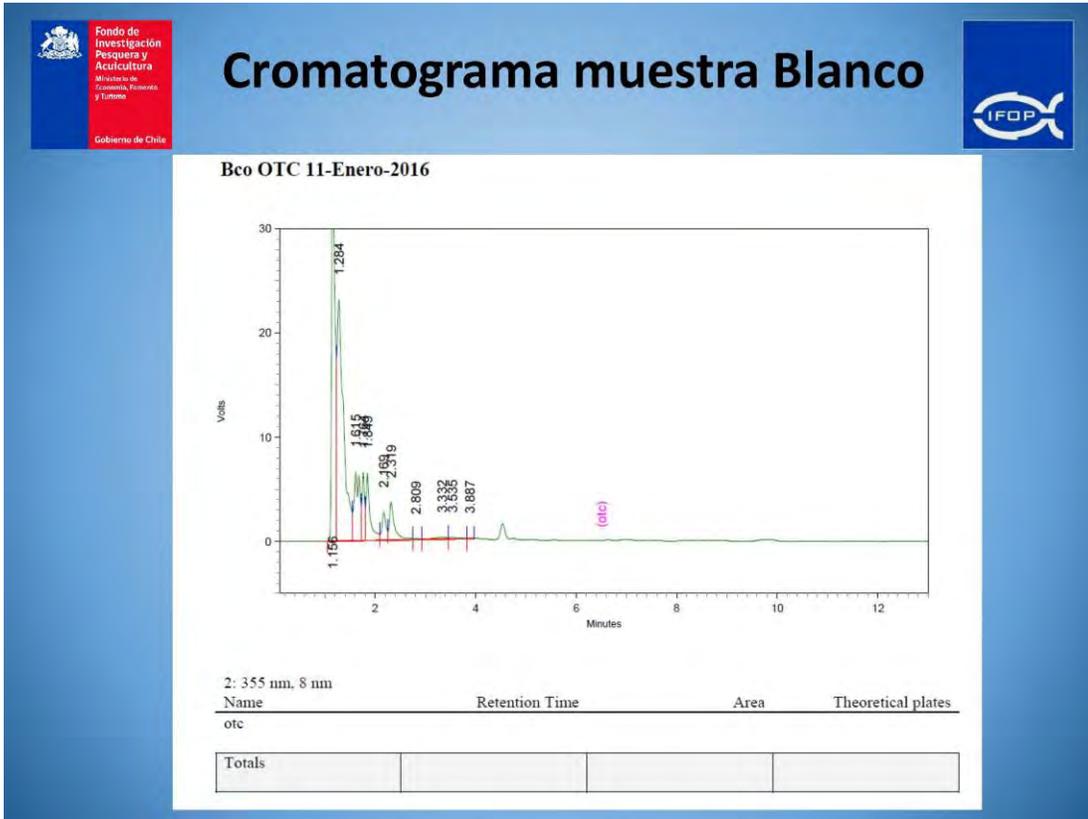
Species	Trial	Product	Average weight (g)	Doses mg/Kg	Water Temp. °C
Coho salmon	1	Liquamicin	1040	38.7	12.7
	2	Magnadur	1727	34.8	14.8
	3	Terrivet F-200	1117	35.8	14.8
Rainbow trout	1	Liquamicin	357	28.1	12.3
	2	Magnadur	1645	38.7	13.1
	3	Terrivet F-200	316	31.6	12.3
Atlantic salmon	1	Liquamicin	735	27.5	12.3
	2	Magnadur	620	24.8	12.3
	3	Terrivet F-200	770	26.0	12.3
Rainbow trout	Field conditions	Magnadur	820	35.0	10.7

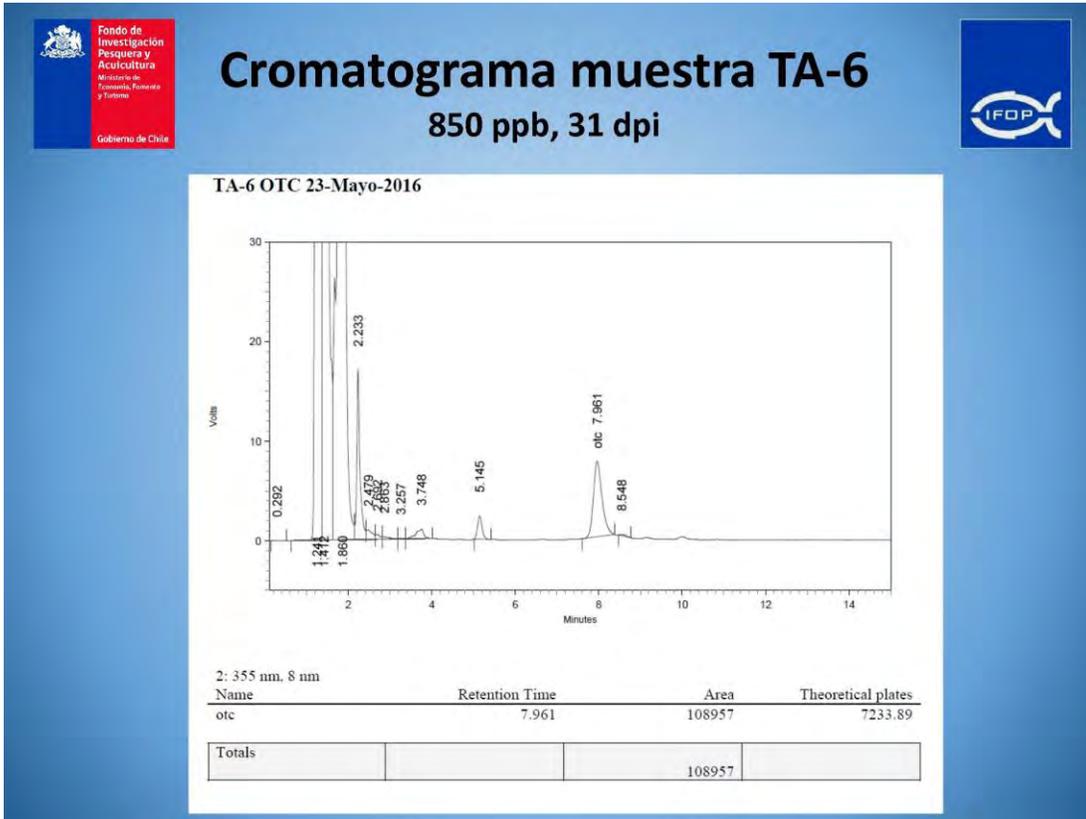


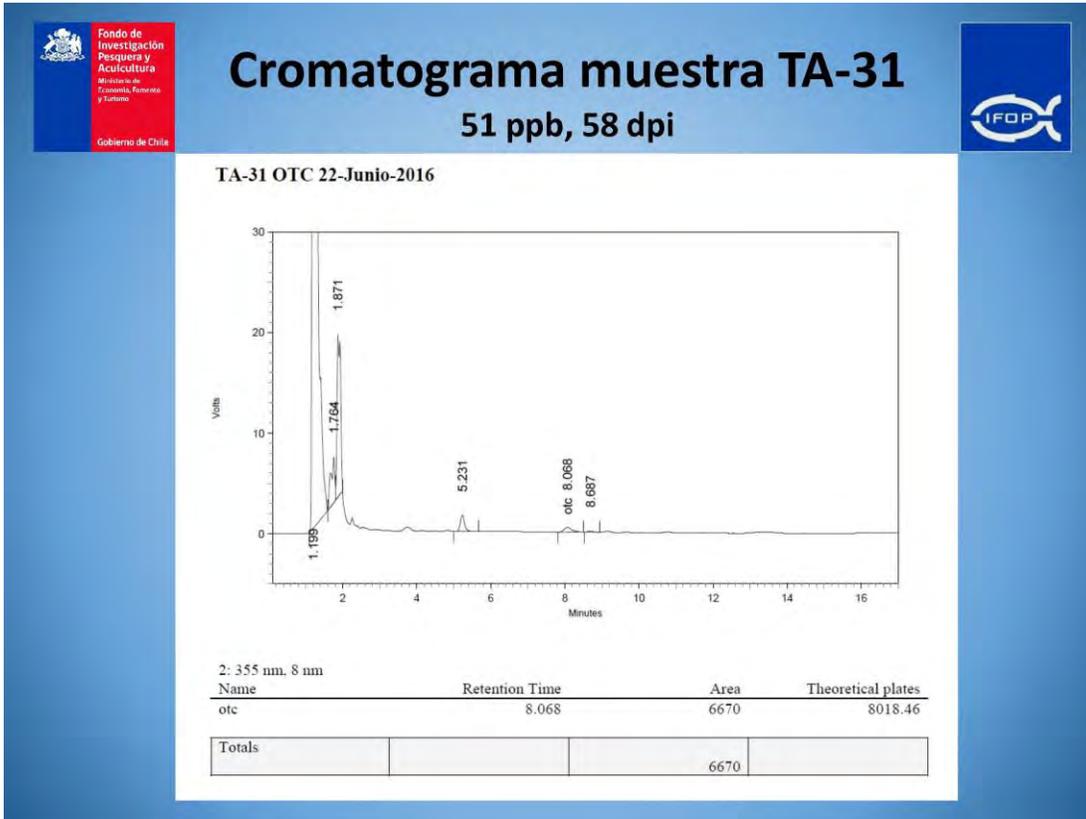
Table 2. Sampling times and number of fish for each depletion trial.

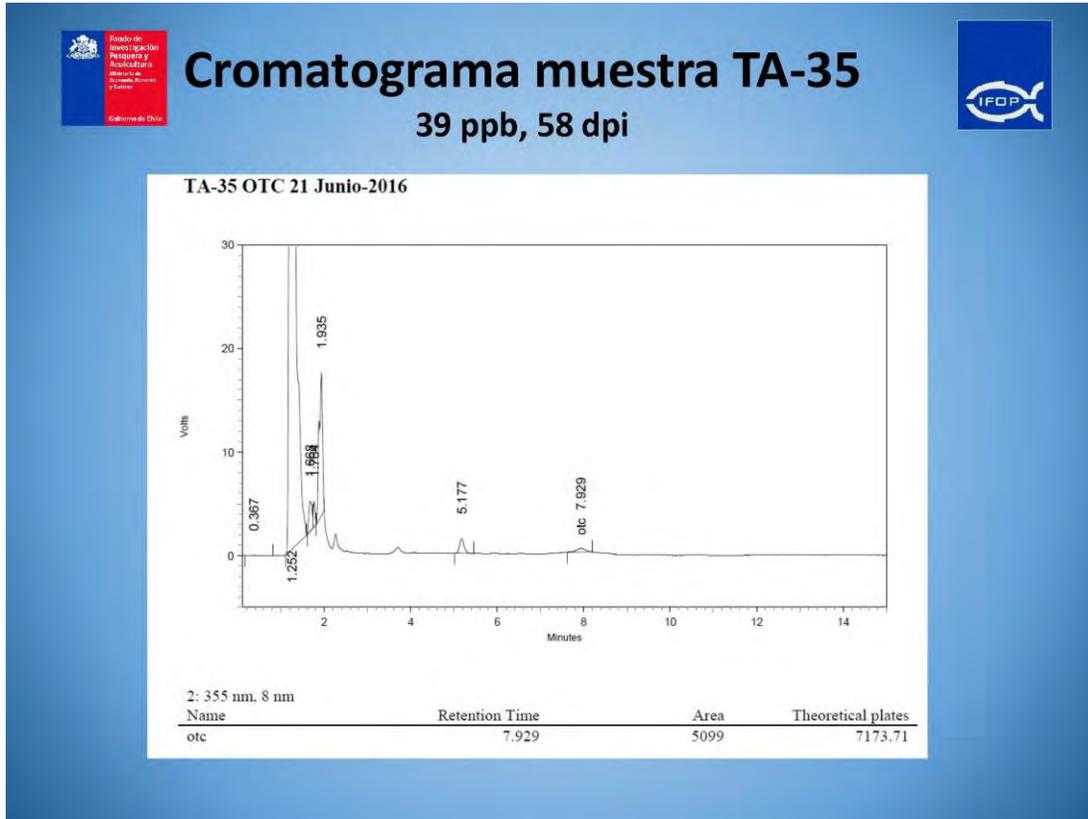
Species	Trial	N° sampling	Days post-injection	n/sampling
Coho	T-1, CC	8	12, 20, 33, 40, 47, 54, 59, 74	15
	T-2, CC	4	32, 39, 46, 53	15
	T-3, CC	4	32, 39, 46, 53	15
Rainbow trout	T-1, CC	4	30, 38, 44, 55	10
	T-2, CC	4	33, 42, 50	15
	T-3, CC	4	30, 38, 44, 55	10
Atlantic salmon	T-1, CC	4	30, 38, 44, 55	15
	T-2, CC	4	30, 38, 44, 55	15
	T-3, CC	4	30, 38, 44, 55	15
Rainbow trout	FC	4	31, 38, 46, 58	10

T: Trial; CC: Controlled Conditions; FC: Field Conditions



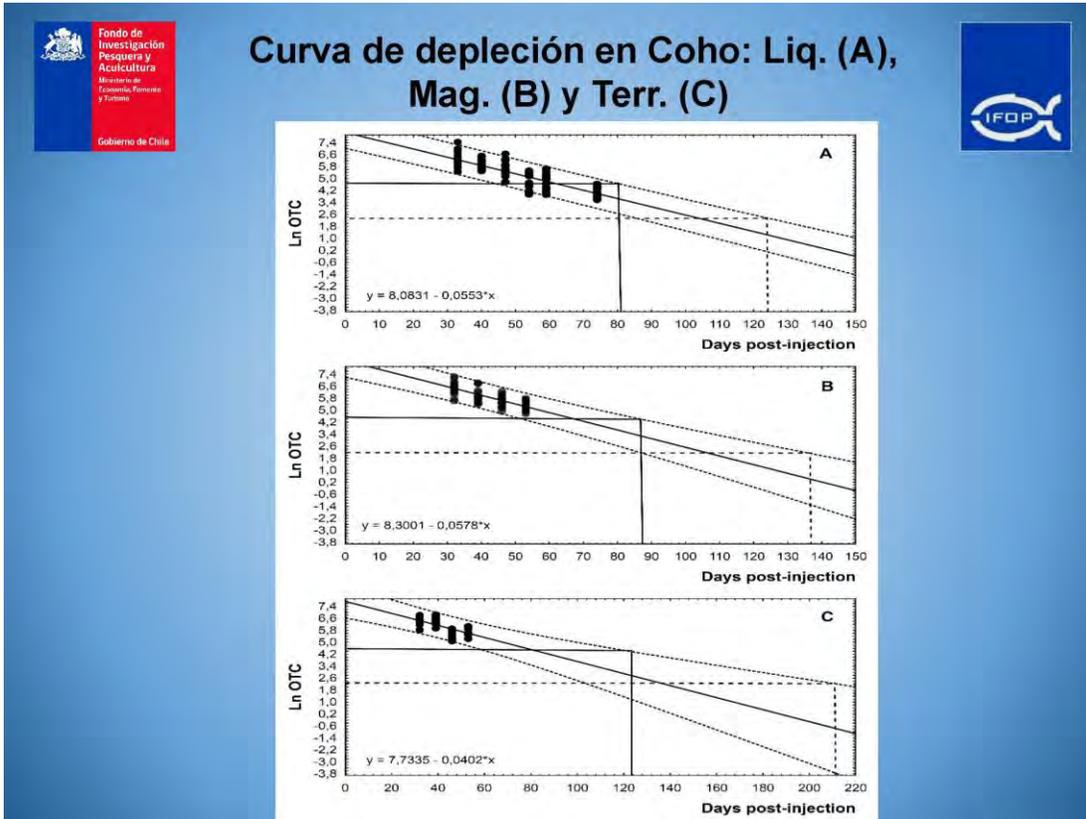


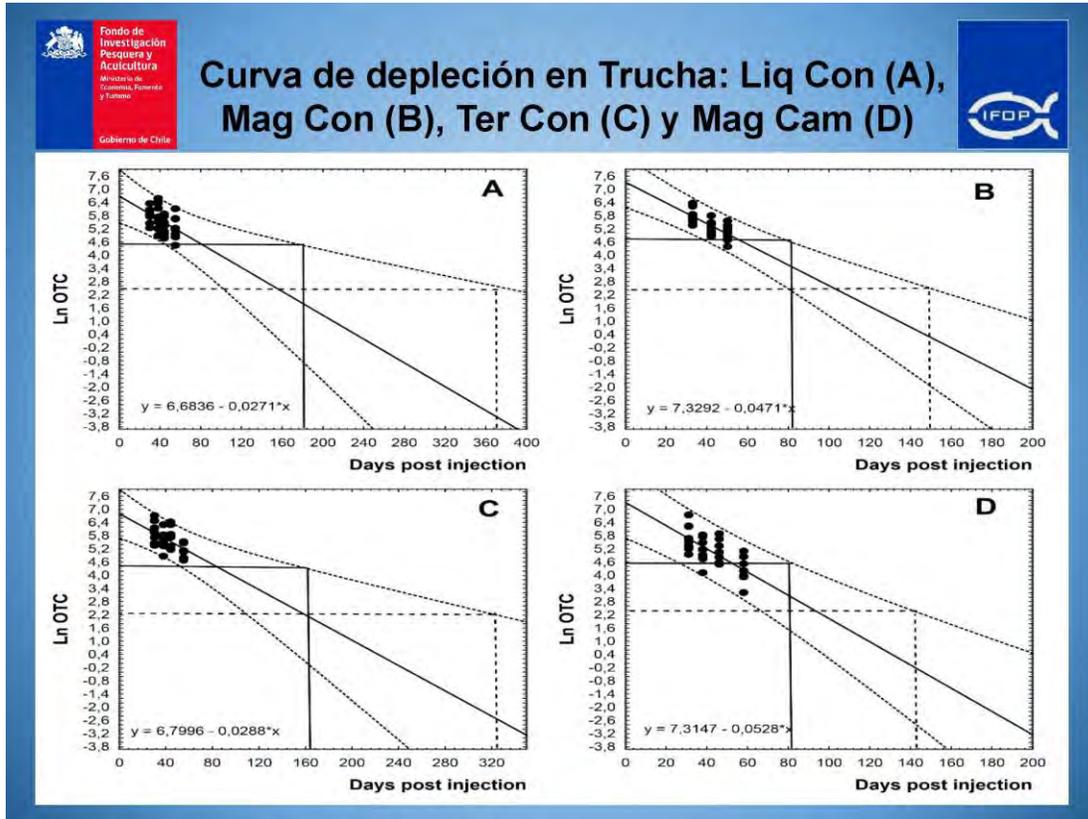






- ✓ Se confeccionó la curva de depleción entre el Ln de concentración de OTC vs días post-inyección utilizando el programa Statistica v.10.
- ✓ Con la ecuación de la curva de depleción se calculó el T $\frac{1}{2}$ de OTC en el músculo utilizando la siguiente fórmula: $T \frac{1}{2} = 0,693/\text{pendiente}$.
- ✓ Utilizando el software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”, se calculó el periodo de resguardo para un LMR de 100 ppb y de 10 ppb, utilizando un intervalo de confianza del 95%.





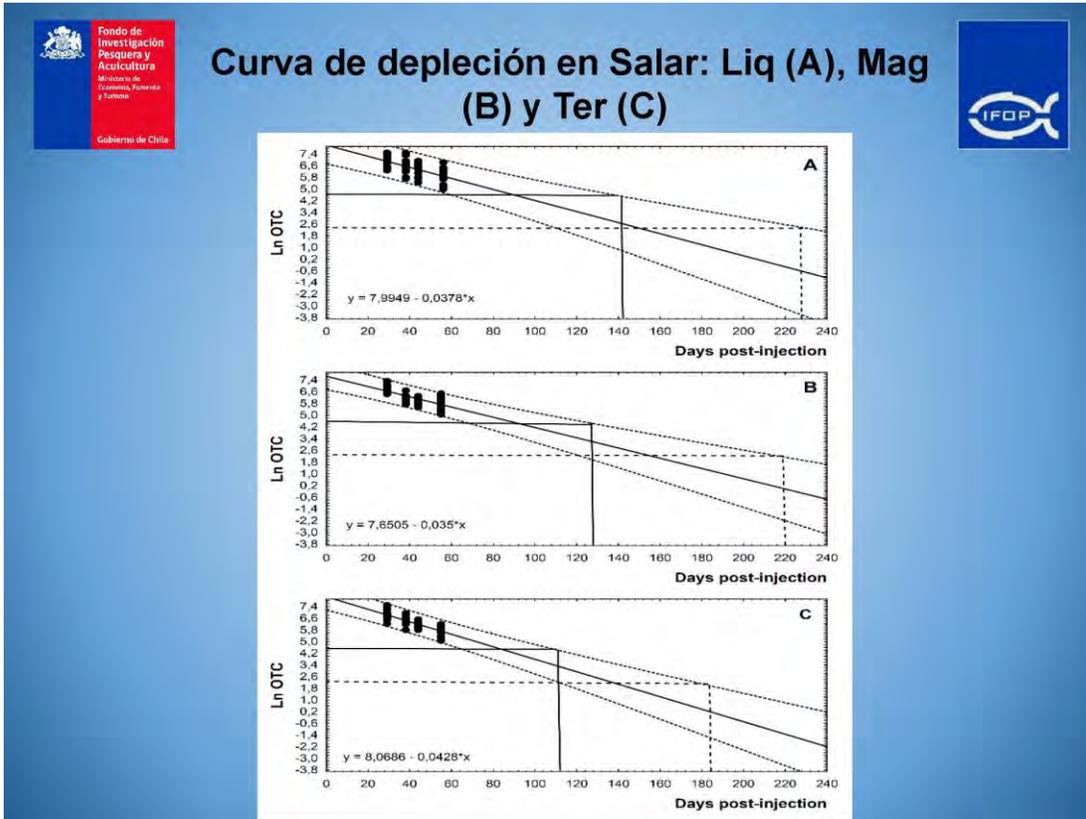






Table 4. Half-life ($T_{1/2}$) and withdrawal time (WT) values expressed in days and degree-days for each depletion trial at maximum residue limits (MRL) of 100 ng g^{-1} and 10 ng g^{-1} .

Species	Trial	$T_{1/2}$ (days)	r	WT at 100 ng g^{-1}		WT at 10 ng g^{-1}	
				days	degree-days	days	degree-days
Coho	T-1/CC	12.5	-0.84	81	1026	125	1585
	T-2/CC	12.0	-0.72	87	1292	139	2052
	T-3/CC	17.2	-0.63	124	1841	213	3149
Rainbow trout	T-1/CC	25.6	-0.46	187	2302	376	4621
	T-2/CC	14.7	-0.73	82	1068	149	1957
	T-3/CC	24.1	-0.50	165	2024	324	3985
Atlantic salmon	T-1/CC	18.3	-0.61	142	1748	229	2812
	T-2/CC	19.8	-0.66	130	1597	220	2707
	T-3/CC	16.2	-0.80	114	1397	186	2286
Rainbow trout	FC	13.1	-0.66	87	927	151	1618

T: Trial, CC: Controlled Conditions. FC: Field Conditions, $T_{1/2}$: half-life, WT: withdrawal time



Diferencias de resultados por peso de pez



- ✓ Se estudiaron las diferencias de concentraciones obtenidas del grupo de peces de menor peso, con respecto al grupo de peces mayor peso por muestreo y estudio.
- ✓ Se calcul3 el porcentaje de diferencia del valor obtenido en el grupo de menor peso con respecto al grupo de mayor peso.
- ✓ Cuando el % de diferencia es positivo, implica que en el grupo de menor peso, se obtienen concentraciones m3s altas.





Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura
Ministerio de Recursos Acuáticos, Fomento y Turismo
Gobierno de Chile

Diferencias de resultados por peso de pez (ej. s. Coho en cc) (ppb)



Liquamicina en Salmón coho.					Magnadur en Salmón coho.					Terrivet en Salmón coho.				
Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif	Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif	Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif
33	7 Mas bajos	1204,3	784,5	39,3	32	7 Mas bajos	1539,3	828,5	45,7	32	7 Mas bajos	882,1	710,1	26,5
	7 Mas altos	1687,1	476,5			7 Mas altos	2137,9	450,0			7 Mas altos	1290,0	521,9	
40	7 Mas bajos	1314,3	468,2	28,0	38	7 Mas bajos	1132,9	780,5	62,1	39	7 Mas bajos	935,7	772,1	16,4
	7 Mas altos	1791,4	337,2			7 Mas altos	1883,6	295,5			7 Mas altos	1290,7	645,5	
47	7 Mas bajos	1320,0	364,5	25,4	46	7 Mas bajos	1447,9	332,3	39,0	46	7 Mas bajos	1056,4	430,1	51,5
	7 Mas altos	1788,6	271,8			7 Mas altos	2012,1	202,6			7 Mas altos	1500,7	208,6	
54	7 Mas bajos	1300,7	199,0	58,9	53	7 Mas bajos	1445,7	321,2	44,7	53	7 Mas bajos	875,8	417,6	49,4
	7 Mas altos	2074,3	81,9			7 Mas altos	1988,6	177,6			7 Mas altos	1197,5	211,1	



Diferencias de resultados por peso de pez (ej. Trucha, condiciones de campo) (ppb)



Día	Pesos	Peso prom	Conc prom	% de dif
31	3 Mas bajos	830,7	288,4	9,3
	3 Mas altos	1147,3	261,7	
38	3 Mas bajos	710,7	215,7	-8,1
	3 Mas altos	1538,7	233,3	
46	3 Mas bajos	1056,7	411,3	62,9
	3 Mas altos	1383,3	152,6	
58	3 Mas bajos	1203,3	146,1	70,4
	3 Mas altos	1810,0	43,2	





Conclusiones



- ✓ No hay diferencias de concentraci3n de OTC en muestras de m3sculo obtenidas en el corte normal con respecto al corte que incluye el punto de inyecci3n.
- ✓ En todos los estudios realizados se obtiene una gran variabilidad en las concentraciones obtenidas, las que son parcialmente explicadas por la variabilidad de pesos.
- ✓ Se observa en la mayor3a de los casos, que los peces de menor peso tienen una concentraci3n de OTC mayor, explicado a trav3s del volumen de producto aplicado.
- ✓ A todos los peces se les aplica el mismo volumen de OTC, sin considerar el tama1o del pez, por lo que la dosis recibida por peces peque1os es mayor.



Conclusiones



- ✓ Considerando un grupo de peces sanos, esta situación sería diferente si el tratamiento se realiza con alimento medicado. Estos peces se alimentan de acuerdo a su tamaño, por lo que peces más pequeños comerían menos, es decir ingerirían menos OTC, y tendrían una concentración relativa del antibiótico similar a los de mayor tamaño.
- ✓ 8 de las 10 curvas de depleción presentaron una buena correlación, con un r sobre 0,61.
- ✓ En general, las estimaciones de $T_{1/2}$ de todos los estudios fueron entre 12 y 19,8 días post-inyección (sin considerar los ensayos en Trucha con Liquamicina y Terrivet en condiciones controladas).



Conclusiones



- ✓ En un estudio previo realizado por IFOP, sobre alimento medicado con OTC utilizando 2 productos comerciales, se obtuvieron $T_{1/2}$ de 5 a 7 días.
- ✓ De acuerdo a la bibliografía, los estudios de depleción que tratan sobre alimento medicado en especies salmónidas de diferentes tamaños, a diferentes temperaturas y tipos de agua, reportan valores de $T_{1/2}$ entre 4 a 15 días, siendo la mayoría cercano a los 5 días.
- ✓ Solo un estudio presentó un $T_{1/2}$ de 15 días (Namdari, et al., 1999), el cual fue realizado en trucha arcoíris y salmón Chinook posterior a la administración intra-arterial de OTC con dosis de 50 and 5 mg kg⁻¹, respectivamente.



Conclusiones



- ✓ La diferencia de $T_{1/2}$ de tratamiento con OTC intraperitoneal, sugiere que el fármaco es eliminado del músculo en forma más lenta respecto al entregado por vía oral, por lo que el período de resguardo o carencia, es mayor.
- ✓ Los $T_{1/2}$ y los tiempos de resguardo de los ensayos de Liquamicina y Terrivet en trucha arcoíris pueden estar sobrestimados, debido a que solamente se muestrearon 10 peces por tiempo de muestreo, a diferencia del resto de los estudios dónde se muestrearon 15 peces.
- ✓ Se sugiere que el número de 10 peces por tiempo de muestreo es bajo.



Conclusiones



- ✓ La concentración máxima de OTC lograda en músculo, luego de aplicar Liquamicina a una dosis de 39 mg/Kg PV fue de 7000 ppb (7 ppm) a los 12 días post-tratamiento.
- ✓ Como comparación, las concentraciones máximas alcanzadas en músculo luego de la aplicación vía alimento, indicadas en diversos estudios, no superan las 4000 ppb a los 2-4 días de haber finalizado el tratamiento.
- ✓ Las altas concentraciones medidas en músculo se podrían deber a que la aplicación vía i.p. de la OTC ingresa en forma directa al organismo, en comparación a las dosis entregadas vía alimento, donde se absorbe muy poca cantidad del p.a.



Conclusiones



- ✓ Las altas concentraciones alcanzadas por OTC en el organismo de los peces y su lenta eliminaci3n, tiene implicancias positivas y negativas.
- ✓ Por v3a intraperitoneal la biodisponibilidad del f3rmaco es mejor y se podr3an utilizar hasta 100 veces menos cantidad de antimicrobianos.
- ✓ A pesar de utilizar menos cantidad de p.a., la concentraci3n lograda en los tejidos, es mayor y se mantiene por m3s tiempo que con los tratamientos entregados por v3a oral.
- ✓ Por otro lado, el per3odo de carencia es mucho mayor, por lo que habr3a que evitar el tratamiento con este producto si se pretende cosechar dentro de los pr3ximos 5-6 meses (dependiendo de la T° del agua y del LMR de destino del producto).



Recomendaciones



- ✓ Se considera pertinente que los peces que hayan sido tratados con OTC inyectables sean siempre muestreados, independiente del tiempo en que haya sido aplicado el tratamiento. Este muestreo debe ser por jaula.
- ✓ El N° de peces en los muestreos debiese aumentar a un mínimo de 20, considerando la variabilidad de las concentraciones en los grupos, y sin importar si han recibido tratamiento oral o no.
- ✓ El periodo de carencia indicado por Veterquímica para Terrivet F-200, es de 1060 ° días (aproximadamente 3,5 meses a 10°C). No obstante a las dosis utilizadas en la industria se debería considerar un periodo mínimo de 1500 ° días (aprox. 5 meses a 10°C).
- ✓ En el caso de re-muestreos, el número de peces no puede ser inferior a 10 peces, los cuales se deberían realizar al menos 1 a 2 semanas después del primer muestreo.



A N E X O 15

Resumen de manuscrito científico



Oxytetracycline depletion and withdrawal time estimation following intraperitoneal administration in three species from Chilean salmon farming.

Authors: Luis Norambuena-Subiabre^{1*}; Margarita P. González¹, Sergio Contreras-Lynch¹

¹ Instituto de Fomento Pesquero, Departamento de Salud Hidrobiológica, División de Investigación en Acuicultura, , Balmaceda 252, Puerto Montt, Chile

* Corresponding author email: luis.norambuena@ifop.cl

Abstract

This study was conducted to evaluate the half-time ($T_{1/2}$) and withdrawal-time (WT) of oxytetracycline (OTC) following intraperitoneal (i.p.) administration of OTC (24.8-34.7 mg Kg^{-1}) in three farmed salmonid species, Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), Rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). A detection technique in fish skin-muscle through a high performance liquid chromatography (HPLC), with a diode array detector (DAD) was developed and validated. The depletion studies were carried out in controlled conditions (9 studies), and under field conditions (1 study). The $T_{1/2}$ and WT estimations from the skin-muscle after the i.p. administration of OTC in salmonids appears to be longer than studies where the OTC was orally administrated. Furthermore, the OTC maximum concentration in muscle seems to be also higher in the i.p. treatment. Due to the prolonged WT following the i.p. OTC administration, cautions related to the salmon harvest time should be consider in order to prevent OTC traces in the final product.

Keywords: HPLC, oxytetracycline, depletion, salmonid, intraperitoneal.



1. Introduction

In Chile, the main aquaculture industry is salmon farming which plays an important role in the country economy. However, the intensive salmon farming have led to growing problems with bacterial diseases (Romero *et al.*, 2012). In order to control fish diseases in aquaculture, chemical substances were authorized, being the antibiotics the most frequent substance used both prophylactically and metaphylactically (Lalumera *et al.*, 2004; Nepejchalova *et al.*, 2008; Smith, 2008).

One of the main diseases affecting the Chilean salmon industry is the Piscirickettsiosis, also referred as Salmonid Rickettsial Septicemia (SRS), produced by *Piscirickettsia salmonis*, an intracellular bacterial pathogen (Cvitanich *et al.*, 1991). Regardless the wide geographical distribution of this pathogen, epidemics of SRS mainly occurs in the Chilean industry (Jakob *et al.*, 2014; Yuksel *et al.*, 2006). In 2015, within the mortalities induces by infectious causes in Atlantic salmon, Rainbow trout, and Coho salmon, 78.9%, 82.9%, and 59.3%, respectively were produced by Piscirickettsiosis (Sernapesca, 2016).

One of the main antibiotic treatments used to control Piscirickettsiosis in Chile is oxytetracycline (OTC), administered to fish mainly orally. The most important limitation of in feed medication administration is that the fish treated should be actively feeding, however most of the fish affected by the disease, cease to eat (Park *et al.*, 2012). OTC is a broad-spectrum bacteriostatic drug, being a protein synthesis inhibitor. One of the disadvantages of OTC is that it has low bioavailability in fish, due to its complex formation with Ca²⁺ and Mg²⁺ ions, the latter being required for fish osmoregulation (Park *et al.*, 2012). On the other hand, studies have shown that antibiotics as OTC, oxolinic acid and flumequine, can persist in sediment beneath aquaculture systems for months after oral treatments (Björklund *et al.*, 1990; Hansen *et al.*, 1992; Hektoen *et al.*, 1995; Jacobsen and Berglind, 1988; Nygaard *et al.*, 1992; Samuelsen, 1992; Samuelsen *et al.*, 1994; Smith, 1996). Similarly, previous studies have reported half-time ($T_{1/2}$) among 70 days (Jacobsen and Berglind, 1988), and 32-64 days (Samuelsen, 1989) for OTC in sediments beneath farms.



The previous arguments, in addition to the low efficacy observed in the OTC treatments in salmonid farms have led producers to look for other therapeutic administration alternatives, such as intraperitoneal injectable OTC, some of them extra-label. The use of extra-label products is not in compliance with good veterinary practices of food safety, since there is no guarantee that the treatment doses, treatment period, and withdrawal-time (WT) have been met (Paschoal *et al.*, 2012)

The $T_{1/2}$ and WT estimations are of great relevance since they will allow to avoid pharmaceutical residues in salmon fillets, which can negatively affect the food safety, and finally affect the human consumption. Therefore, the aim of present study was to estimate the residue depletion time and WT after fish treatment by OTC intraperitoneal administration in three salmon species, Atlantic salmon, Coho salmon, and Rainbow trout, considering the maximum residue levels (MRLs) established by both, the European (100 ng g⁻¹) and Euroasiatic community (10 ng g⁻¹).

2. Materials and Methods

2.1 Intraperitoneal injection of OTC under controlled conditions

2.1.1 Fish maintenance conditions

All fish were maintained for at least 4 months before the study started, in order to allow fish to growth. The tanks were supplied with sea water with a mean salinity of 30 ± 2 ‰ at a flow rate of 34 L min⁻¹. The photoperiod was 12:12 h of light/dark. The fish were fed with a commercial diet at 1.4% of the body weight per day.



2.1.2 Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)

For trial 1, 150 individuals of Coho salmon of a mean weight of 1040 ± 400 g were used, which were distributed in three tanks with 50 fish each. For trial 2, 66 individuals with a mean weight of 1700 ± 300 g were used, which were distributed in three tanks with 22 fish each. For trial 3, 66 individuals with a mean weight of 1100 ± 240 g were used, which were distributed in three tanks with 22 fish each. All fish were maintained in fibre-glass tanks of 2 m^3 .

2.1.3 Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

For trial 1, 50 individuals of rainbow trout with a mean weight of 360 ± 124 g were used, which were distributed in two groups of 25 fish each. For Trial 2, 66 individuals with a mean weight of 1650 ± 370 g were used, which were distributed in three groups of 22 fish each. For Trial 3, 50 individuals of a mean weight of 316 ± 103 g were used, which were distributed in two groups of 25 fish each. All fish were maintained in fibre-glass tanks of 2 m^3 .

2.1.4 Atlantic salmon (*Salmo salar*)

For trial 1, 90 individuals of Atlantic salmon of a mean weight of 735 ± 190 g were used, which were distributed in three groups of 30 fish each. For Trial 2, 90 individuals with a mean weight of 620 ± 163 g were used, which were distributed in three groups of 30 fish each. For Trial 3, 90 individuals with a mean weight of 770 ± 221 g were used, which were distributed in three groups of 30 fish each. All fish from the three trials were maintained in fibre-glass tanks of 1 m^3 .



2.2 Intraperitoneal injection of OTC under field conditions

A total of 40 rainbow trout (*O. mykiss*) were sampled from a farm located at the Aysén region, which was experiencing an outbreak of Piscirickettsiosis. In order to control the disease, fishes were treated with an intraperitoneal injection of OTC at a dose equivalent of 35 mg per kg of body weight. The mean weight of the fish was 820 g. The mean water temperature was 10.7 ± 0.8 °C.

2.3 Experimental design of depletion study: drug administration and sampling protocol

2.3.1 Controlled conditions depletion study

The experimental conditions of the depletion studies are summarized in Table 1. In all studies and for the three fish species, fish were anesthetized with a benzocaine solution (30 mg L⁻¹). When fish reached the stage of deeper anesthesia (Ross and Ross, 2009), the OTC was intraperitoneally (i.p.) injected to each fish (doses are detailed in Table 1). Three different OTC commercial products were used: Product A (Trial 1), Product B (Trial 2), and Product C (Trial 3) (further details are given the 2.4 Chemical section). Finally, the fish were returned to their respective tanks until sampling time.

In the trail 1 in which Coho salmon individuals were injected with Product A, fish muscle were sampled at 8 occasions after the OTC administration. For the rest of trails, sampling were performed at 4 occasions. The sampling days and the number of fish per sampling from all studies are shown in Table 2.

At each sampling time, all the fish were subjected to lethal doses of benzocaine chlorhydrate (>250 mg L⁻¹) and completely euthanized by spinal cord separation before muscles were removed. Skin-on fillet from both sides of the fish were sampled, being the right side for



analysis, and the left side as a counter sample, which remained stored in case of troubles during the analyzes.

2.3.2 Field conditions depletion study

The experimental conditions of the field depletion study are summarized in Table 1. Fish were sampled at 4 different occasions after intraperitoneally injections with OTC (Product B). The sampling days and the number of fish per sampling are shown in Table 2. The sampling protocol was the same described for controlled conditions study.

2.4 Chemicals

The chemicals used for the HPLC analysis were methanol (MeOH) and Acetonitrile (ACN) (chromatographic grade), oxalic acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). High purity water was prepared using an Easypure II (Barnstead) purifying system.

For anesthesia, Benzocaine BZ-20 from Veterquímica (Chile) was used. For the intraperitoneal injections the commercial chemicals used were: Product A and B were both extra-label i.p. OTC, and Product C was salmonid i.p. OTC. A certified standard of OTC hydrochloride was obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany).

2.5 Preparation of standard solutions

The stock standard solution was prepared by dissolving 1 mg mL⁻¹ of the OTC standard in MeOH. This solution was maintained at 4°C and protected from light, for a period of time no longer than three months. The working standard solution of OTC was prepared daily by dissolving the stock standard solution in 0.1% TFA in HPLC water.



2.6 Spiked calibration curve

From the working standard solution, 6 points spiked calibration curves in three different days using ranges of 25 to 750 ng g⁻¹ were prepared. A diluted OTC working standard solution was added to 5 g of blank skin-on homogenized salmon fillet in a 50 ml conical tube, in order to obtain the desired concentration of the analyte. Each tube of spiked sample was capped, vortex mixed for 30 seconds, and left to stand for at least 30 min before starting the extraction.

2.7 Extraction procedure

A previously modified, developed, and validated OTC sediment extraction method was used (Norambuena *et al.*, 2013). In 50 ml conical tubes, 3 g of skin-on homogenized salmon fillet were weighed and mixed with 20 ml of 0.01 M of oxalic acid in MeOH. Samples were vigorously shaken in a multivortex mixer during 30 minutes. Then, the tube was placed in an ultrasonic bath for 10 minutes, centrifuged at 1700 g, 10 min, 4°C. The supernatant was transferred to a 100 ml rotary evaporation flask. Again, the pellet was extracted with 20 ml of 0.01 M oxalic acid in MeOH, shaken for 10 minutes and centrifuged. The supernatant was added to the same flask, and the pellet discarded. The supernatant in the flask was evaporated using a rotary evaporator at 50°C. The sample was suspended with 2 ml de hexane, then 2 ml of water/methanol (90:10) were added, being hand mixing for 20 seconds. The suspended sample was transferred to a 50 ml conical centrifuge tube. The sample was centrifuged at 1700 g, 5 min, 4°C. Finally, the aqueous phase was filtered into 1.8 ml HPLC vials using PVDF syringe filters of 0.22 um pore and 3 mm diameter.

2.8 Instrumentation

A Shimadzu high resolution liquid chromatograph (HPLC), with a Sil-10AF auto-sampler, a quaternary LC-10AT pump, DGU-14A degasser, SCL-10A System Controller, and SPD-



M20A diode array detector (DAD) was used for the analyzes. Chromatographic separation was carried out by using a Sun Shell Phenyl (100 x 4.6 mm, 2.6 μm) Core Shell Particle HPLC column. The HPLC runs were analyzed in a Class-VP software. An Elma Transonic 60H ultrasonic bath was used for extraction and degassing. A Hettich Rotofix 32A centrifuge with a Hettich 1617 rotor, a Heidolph multireax shaker and a Büchi R-200 Rotavapor were also utilized for extraction.

2.9 Chromatographic conditions

Chromatographic analyses were performed under isocratic mode. The mobile phase was 0.1% TFA in water, 0.1% TFA in MeOH, 0.1% TFA in ACN (72% / 5% / 23 %). The eluent was pumped at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} . The volume of the sample injection was of 50 μl . The detection wavelength used was at 355 nm.

2.10 Method validation

The analytical method for the quantitation of OTC in skin-on fillet was validated using the following performance parameters: linearity and linear range, sensitivity, selectivity, precision, stability, detection, quantitation limits and accuracy. The calibration curve for OTC were obtained by fortifications of blank samples (spiked samples) at 6 levels: 25, 50, 100, 250, 500 and 750 ng g^{-1} . The curve was made with the preparation of spiked samples in 3 different days.

Linearity (r) was expressed as the linear correlation coefficient (r) of the analytical curve. The limit of detection (LOD) and quantitation (LOQ), expresses the lowest mass fraction of the effectively analyzed analyte, which is over the 3 and 10 times the residual standard deviation of the calibration curve, respectively. The precision of the developed method was expressed as the relative standard deviation (RSD) of 100 ng g^{-1} of OTC in the spiked samples measured in different days (a total of 19 samples, 1 or 2 samples per day). The



selectivity was evaluated using blank samples, verifying the presence or absence of compounds eluting near the retention time of the analyte. The stability was evaluated measuring concentrations in OTC-positive skin-on muscle homogenized, weighing samples, and maintained at -20°C for 4 months. The accuracy of the method was evaluated using the same fortified samples used for the precision determination. The accuracy is expressed as the percentage of difference (%) of the expected value versus the obtained values.

2.11 Data analysis

The depletion of OTC from skin-on muscle fillet of fish (or terminal elimination of the drug from the muscle) was estimated following the EMEA guidelines (EMEA, 1997). This method uses a linear regression model between the natural logarithm (ln) of concentrations versus time, which assumes the compartment elimination kinetics model as:

$$C_t = C_0 e^{-kt}$$

Where C_t is the concentration at time t , C_0 is the fictitious concentration at time 0 and k is the constant elimination rate, which correspond to the slope of the linear equation. The adjustment of the model was verified through the determination coefficient (r^2) and the value of significance ($p < 0.05$).

The half-life of OTC ($T_{1/2}$) in skin-on muscle fillet of fish was calculated by using the following equation (Riviere, 2011):

$$T_{1/2} = 0,693/k$$

The parameter k was previously estimated in the regression line.



In accordance with EMEA guidelines (EMEA, 1997), samples with concentrations below the quantification limit (QL) of 50 ng g^{-1} , and detection limit (DL) of 25 ng g^{-1} must be considered as 25 and 12 ng g^{-1} , respectively, accounting for half of the respective limits established in the validation method. When all, or large part of the data are located below the mentioned limit, the sampling day should be eliminated. The guidelines also indicate that the depletion curves must consider the data of at least three different times, as in present study.

Statistical analyzes, the evaluation of the fitness of the model of elimination kinetics of the obtained data, and the following regressions assumptions were verified using the Statistica v.10 and WT-14 software, as follows:

- Homogeneity of variances: the Bartlett test was used as recommended by the U.S. Food and Drug Administration (EMEA, 1997; FDA, 2005).
- Linearity: The visual inspection of the plot of assure that there is a useful linear relationship (EMEA, 1997). The F-test was used to confirm the linearity of the results (data not shown)
- Normality of errors: the Shapiro-Wilk test was applied to verify the results obtained from the residual plot and the plot of cumulative frequency distributions of the residuals (data not shown).

The withdrawal time (WT) was estimated using the software “Withdrawal-Time Calculation Program WT 1.4”, established by the European Medicine Agency (EMA) for this purpose, available on their website.

(http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000384.jsp). For the withdrawal time calculation, a percentile of 95% with a 95% of confidence was used, considering a MRL of 100 and 10 ng g^{-1} , in accordance to the European Union and the Euroasian Economic Community limits, respectively.



3. Results and Discussion

3.1 Validation of analytical method

An analytical method to quantify OTC concentrations in skin-on salmon muscle was developed and validated. Validation parameters obtained from linear regression between the chromatographic peak area and OTC concentration of six spiked samples are shown in Table 3. The p-value (< 0.05) indicates that the linear regression obtained in present study was significant. Furthermore, the determination coefficient (r^2) was 0.9997, showing a good linearity between the analyte and the concentration range of present study. These results show that a high proportion of variance was explained by variations of the independent variable, which in this case are the OTC concentrations. The linear range studied in the calibration curve (Fig. 1) accounts for signals ranging from 25 - 750 ng g⁻¹ of OTC in skin-on muscle samples from salmon and trout.

The selectivity was verified by absence of significant interferences estimated from analyzes of 20 skin-on salmon muscle blank samples (data not shown).

The accuracy was 100.7% and the precision was below 3.0%, being within the levels suggested as appropriate for this mass fraction in the Commission Decision 2002/657 of the European Community (Commission Decision of 12 August 2002).

The stability studies on positive skin-on muscle homogenized, demonstrated that during a period of 4 months stored at -20°C, OTC concentration was stable (data not shown).



3.2 Depletion analysis of OTC concentrations in fish muscle and withdrawal time estimation

The fitness of the models of all elimination kinetics were verified in all trials (data not shown). Eight of ten depletion curves showed good correlations, showing r values above 0.61 (Table 4). The results of the OTC $T_{1/2}$ and the WT at 100 and 10 ng g⁻¹ in skin-on muscle fillet of Coho salmon, Atlantic salmon, and Rainbow trout, which are expressed in days (for both $T_{1/2}$ and WT) and degree-days (only WT), are shown in Table 4. Figure 2, 3, and 4 show the OTC-depletion curve and WT estimations for Coho salmon, Rainbow trout and Atlantic salmon, respectively.

In the depletion study for Product A in Coho salmon, the depletion curve considered only the six last sampling times due to the high OTC concentrations measured in the first two sampling dates (12 and 20 days post-injection) (Fig. 2). The maximum OTC concentration measured at 12 days post-injection (dpi) was 7000 ng g⁻¹, being 2300 ng g⁻¹ at 20 dpi. In previous published studies with OTC in food-medications, the maximum concentration obtained in fish muscle did not exceed 4000 ng g⁻¹ at 2 or 3 days after the end of medication (Aoyama *et al.*, 1991; Bebak-Williams *et al.*, 2002; Björklund and Bylund, 1990; Björklund *et al.*, 1991; Meinertz *et al.*, 2001). In those studies, the doses used were higher than the dose used in present study (38.7 mg Kg⁻¹), and this could be explained due to OTC is poorly absorbed by fish after oral administration or treatment (Cravedi *et al.*, 1987; Park *et al.*, 2012; Rigos *et al.*, 2004).

The $T_{1/2}$ estimations under controlled conditions were between 12.0 and 17.2 dpi for Coho salmon, between 14.7 and 25.6 dpi for Rainbow trout (13.1 dpi under field conditions), and 16.2 and 19.8 dpi for Atlantic salmon for the three commercial products (Table 4). For Rainbow trout, the trials T-1 and T-3 under controlled conditions showed low correlations, showing the highest values for $T_{1/2}$ and WT. This trend could be explained since the upper tolerance limit in the WT estimation obtained for these depletion curves were extremely high, hence the WT obtained as the $T_{1/2}$, may be overestimated. Further, extremely high



tolerance limit could be due by the lower number of sampled individuals ($n=10$ per sampling time) in these trials (T-1 and T-3), compared with the others controlled conditions trials ($n=15$ per sampling time).

In general, the $T_{1/2}$ estimations for all trials were between 12 and 19.8 days post-injection, except for T-1 and T-3 of Rainbow trout under controlled conditions. From a review of previous studies, a great variation in $T_{1/2}$ estimations was observed, ranging from 2 to 15 days (Black *et al.*, 1991; Meinertz *et al.*, 2001; Namdari *et al.*, 1996; 1999). It is important to note that most of the studies reviewed showed $T_{1/2}$ values around 5 days, and only one work showed a $T_{1/2}$ of 15 days (Namdari *et al.*, 1999), being the later carried out for rainbow trout and Chinook salmon after the administration of intra-venous OTC at doses of 50 and 5 mg kg⁻¹, respectively. Results from present study suggest that OTC administrated via intraperitoneal injection is eliminated slower than when OTC is orally administrated.

The WT calculations were performed with an upper tolerance limit of 95%, and with 95% confidence (EMEA, 1997). The WT estimations at 100 ng g⁻¹ under controlled conditions were between 81 and 124 dpi for Coho salmon, between 82 and 187 dpi for rainbow trout (87 dpi under field conditions), and 114 and 142 dpi for Atlantic salmon, for the three commercial products (Table 4). The WT estimations at 10 ng g⁻¹ under controlled conditions were between 125 and 213 dpi for Coho salmon, between 149 and 376 dpi for Rainbow trout (151 dpi under field conditions), and 186 and 229 dpi for Atlantic salmon, for the three commercial products (Table 4).

Several regulatory authorities worldwide have set the WT values for OTC in finfish destined to human consumption (Rigos and Smith, 2013), and some of this authorities have adopted the degree-day concept. Considering this concept and the MRL of 100 ng g⁻¹, the WT values ranged from 1026 degree-days (81 dpi for Coho salmon-Product A) to 1841 degree-days (124 dpi for Coho salmon-Product C) for all trials (excepting the results for Products A and C in trout). When considering an MRL of 10 ng g⁻¹ (Euroasian economic community), the WT values ranged from 1585 degree-days (125 dpi for Coho salmon-Product A) to 3149



degree-days (213 dpi for Coho salmon-Product C) for all trials (excepting the results for Products A and C in trout). Depending on the destination market of the product, the WT could be from 1841 degree-days (for a MRL of 100 ng g⁻¹) to 3149 degree-days (for a MRL of 10 ng g⁻¹), which are 6 to 10 months at a mean temperature of 10°C approximately.

When a MRL of 100 ng g⁻¹ is considered, the WT values determined by worldwide authorities are lower than the values obtained in the present work. The possible explanation could be that the bioavailability of the OTC in finfish is better when the administration of this compound is by injection than when it is administered orally. This implies that the use OTC injection in fish can reduce the amount of active principle until 100 times when compared to the oral administration, reaching higher concentrations in the muscle, and therefore, higher effectiveness of the compound. For the WT estimations with a MRL of 10 ng g⁻¹, higher degree-day values were obtained, moreover, results showed a great variability. In order to have more accurate WT estimations considering this MRL, studies with sampling times that allow to observe lower concentrations should be performed (less than 10 ng g⁻¹) in addition a more sensitive detection technology should be used like High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

In all studies, a great variability of OTC concentrations was observed, which is considered a common result in this kind of studies. One of the possible explanations is that in most cases, the fish with smaller weight have a higher OTC concentration when it is compared to larger fishes (data not shown). These results could be explained since all fish were injected with the same volume of OTC (dose), being the smaller fish receiving a higher dose of OTC -in relation to the body weight- than the larger fish. Due to the great variability, Rigos and Smith (2013) recommended to sampling 10 animals or individuals, as a minimum number per sampling time. However, our results suggest that the minimum number per sampling time in the intraperitoneally treatments should be 15 individuals in order to improve the correlations between variables, and also the statistical certainty of these estimations.



The parameters estimated in present study will allow a better characterization of the times at which the harvest of salmon individuals should be, to ensure that the salmon individuals have traces or concentrations of OTC below that the established MRLs, in order to avoid antibiotic traces in salmon fillets that could negatively affect the food safety, and also the human consumption. The low or no presence of antibiotic traces in food for human consumption is of great relevance, since reduces the risk of the development of antibiotic resistance bacteria that affect human health.

4. Conclusion

The present study shows that when OTC is administrated by intraperitoneally injection, lower amount or doses of active principle can be use, which allows to reduce the hazards to the environment when residues of these compounds reach the sea water or the sediment. Due to the variability of the results, it is recommended that sampling of fish muscle should consider at least 15 animals or individuals, as a minimum number per sampling time. The use of intraperitoneal OTC implies that the WT could range from six to more months, depending on the MRL and the water temperature. For more accurate WT estimations, the depletion curves should consider six or more sampling times, including levels under the MRL. Estimates from present study will allow a better scheduling of sampling times in order to avoid OTC traces in salmon fillets from animals intraperitoneally treated that can affect the food safety and human consumption.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to the Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura, Ministerio de Economía Fomento y Turismo, Gobierno de Chile (FIPA N° 2014-91), who provided the financial support for this study. The authors would like to thank also Dany Alvarez, Juan Pablo Garcia, Maria Eugenia Loy, Mylena Menanteau, Paola Olmos,



Cristian Oyarzo, Renato Oyarzún, Loreto Ovalle, Juan Carlos Quintanilla, Mario Rivas, and Claudia Spinetto for their assistance in this study.

References

- Aoyama, R.G., McErlane, K.M., Erber, H., Kitts, D.D., Burt, H.M., 1991. High-performance liquid chromatographic analysis of oxytetracycline in chinook salmon following administration of medicated feed. *Journal of Chromatography A*. 588, 181-186.
- Bebak-Williams, J., Bullock, G., Carson, M.C., 2002. Oxytetracycline residues in a freshwater recirculating system. *Aquaculture*. 205, 221-230.
- Björklund, Bylund, G., 1990. Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*. 84, 363-372.
- Björklund, Bondestam, J., Bylund, G., 1990. Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*. 86, 359-367.
- Björklund, Råbergh, C.M.I., Bylund, G., 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*. 97, 85-96.
- Black, W., Ferguson, H., Byrne, P., Claxton, M., 1991. Pharmacokinetic and tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout following bolus intravenous administration. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 14, 351-358.
- Commission Decision of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/CE).
- Cravedi, J.-P., Choubert, G., Delous, G., 1987. Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture*. 60, 133-141.
- Cvitanich, J., Garate, O., Smith, C., 1991. The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *Journal of Fish Diseases*. 14, 121-145.



- EMA, 1997. Committee for veterinary medicinal products. Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods. EMA/CVMP/036/95–Final.
- Hansen, P.K., Lunestad, B.T., Samuelsen, O., 1992. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming. Pages 174-178. In: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.
- Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V., Yndestad, M., 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture*. 133, 175-184.
- Jacobsen, P., Berglund, L., 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture*. 70, 365-370.
- Jakob, E., Stryhn, H., Yu, J., Medina, M.H., Rees, E.E., Sanchez, J., St-Hilaire, S., 2014. Epidemiology of Piscirickettsiosis on selected Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) salt water aquaculture farms in Chile. *Aquaculture*. 433, 288-294.
- Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R., 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*. 54, 661-668.
- Meinertz, J.R., Gaikowski, M.P., Stehly, G.R., Gingerich, W.H., Evered, J.A., 2001. Oxytetracycline depletion from skin-on fillet tissue of coho salmon fed oxytetracycline medicated feed in freshwater at temperatures less than 9°C. *Aquaculture*. 198, 29-39.
- Namdari, R., Abedini, S., Law, F., 1996. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in seawater chinook and coho salmon following medicated-feed treatment. *Aquaculture*. 144, 27-38.
- Namdari, R., Abedini, S., Law, F., 1999. A comparative tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture research*. 30, 279-286.
- Nepejchalova, L., Svobodova, Z., Kolářová, J., Frgalova, K., Valova, J., Némethová, D., 2008. Oxytetracycline assay in pond sediment. *Acta Veterinaria Brno*. 77, 461-466.



- Norambuena, L., Gras, N., Contreras, S., 2013. Development and validation of a method for the simultaneous extraction and separate measurement of oxytetracycline, florfenicol, oxolinic acid and flumequine from marine sediments. *Marine pollution bulletin*. 73, 154-160.
- Nygaard, K., Lunestad, B.T., Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V., 1992. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture*. 104, 31-36.
- Park, Y., Hwang, S., Hong, M., Kwon, K., 2012. Use of antimicrobial agents in aquaculture. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 31, 189-197.
- Paschoal, J., Bicudo, Á., Cyrino, J.E.P., Reyes, F., Rath, S., 2012. Depletion study and estimation of the withdrawal period for oxytetracycline in tilapia cultured in Brazil. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 35, 90-96.
- Rigos, G., Smith, P., 2013. A critical approach on pharmacokinetics, pharmacodynamics, dose optimisation and withdrawal times of oxytetracycline in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*.
- Rigos, G., Nengas, I., Alexis, M., Troisi, G.M., 2004. Potential drug (oxytetracycline and oxolinic acid) pollution from Mediterranean sparid fish farms. *Aquatic Toxicology*. 69, 281-288.
- Riviere, J.E., 2011. *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications*, Second Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Romero, J., Feijó, C.G., Navarrete, P., 2012. *Antibiotics in aquaculture-use, abuse and alternatives*. INTECH Open Access Publisher.
- Ross, L.G., Ross, B., 2009. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. John Wiley & Sons.
- Samuelsen, O., 1989. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture*. 83, 7-16.



- Samuelsen, O., 1992. The fate of antibiotics/chemotherapeutics in marine aquaculture sediments. Pages 162-173. In: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.
- Samuelsen, O., Lunestad, B., Ervik, A., Fjelde, S., 1994. Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture*. 126, 283-290.
- Sernapesca, 2016. Informe Sanitario de Salmonicultura en Centros Marinos Año 2015.
- Smith, P., 1996. Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence. *Aquaculture*. 146, 157-169.
- Smith, P., 2008. Antimicrobial resistance in aquaculture. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics). 27, 243-264.
- Yuksel, S.A., Thompson, K.D., Adams, A., 2006. Rickettsial infections of fish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 6.

Fig. 1 Calibration curve of OTC concentrations with linear regression equation.

Fig. 2 Depletion curve of natural logarithm (Ln) of OTC concentration (ng g^{-1}) in skin-on muscle fillet of Coho salmon as a function of days after the intraperitoneal injection of (A) Product A, (B) Product B, and (C) Product C.

Fig. 3 Depletion curve of natural logarithm (Ln) of OTC concentration (ng g^{-1}) in skin-on muscle fillet of Rainbow trout as a function of days after the intraperitoneal injection of (A) Product A, (B) Product B, (C) Product C under controlled conditions, and (D) Product B under field conditions .



Fig. 4 Depletion curve of natural logarithm (Ln) of OTC concentration (ng g^{-1}) in skin-on muscle fillet of Atlantic salmon as a function of days after the intraperitoneal injection of (A) Product A, (B) Product B, and (C) Product C.



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

Sección Ediciones y Producción

Almte. Manuel Blanco Encalada 839

Fono 56-32-2151500

Valparaíso, Chile

www.ifop.cl



www.ifop.cl