

91177

MFN:
Clasif:
T-739

PRIETOS, GUILLERMO F
Disposicion plasmati

71177

2012

71177



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

**DISPOSICIÓN PLASMÁTICA Y DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE
DANOFLOXACINA Y ENROFLOXACINA EN LECHE
DE CABRAS EN LACTANCIA.**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGISTER EN INOCUIDAD Y CALIDAD DE ALIMENTOS**

**MÉDICO VETERINARIO, ESPECIALISTA EN CIENCIAS CLÍNICAS
GUILLERMO F. PRIETO**

**DIRECTOR: DR. HUGO GARCÍA OVANDO
CO-DIRECTOR: DR. M.S. MIGUEL MANCINI**

RÍO CUARTO 2012

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin
en leche de cabras en lactancia.



Guillermo F. Prieto

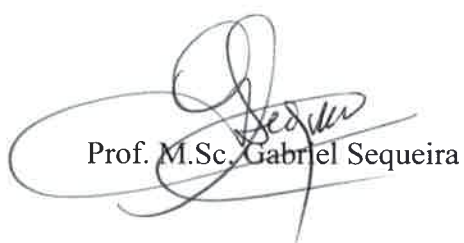


Dr. Hugo García Ovando
Director

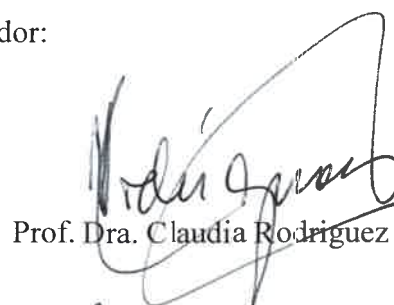


Dr. Miguel A. Mancini
Co-Director

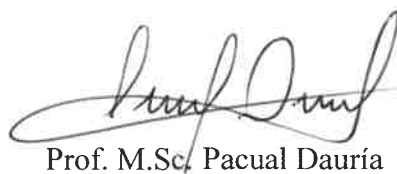
Tribunal Evaluador:



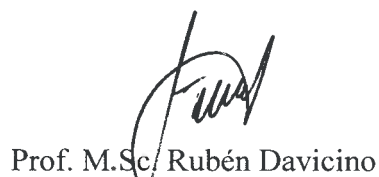
Prof. M.Sc. Gabriel Sequeira



Prof. Dra. Claudia Rodriguez



Prof. M.Sc. Pacual Dauría



Prof. M.Sc. Rubén Davicino

Director Maestría en Inocuidad y Calidad de Alimentos

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Dedicatoria

A mi esposa e hijo, que me acompañaron a todo lo largo de este trabajo.

Agradecimientos

Como lo expresara un amigo, el Dr. Juan Carlos Boggio, en el prólogo de uno de sus libros: "...” es difícil a la hora de escribir, encontrar las palabras adecuadas para los agradecimientos y además se corre el riesgo de dejar a alguien en el tintero y sin desearlo dar un disgusto innecesario”..., aun así voy a intentarlo.

Para el Dr. Carlos Errecalde, su inestimable apoyo, empuje constante, horas de trabajo compartidas, consejos, discusiones y muchas enseñanzas, han permitido que este trabajo llegara a buen puerto.

Al Dr. Miguel Mancini, otro gran amigo a quien debo la realización de este trabajo y sobre todo por el tirón de orejas oportuno, en un momento particular donde la ganas de bajar los brazos y abandonar fueron grandes.

Para Manuel Schneider, Mauro, Bárbara y toda la gente de la Granja SIQUEM, que facilitaron los animales e instalaciones desinteresadamente.

A Bárbara Bourel, becaria de Farmacología, por su colaboración en las tareas a campo y de laboratorio.

A los Dres. Rubén Davicino y Rosendo Liboá, coordinadores de la Maestría, por permitirme ser parte de la misma.

Al Dr. Juan Marioli, por su apoyo y consejos sobre cromatografía.

A Carlos Luders, César Soler, Mario Lazarte, Alicia Weyers que siempre estuvieron aportando sus conocimientos.

A Osvaldo Diez, Armando Nilson y Marcelo Chirino, compañeros de cohorte, con quienes compartí muchas horas en la preparación de trabajos finales y seminarios.

Al cuerpo docente y a la Facultad de Agronomía y Veterinaria, que hicieron posible la Maestría.

Índice de contenidos

Dedicatorias	2
Agradecimientos	2
Resumen	5
Summary	6
1. Introducción	7
2. Aspectos generales de la producción caprina	8
3. Consideraciones generales sobre fluoroquinolonas	10
4. Relación estructura-actividad	13
5. Farmacocinética	14
5.1. Absorción	14
5.2. Distribución	15
5.3. Metabolismo y eliminación	15
6. Mecanismo de acción	16
7. Resistencia	17
8. Aspectos toxicológicos	18
9. Características generales de Enrofloxacin y danofloxacin	19
9.1. Enrofloxacin	19
9.2. Danofloxacin	21
9.3. Integración farmacodinamia- farmacocinética de EFX y DFX	23
10. Sistemas transportadores en la secreción de fluoroquinolonas en la leche	26
11. Residuos, implicancias, definiciones	27
12. Aspectos regulatorios, organismos de control nacionales e internacionales	31
13. Objetivos	33
13.1. General	33
13.2. Específicos	33
14. Materiales y métodos	34
15. Resultados	44
16. Discusión	52
17. Conclusiones	60
18. Bibliografía	61

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Resumen

Danofloxacin y enrofloxacin, son antimicrobianos pertenecientes a la familia de las fluoroquinolonas. Ambos son empleados exclusivamente en Medicina Veterinaria, en distintas especies y por sus características farmacocinéticas, se utilizan para el control de procesos infecciosos de diferente etiología. Pero a nivel mundial, la bibliografía referente al comportamiento farmacocinético de estos agentes en el caprino lechero, es escaso. En nuestro país, el incremento del consumo de leche de cabra se incrementa lenta pero progresivamente. En el presente trabajo se estudió la cinética plasmática y láctea de danofloxacin y enrofloxacin, determinándose el período de resguardo para las mismas.

Se utilizaron cabras en lactancia, clínicamente sanas, divididas en 2 lotes de 6 animales cada uno, a las que se les administró una única dosis de 6 mg/kg de danofloxacin y 7,5 mg/kg de enrofloxacin por vía subcutánea respectivamente. La determinación de las concentraciones en plasma, leche y de residuos se llevó a cabo por método cromatográfico (HPLC). Los resultados demuestran una moderada permanencia en el organismo y elevado volumen de distribución para ambas drogas, con respecto al pasaje a leche es más elevado para danofloxacin. Los períodos de resguardo se establecieron en 7,41 días para danofloxacin y 4,07 días para enrofloxacin respectivamente.

Summary

Danofloxacin and enrofloxacin are antibiotics belonging to the family of drugs called fluoroquinolones. Both are used exclusively in veterinary medicine, in different species and its pharmacokinetic characteristics are used to control infectious processes of different etiology. But globally, the literature regarding the pharmacokinetics of these agents in dairy goats is low. In our country, the increased consumption of goat milk is increased slowly but progressively. This work studied the plasma kinetics and danofloxacin and enrofloxacin dairy, determining the withdrawal period for them. Lactating goats were used, clinically healthy, divided into 2 groups of 6 animals each, which were administered a single dose of 6 mg / kg and 7,5 mg danofloxacin / kg of enrofloxacin subcutaneously respectively.

The determination of the concentrations in plasma, milk and waste was carried out by chromatographic method (HPLC). The results show a moderate retention in the body and high volume of distribution for both drugs, with respect to the passage of milk is higher for danofloxacin. Periods of receipt were established in 7,41 days to 4,07 days for danofloxacin and enrofloxacin, respectively.

1. Introducción

La expansión de la población mundial, determina una demanda creciente y continua de alimentos frescos y elaborados, En este marco, producción y reproducción animal son procesos que dependen de la salud en su más amplio sentido.

Los consumidores muestran a la vez un interés creciente en la forma en que se producen, elaboran y comercializan los alimentos, exigiendo inocuidad de los mismos y con ello protección de la salud humana (Riveros Morcillo, 2008).

Estos desafíos para asegurar la producción y elaboración de alimentos sanos, demandan perfeccionamiento, construcción de nuevos modelos productivos, de industrialización, transporte y comercialización de alimentos a empresas y organismos de control. También imponen una fuerte presión sobre el sector agropecuario favoreciendo los sistemas de producción animal a gran escala, que suponen la concentración de un gran número de animales en espacios reducidos (FAO, 1996; Moreno et al, 2000; Lozano & Arias, 2008;). En este contexto, las enfermedades bacterianas subclínicas pueden dañar la productividad de la explotación pecuaria, y en un momento dado, pueden alcanzar proporciones clínicas y afectar rápidamente a todos los animales (Díez y Calderón, 1997).

Acompañando estos procesos, la farmacología veterinaria crece en forma sostenida incorporando nuevas moléculas y estrategias para la administración de fármacos, que permiten a los clínicos contar con herramientas más eficaces para el tratamiento de patologías de interés, destacándose el importante desarrollo e investigación en materia de antimicrobianos, siendo estos el eje principal de la lucha contra las enfermedades infecciosas.

Como parte del proceso de aprobación de nuevos productos veterinarios para animales productores de alimentos, las autoridades reguladoras solicitan datos de estudios de eliminación del residuo marcador a fin de establecer períodos de espera apropiados en productos comestibles, incluidos la carne, la leche, los huevos y la miel PROSAIA (2011a). Estas normas regulatorias de uso de medicamentos y sus efectos residuales, tienden a garantizar protección para la salud de las personas y del medio ambiente, siendo compatibles con un desarrollo sustentable.

El propósito de este estudio fue establecer y comparar la disposición plasmática y láctea de enrofloxacin y danofloxacin luego de la aplicación subcutánea en cabras, a los efectos de obtener parámetros cinéticos que permitan un adecuado manejo de estos recursos, asegurar su eficacia terapéutica y establecer el periodo de retiro en leche, a fin de que la concentración residual de los antibióticos no supere al correspondiente límite máximo de residuos (LMR).

Los resultados obtenidos en este trabajo, posibilitarán un mayor grado de conocimiento acerca de la utilización racional de los antimicrobianos evaluados, que redundará en la obtención y colocación en el mercado de alimentos más seguros desde el punto de vista de la Salud Pública.

2. Aspectos generales de la producción caprina

La cabra (*Capra hircus*) es un animal que se destaca por su rusticidad, precocidad, docilidad y adaptación al medio ambiente, es una especie principalmente productora de leche, aunque también lo es de carne, cuero e incluso pelo.

Argentina cuenta con unas 4,2 millones de cabras. La mayor densidad de cabezas se registra en las provincias de Santiago del Estero con un 17,4% del hato caprino, Neuquén el 16,7%, Mendoza 16,6% (Cofecyt, 2008). Datos de Chagra Dib, (2004) indicaban que Córdoba reunía aproximadamente 180 mil animales, un 4% del total nacional; cifra que en 2011 descendió a 135.400 cabezas, según lo citado en el PEA (Plan Estratégico Alimentario y Agroindustrial).

Tradicionalmente la producción de carne es la función más importante de la cría caprina argentina, sobre todo en las zonas áridas y semiáridas del Noroeste argentino. Sin embargo, en los últimos años, ha evolucionado la producción lechera en diferentes regiones, por ejemplo en la provincia de Córdoba y los alrededores de la ciudad de Buenos Aires, cuyo producto es utilizado principalmente para la producción de quesos artesanales, procesándose aproximadamente 1,5 millones de litros de leche al año, de los que se obtienen alrededor de 150 toneladas de queso. Una gran parte de esta producción se expende en puestos de venta regionales, en ocasiones sin un exhaustivo control bromatológico. Así también, ha ido en alza su consumo por niños con intolerancia a la lactosa o alergia a la leche de bovino (Cofecyt, 2008).

En los últimos años los precios de la carne caprina han sido alentadores debido a una demanda sostenida. La comercialización de leche caprina residual de crianza de cabritos también han tenido un aumento significativo y generalizado (INTA, 2011).

El desarrollo de la producción caprina argentina está principalmente en manos de pequeños productores, de escasos recursos y bajo nivel sociocultural, constituyéndose en una de las actividades más relevantes para el sustento familiar en zonas donde las estructuras básicas de caminos, electrificación, salud, educación y provisión de agua son insuficientes o no existen (Cofecyt, 2008; INTA, 2011).

A nivel de la producción de leche caprina, si bien existe participación gubernamental (Consejo Federal de Ciencia y Tecnología, INTA, Universidades) y no gubernamental (ONGs), en la implementación de planes para mejorarla, el avance en mejorar cuestiones como la alimentación, falta de infraestructura básica de ordeño y bajos rendimientos por cabra es relativamente lento (Cofecyt, 2008).

Tomando como ejemplo la zona norte y noroeste de Córdoba, en un estudio conjunto de Farmacología y Epidemiología, llevado a cabo por las Universidades Católica de Córdoba, Río Cuarto y CEPROCOR, fue posible establecer como ciertos aspectos culturales de los lugareños se constituyen en una barrera al tratar de implementar mejoras y desterrar el ejercicio de prácticas de producción y sanidad poco eficientes, que impactan en la calidad final de la leche y de subproductos de esta.

En el aspecto sanitario, es común el empleo generalizado de antiparasitarios y antibióticos, según los criterios de productores considerados referentes, transmitiéndose esta información en forma oral. Esto lleva a falencias significativas, por ejemplo indicaciones inapropiadas para antiparasitarios y antibióticos, manifestaciones de resistencia y no observancia de períodos de retiro, entre otros (Boggio et al, 2006).

Es sabido que los residuos de medicamentos veterinarios presentes en los alimentos de origen animal pueden constituir un riesgo potencial para la salud de los consumidores, manifestándose de diversas maneras como reacciones alérgicas, fenómenos de resistencia bacteriana, como también la alteración de los procesos industriales relacionados con el rubro alimenticio.

Dentro de los recursos terapéuticos, los antimicrobianos constituyen herramientas imprescindibles en las explotaciones productivas. Son utilizados en forma rutinaria para

el tratamiento de enfermedades infecciosas, por lo que resultan necesarias pautas que orienten al uso racional de los mismos (Concordet & Toutain, 1997; Cancho et al, 2000; Díaz & Anadón, 2000). En este marco, el empleo de fluoroquinolonas en las especies animales de interés productivo se ha incrementado de forma constante. Sin embargo en el caprino es escasa la información disponible sobre su perfil farmacocinético en cabras criollas.

3. Consideraciones generales sobre fluoroquinolonas

Las quinolonas, también denominadas ácidos carboxílicos quinolónicos o 4-quinolonas, comprenden a un numeroso grupo de agentes antimicrobianos de síntesis, cuya estructura general se muestra en la Figura 1.

El ácido nalidíxico, considerado el precursor del grupo, sintetizado en 1962 por Leshner y colaboradores a partir de la modificación de la cloroquina (Rothlin 1999), exhibe pobre biodisponibilidad oral, un espectro orientado hacia enterobacterias (*Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp.), limitada distribución tisular, corta vida media (1,5 h) y elevadas concentraciones en orina, factores que determinaron su empleo primario sobre infecciones del tracto urinario (Martínez et al, 2006; González-Gómez & Martínez, 2007; Leyva & Leyva, 2008; Sharma et al, 2009; Gardner, 2010; Pallo-Zimmerman, 2010). Desafortunadamente la expresión de resistencia al ácido nalidíxico fue rápida (Sarkozy, 2001).

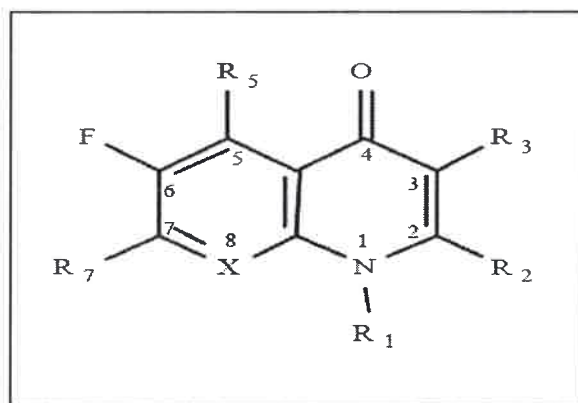


Figura 1. Estructura general del anillo de las fluoroquinolonas (Leyva & Leyva, 2008)

Los ácidos oxolínico, pipemídico, piromídico y cinoxacina, posteriores al ácido nalidíxico, no exhibían diferencias apreciables y sólo se utilizaron como antisépticos urinarios, conformando la primera generación de quinolonas (Emmerson & Jones, 2003; Gutierrez-Zufiaurre, 2004; Emami et al, 2005; Leyva & Leyva, 2008).

A mediados de la década del 70 se establece un intenso desarrollo de nuevas moléculas, focalizado en tres aspectos: 1-Incrementar la actividad sobre cepas resistentes, anaerobios y microorganismos atípicos, 2- reducir la tasa de resistencia emergente y 3- mejorar el perfil farmacocinético y farmacodinámico (Sharma et al, 2009). En 1976 surge la flumequina, primera monofluoroquinolona con un átomo de flúor en la posición C6, modificación estructural que incrementa la actividad sobre Gram positivos (Emmerson & Jones, 2003)

Durante los años ochenta, se observa que la adición de un átomo de flúor en la posición 6 y un anillo piperazina en el carbono 7, originan nuevas estructuras, con mejoras tanto en actividad biológica como en propiedades farmacocinéticas tales como buena absorción oral, extensión del espectro antibacteriano sobre enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y cocos Gram positivos, amplia distribución tisular, concentraciones plasmáticas y tisulares bactericidas y escasa incidencia de efectos adversos (Brown, 1996; Tillotson, 1996; Martínez et al, 2006). De este modo, estas quinolonas se convierten en fármacos de primera línea frente a diferentes infecciones, constituyendo un nuevo grupo denominado de segunda generación, piperazinil-fluoroquinolonas o simplemente fluoroquinolonas, aprobándose para uso clínico en humanos norfloxacin, ciprofloxacina y ofloxacina (Leyva & Leyva, 2008). A finales de la década se incorpora además la utilización de enrofloxacin en animales domésticos (Martínez et al, 2006).

Las investigaciones han sido intensas hasta la fecha, estimándose en más de 10.000 las moléculas investigadas y/o sintetizadas. Sin embargo no todas han sido autorizadas para uso clínico, contándose actualmente con cuatro generaciones (Tabla 1).

Si bien no existe una línea que delimite claramente a los agentes de tercera y cuarta generación, estos últimos presentan una serie de propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas que constituyen ventajas significativas como agentes antimicrobianos.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacina en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Entre las propiedades de mayor relevancia pueden destacarse la disolución rápida en el medio gastrointestinal con una adecuada y rápida absorción intestinal, concentraciones máximas en cortos períodos de tiempo, elevados volúmenes de distribución y altas elevadas concentraciones, superiores a las plasmáticas, a nivel pulmonar, renal, aparato reproductor, vesícula y líquido biliar, esto también se observa en macrófagos y otras células fagocíticas. La mayoría presenta vidas medias plasmáticas prolongadas, que permiten administrarlas cada 24 horas (Brown, 1996; Ball, 2000; Martínez et al, 2006).

Su actividad antimicrobiana es amplia abarcando bacterias Gram-negativas, incrementada hacia Gram-positivas, anaerobios y micobacterias (Grobbe et al, 2007; Leyva & Leyva, 2008).

Tabla 1. Generaciones de fluoroquinolonas

Generación	Antimicrobiano
Primera	Acido Nalidíxico Acido Oxolínico Acido Pipemídico Cinoxacina
Segunda	Flumequina Enrofloxacin Danofloxacin Difloxacin Norfloxacin Ciprofloxacin Marbofloxacin Ofloxacin Pefloxacin Sarafloxacin
Tercera	Levofloxacin Esparfoxacin Clinafloxacin Lomefloxacin Grepafloxacin Balofloxacin Orbifloxacin
Cuarta	Trovafloxacin Gatifloxacin Moxifloxacin Gemifloxacin Sitafloxacin

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

4. Relación estructura-actividad

Las fluoroquinolonas son antimicrobianos conformados por un anillo bicíclico que combina el núcleo β -piridona, ácido carboxílico y un anillo aromático: naftidina, quinolina, cinolina o piridopirimidina.

Las fluoroquinolonas son moléculas anfóteras que pueden estar protonadas en el grupo carboxilo ó en la amina terciaria; su pK_a se ubica entre 5,2 y 8,5 y son ligeramente hidrosolubles a pH fisiológico. Se comportan como zwitteriones y están cargados tanto los correspondientes grupos aniónicos como los catiónicos. A pesar del grupo carboxilo, el grado de ionización de estos compuestos es limitado y exhiben elevada liposolubilidad en un pH comprendido entre 6 y 8 (Brown, 1996; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004; González Gómez & Nieto Martínez, 2007; Papich & Riviere, 2009).

Si bien inicialmente se consideraron como un grupo homogéneo, con propiedades semejantes, la posibilidad de transformar la estructura llevó a un desarrollo vertiginoso del grupo, originando agentes provistos de mayor espectro antibacteriano, elevada penetración tisular, seguros y con menor manifestación de resistencia microbiana (Andersson & MacGowan, 2003; Emami et al, 2005).

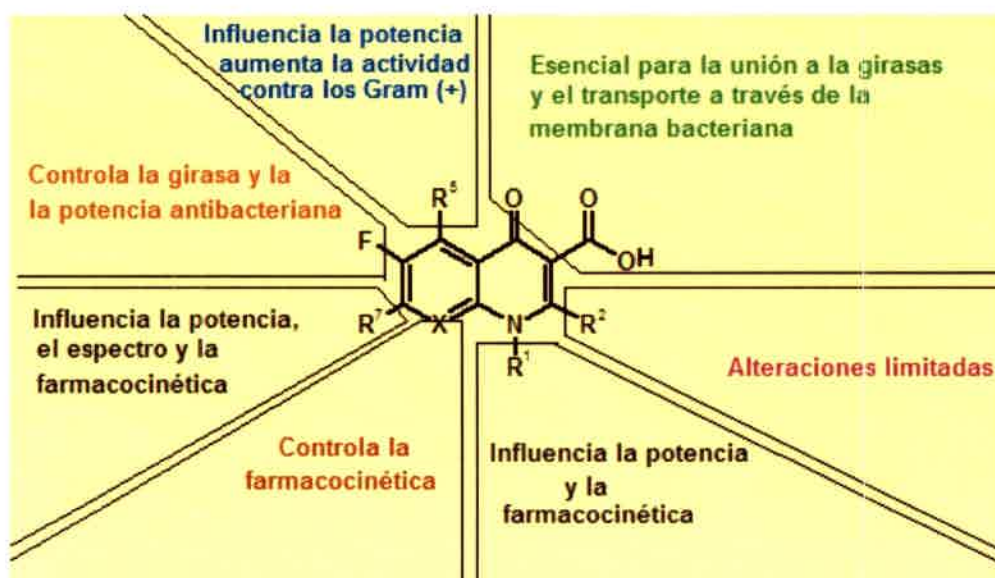


Figura 2. Efectos de las sustituciones en las fluoroquinolonas (Adaptado de González Gómez & Martínez, 2007)

Las sustituciones en la estructura en distintas posiciones (P), pueden ser constantes, habituales o variables. Constantes son las que definen al grupo, habituales son aquellas que tienen pocas opciones de cambio, generalmente ocurren en P2 y P6 y las sustituciones variables pueden estar en N1 y R5 (esenciales) y R7 y X8 (importantes, aunque accesorias), donde las posibilidades de sustitución son mayores.

El conjunto de las sustituciones pueden actuar de forma positiva o negativa entre sí en cuanto a la actividad antibacteriana, farmacocinética, toxicidad y perfil de interacciones. En la Figura 2 se resumen los efectos de las sustituciones.

5. Farmacocinética

Las fluoroquinolonas se comportan *in vivo* como moléculas de elevada liposolubilidad. En solución se comportan como bases débiles y su lipofilia determina el comportamiento cinético (Lees & Aliabadi, 2002).

5.1. Absorción

En términos generales, luego de la administración por vía oral y al considerar la variación individual entre los diferentes compuestos y especies, la absorción es elevada en monogástricos y prerrumiantes, menor en monogástricos de transición (equinos) y escasa en rumiantes (González Gómez & Martínez, 2007).

La presencia de alimentos en el tracto digestivo no ejerce un efecto significativo, puede retrasar la absorción, pero la cuantía de la misma representada por el área bajo la curva (ABC), no se ve afectada (Brown, 1996; Martínez et al, 2006; González Gómez & Martínez, 2007; Papich & Riviere, 2009).

Los rumiantes presentan tasas de absorción digestiva con gran variabilidad. Se reporta un 61% en ovinos (Vancutsem et al, 1990), cifra que desciende a 10% para enrofloxacin (Lees & Aliabadi, 2002).

La limitada absorción que se observa en rumiantes puede tener su origen en la adsorción de las fluoroquinolonas al contenido de los preestómagos y a la quelación, más que a la destrucción de las mismas (Martinez et al, 2006).



La absorción tras la aplicación intramuscular y subcutánea es prácticamente completa. Sin embargo pueden presentarse demoras en la absorción en algunos casos, atribuible a la fijación a los tejidos o por la irritación producida que interfiere con la circulación local (Brown, 1996; González Gómez & Martínez, 2007; Papich & Riviere 2009).

5.2. Distribución

Por su carácter lipofílico, tras la administración se obtienen volúmenes de distribución que pueden variar de 1 a 5 L/Kg (Brown, 1996; Lees & Aliabadi, 2002). Las concentraciones son elevadas en aparato respiratorio: secreciones nasal y bronquial, mucosa, epitelio, fluido de revestimiento y macrófagos alveolares (Wise, 1991; Hawkins et al, 1998; Otero et al, 2001b), así como en el aparato urogenital, digestivo, hígado, músculo, piel y glándula mamaria. En todos estos territorios, por lo general, las concentraciones son superiores a las plasmáticas. También ingresan y alcanzan concentraciones terapéuticas en humor acuoso, tejido linfático, hueso, articulaciones y líquido cefalorraquídeo (Brouwers, 1987; Sumano López, 1993; Brown, 1996; Otero et al, 2001b; González Gómez & Martínez, 2007; Papich & Riviere, 2009).

5.3. Metabolismo y eliminación

La eliminación de fluoroquinolonas se lleve a cabo por vía renal, metabolismo hepático o mixto (hepático-renal).

La excreción renal, variable según el compuesto, ocurre por filtración glomerular y/o secreción tubular activa, lo que permite que se alcancen altas concentraciones urinarias. Para la mayor parte de las fluoroquinolonas, los compuestos madre y sus metabolitos se recuperan en orina y escasamente en heces. Una excepción es difloxacin, donde se recupera hasta un 80% (Brown, 1996; Papich & Riviere, 2009)

La metabolización es hepática, la extensión depende del tipo de compuesto y especie animal (Brown, 1996; Otero et al, 2001b; Lees & Aliabadi, 2002; Martínez et

al, 2006). Algunos de los metabolitos originados son activos, sin embargo no revisten mayor relevancia, exceptuando a ciprofloxacina (Papich & Riviere, 2009).

La excreción biliar y transintestinal es variable según el compuesto, pero generalmente es bajo (Fitton, 1992). Es posible también la circulación enterohepática por acción de β -glucuronidasas intestinales, liberando el compuesto primario o metabolitos activos (González Gómez & Martínez, 2007; Rubio Langre, 2011).

6. Mecanismo de acción

Las fluoroquinolonas interactúan inhibiendo la ADN girasa bacteriana, enzima involucrada en la transcripción, recombinación, replicación y reparación del ADN (Otero et al, 2001a; Emami et al, 2005; Sharma et al, 2009).

La ADN girasa ó Topoisomerasa II, produce un superenrollamiento helicoidal negativo en la molécula de ADN y es crítica en el mantenimiento de la densidad genómica (Anderson et al, 1998). Las quinolonas inhiben además a la Topoisomerasa IV, esencial en la segregación cromosómica en células procarióticas.

Se ha sugerido que las quinolonas interactúan con la ADN girasa en organismos Gram negativos y con la Topoisomerasa IV en organismos Gram positivos, enzimas esenciales para la replicación y transcripción del ADN, cuya inhibición por parte de estos antimicrobianos conduce a la muerte celular (Hooper, 2001; Otero et al, 2001a; Sharma et al, 2009).

Considerando que las enzimas difieren en sus funciones, es probable que las bacterias difieran también en sus respuestas a las quinolonas de acuerdo a cuál sea la diana principal (Drlica et al, 1997; Otero et al, 2001a).

Aun cuando las bacterias, como las células de los mamíferos, poseen material genético ADN de tipo bicatenario, existen diferencias en su estructura. Las bacterias contienen sólo un cromosoma formado por una combinación ADN, ARN y proteína (ARN polimerasa). El cromosoma bacteriano no está envuelto por una membrana y se concatena, en un número variable de dominios o zonas condensadas. En cambio en los mamíferos superiores posee un número definido de dominios y el ADN se encuentra rodeado por una membrana. Otra diferencia es que la enzima mamífera está compuesta

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacina en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

por dos subunidades, en lugar de cuatro. Estas diferencias estructurales determinan que para inhibir a la girasa de los mamíferos se necesite una concentración 100 veces superior a la que corresponde a la enzima bacteriana (Wang, 1974; Smith, 1984; Stahlmann & Lode, 2000; González Gómez & Martínez, 2007).

7. Resistencia

La resistencia a los antibióticos ocurre en las bacterias de los animales domésticos y varía enormemente según las prácticas de gestión, el uso de antimicrobianos y el grado y la naturaleza de las enfermedades presentes en las unidades pecuarias (Soulsby, 1999).

Los microorganismos contienen genes propios que, de forma natural, provocan de resistencia a los antimicrobianos. Si como consecuencia de ello, el microorganismo sobrevive a las concentraciones que se alcanzan in vivo, la resistencia adquiere importancia clínica, fenómeno que constituye una de las principales dificultades en el tratamiento eficaz de las enfermedades.

Los mecanismos de resistencia bacteriana a las fluoroquinolonas pueden agruparse en tres categorías:

-Modificación del sitio blanco, de tipo cromosómica, con mutaciones en sitios específicos conocidos como RDRQ (Regiones Determinantes de Resistencia a Quinolonas). Las mutaciones resultan en sustituciones críticas de aminoácidos, que disminuyen la interacción de las quinolonas con las enzimas (Ruiz, 2003; Emami et al, 2005; Hopkins et al, 2005; Rodríguez-Martínez, 2005; Marín-Carrillo, 2008; Moudgal & Kaatz, 2009).

-Menor ingreso de fármacos, las quinolonas deben atravesar la membrana externa, espacio periplásmico, pared celular y la membrana citoplásmica para alcanzar a las topoisomerasas (Cordiés Jackson et al, 1998; Hopkins et al, 2005; Emami et al, 2005; Moudgal & Kaatz, 2009)

- Expulsión del antibacteriano desde el medio intracelular al extracelular por acción de transportadores endógenos activos, conocidos como ABCs (ATP-Binding Cassette). Estos constituyen una familia de proteínas altamente evolucionadas, que

utilizan energía a partir de la hidrólisis del ATP para traslocar un amplio espectro de sustratos a través de membranas celulares (Cattoir, 2004; Kaminsky et al, 2006).

8. Aspectos toxicológicos

Después de más de dos décadas de utilización, en términos generales se considera a las fluoroquinolonas como agentes relativamente seguros y bien tolerados, similar a los antibióticos betalactámicos y macrólidos (Stahlmann & Lode, 2000; Sprandel & Rodvold, 2003; Bolon, 2009).

Sin embargo, se observan variaciones entre sus integrantes, en parte como consecuencia de las modificaciones realizadas en la estructura molecular y también por la disposición tisular que logran algunos agentes, por ejemplo, en el sistema nervioso (Bertino & Fish, 2000; Scholar, 2002; Ball, 2003).

Los efectos adversos más frecuentes comprenden reacciones dermatológicas, particularmente fototoxicidad (Bertino & Fish, 2000; Stahlmann, 2002; Sprandel & Rodvold, 2003; Dall'Acqua, 2007), alteraciones digestivas, como náuseas, vómitos ó diarreas y alteraciones nerviosas (Stahlmann & Lode, 2000).

Según Stahlmann (2002), la neurotoxicidad se relaciona con la activación del receptor N-metil-D-aspartato ó NMDA, y es reversible cuando se discontinúa la administración (Bertino & Fish, 2000; González Gómez & Martínez, 2007).

Es controvertido el uso de fluoroquinolonas en individuos jóvenes, debido que causan lesiones en el tejido conectivo, afectando el cartílago articular en animales en crecimiento (Van der Linden et al, 1999; Bertino & Fish, 2000; Stahlmann, 2002; Sprandel & Rodvold, 2003). Se postula que el daño puede originarse en una estimulación temprana por parte de las fluoroquinolonas, del metabolismo oxidativo en los condrocitos inmaduros, con formación de moléculas reactivas de O₂ que lleva a la muerte celular. Adicionalmente, se acumularían en el cartílago formando complejos con cationes divalentes, fundamentalmente con magnesio, cuya menor disponibilidad altera la síntesis de colágeno y proteoglicano (Mašlanka et al, 2004; González Gómez & Martínez, 2007; Kato, 2008).

Estos agentes provocan inflamación e incluso ruptura de tendones que no depende de la edad de los pacientes y se verifica con todos los miembros del grupo, principalmente con ofloxacin (Van der Linden et al, 1999) y ciprofloxacina (Khaliq & Zhanel, 2003).

Son factores de riesgo inherentes a esta patología las afecciones renales concomitantes y los tratamientos simultáneos con glucocorticoides y no necesariamente el daño se asocia con la duración del tratamiento (Khaliq & Zhanel, 2003).

Algunos integrantes del grupo fueron excluidos del mercado farmacéutico mundial debido que inducen la manifestación de serias patologías. Por ejemplo temafloxacina provoca hemólisis, trombocitopenia y falla renal (Stahlmann, 2002; Ball, 2003; Rouveix, 2003); trovafloxacina induce hepatotoxicidad (Ball, 2003; Rouveix, 2003); temafloxacina y grepafloxacina originan efectos cardiovasculares, asociados con prolongación del intervalo Q-T (Rouveix, 2003).

En animales domésticos, los efectos adversos son escasos según las dosis indicadas y condiciones recomendadas (Anadón, 1992; Brown, 1996; Walker 2002).

9. Características generales de enrofloxacin y danofloxacin

9.1. Enrofloxacin

Es un derivado del ácido nalidíxico, que fue desarrollada en los años 80 para uso exclusivo en Medicina Veterinaria. Las características farmacológicas de enrofloxacin (EFX) se enmarcan en el perfil general de las fluoroquinolonas, pero con particularidades farmacocinéticas y farmacodinámicas superadoras.

Posee un núcleo básico denominado “dihidroquinolina” o anillo 4-quinolónico, , clasificado químicamente como 1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-ácido quinolon carboxílico, que en la posición 7 tiene un anillo 4-metilopiperazinil que le confiere mayor potencia con respecto a otras fluoroquinolonas. Su comportamiento farmacocinético está influenciado por la presencia de un grupo etilo en la posición 4, que le confiere una absorción elevada y sumado a su bajo peso molecular, una elevada biodisponibilidad tisular que provee concentraciones inhibitorias mínimas frente una gran cantidad de microorganismos incluso a los poco susceptibles o

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

resistentes a otros antimicrobianos de uso corriente. Exhibe actividad sobre bacilos Gram negativos: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Haemophilus* spp., *Pasteurella* spp., con excepción de *Pseudomonas aeruginosa*. Es menos potente contra bacterias Gram positivas como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Erysipelotrix rhusiopathiae*, actuando también sobre anaerobios (Scheer, 1987; Otero et al, 2001a).

Su índice terapéutico es elevado y permite la administración en terapias combinadas con otros medicamentos (Otero et al, 2001a).

La enrofloxacin exhibe disponibilidad oral relativamente alta en casi todas las especies, la cual oscila entre el 50-75 %. En terneros García Ovando et al. (1996) observaron 69,8%, que puede llegar al 80%. Sin embargo en rumiantes adultos se reduce a no más del 10 % (Scheer 1987; Brown, 1996; Otero et al, 2001b; Sárközy, 2001). En equinos varía desde un 42 % en potrillos a 63% en adultos (Papich & Riviere, 2009). El tiempo que tarda en alcanzar la máxima concentración (Tmax), es variable entre especies y se aprecia incluso intraespecie (aves y herbívoros).

La disponibilidad parenteral es prácticamente completa en todas las especies, alcanzando picos plasmáticos luego 1-2 horas post administración. Si bien la vía intramuscular es la más utilizada, la subcutánea provee también una elevada biodisponibilidad (Otero et. al, 2001b; Rubio Langre, 2011). La unión a proteínas plasmáticas, es variable según la especie oscilando entre un 10 a un 70% (Papich & Riviere, 2009).

El volumen de distribución (Vd) de enrofloxacin es elevado en la mayoría de las especies animales. Alcanza altas concentraciones en los distintos tejidos orgánicos: aparato respiratorio (secreciones, mucosa, epitelio, macrófagos alveolares y bronquios), hígado y tracto urinario, también llega con rapidez a la glándula mamaria (Sumano López, 1993).

Enrofloxacin se metaboliza en hígado parcialmente a ciprofloxacina (CFX), la que conserva una considerable actividad antimicrobiana y a otros metabolitos (Küng et al, 1993; Kaartinen et al, 1995; Anadón et al, 1995). También es posible la metabolización en otros sitios como la ubre (Malbe et al, 1996) o los macrófagos (Hawkins et al, 1998).

No se ha reportado con la droga teratogenicidad, embriotoxicidad ni mutagenicidad en animales, si bien a partir de ensayos en linfocitos humanos se ha informado un posible efecto genotóxico, tampoco presentó efectos indeseables en sistema nervioso central, cardiovascular, ni efectos alérgicos (Otero et al, 2001b).

La aplicación subcutánea e intramuscular, puede ocasionar inflamación y dolor en el sitio de inyección en algunos casos (Pyörälä, 1994; Kaartinen et al, 1997)

Terapéuticamente se emplea en patologías de bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, pollos, pavos, perros y gatos para controlar infecciones bacterianas causadas por organismos sensibles (Bauditz, 1987, EMEA, 1998a). Se administra subcutánea a bovinos, intramuscular a porcinos y oral a cerdos, pavos y pollos, para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio y alimentario.

Las dosis recomendadas son 2,5 a 7,5 mg/kg/día durante tres a cinco días, para bovinos y porcinos o 10 mg kg/día durante tres a diez días, para pollos y pavos (EMEA, 1998). En algunos países europeos EFX está autorizada para ser usada en ovejas, cabras y conejos, en dosis de 2,5 a 5 mg/kg (EMEA, 1998a).

9.2. Danofloxacin

Danofloxacin (DFX), pertenece a las fluoroquinolonas de segunda generación, destinada para su aplicación únicamente en animales domésticos (Giles et al, 1991; Brown, 1996; Traeder, 1996; Walker, 2002; Aliabadi & Lees, 2003).

Químicamente es el 1-Ciclopropil -6-fluoro-7-[(1S,4S)-3-metil-3,6-diazabicyclo[2.2.1]heptano-6-yl]-4-oxoquinolin-3- ácido carboxílico, empleándose en la terapéutica bajo la forma de mesilato de danofloxacin, para el tratamiento de enfermedades respiratorias, digestivas, urogenitales, metritis, abscesos, infecciones en piel y tejidos blandos en bovinos, porcinos, aves, ovinos y caprinos.

Ejerce una rápida actividad bactericida sobre gram negativos y ciertos gram positivos y micoplasmas relevantes en Medicina Veterinaria (Aliabadi & Lees, 2003), inclusive *Pasteurella multocida*, *Mannhemia haemolytica*, patógenos intracelulares (*Brucella* spp. y *Clamidia* spp.) y limitada actividad sobre anaerobios (Aliabadi et al, 2003). Su acción es bactericida y posee además un marcado efecto posantibiótico (PAE)

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

(Sarasola et al, 2002; Schrickx & Fink-Gremmels, 2007; Shafarin et al, 2009). En presencia de *M. haemolytica* la CIM₉₀ fue establecida en 0,04 µg/ml (Aliabadi & Lees, 2003).

Los antecedentes cinéticos de DFX indican que presenta una rápida absorción y distribución a partir de la circulación general tras la administración parenteral en animales domésticos (Escudero, 2007; Mestorino et al 2009; Papich & Riviere, 2009).

En las especies en que ha sido estudiada, brinda elevada biodisponibilidad tras la aplicación intramuscular ó subcutánea excediendo el 75 % (Mc Kellar et al, 1998; Sárközy, 2001; Aliabadi & Lees, 2003) y altos volúmenes de distribución (Vd), que oscilan en caprinos entre 1,42 (Atef et al, 2001) y 6,28 L/kg (Otero et al, 2009) y 4,3 L/kg en bovinos (Friis, 1993), indicando notable disposición tisular.

En distintas especies domésticas, danofloxacin experimenta moderada permanencia en el organismo (Mann & Frame, 1992; Mc Kellar et al, 1998), conforme expresa la vida media de eliminación ($t_{1/2 \beta}$) que oscila entre de 1.3 a 5.9 h en caprinos (Atef et al, 2001, Otero et al 2009), 2,9 a 7,4 h en bovinos (Mann & Frame, 1992; Aliabadi & Lees, 2003), 3,3 h en ovinos (Mc Kellar et al, 1998) y 5,4 y 6,9 h en porcinos para las vías endovenosa e intramuscular, respectivamente (Richez et al, 1996).

En el aparato respiratorio, las concentraciones son altas en tejido sano como neumónico, en bronquios y secreciones, tanto en bovinos (Giles et al, 1991; McKellar et al, 1999), como en cerdos (Mann & Frame, 1992; Lindecrona et al, 2000) y ovinos (McKellar et al, 1998)

Idénticas características se verifican en el aparato digestivo a nivel de mucosa, duodeno, cólon, íleon y nódulos linfáticos en cerdos (Mann & Frame, 1992; Lindecrona et al, 2000) y ovinos (McKellar et al, 1998). En estos últimos también se han verificado altas concentraciones post administración aproximadamente en 1 hora en piel y 2-4 en cerebro (McKellar et al, 1998).

Danofloxacin también tiene una rápida llegada a la glándula mamaria. Shem-Tov et al (1998b), encontraron en bovinos luego de una dosis de 1,25 mg/kg, dos particularidades significativas, las concentraciones lácteas se igualaron con las de sangre a los 90 y 120 minutos post administración endovenosa e intramuscular respectivamente y concentraciones entre 4 y 15 veces superiores a las de sangre luego

de 3 a 4 horas posteriores a la administración endovenosa. Resultados similares fueron obtenidos por el mismo grupo de trabajo en ovinos (Shem-Tov et al, 1998a).

Recientemente, Mestorino et al, (2009), luego de administrar en bovinos una dosis de 6 mg/kg de una solución al 18%, observaron a las 4 horas post administración, concentraciones en leche cuatro veces mayores que en plasma.

La tasa de unión a proteínas plasmáticas es variable según la especie. En bovinos es del 25 al 50% según la concentración alcanzada en sangre, 13 al 15% en caprinos y 36 al 52% en cerdos (USP, 2007).

La biotransformación de danofloxacin, ha sido investigada en bovinos, perros, aves, cerdos y ratas, sin presentar diferencias significativas. El metabolito N-desmetildanofloxacin, si bien conserva actividad, no contribuye a la acción antibacteriana de danofloxacin por la baja concentración que alcanza en los tejidos.

Desde el punto de vista toxicológico danofloxacin, no ha evidenciado teratogenicidad ni carcinogenicidad (USP, 2007). Los efectos secundarios posibles, son los comunes a las fluoroquinolonas.

9.3. Integración farmacodinamia- farmacocinética de EFX y DFX

Una terapia racional con antibióticos requiere regímenes de dosificación adecuados, para garantizar la eficacia clínica del tratamiento y para minimizar la selección y la diseminación de cepas de microorganismos patógenos resistentes.

La farmacocinética (PK), permite describir y predecir las concentraciones de un fármaco en los diferentes líquidos biológicos, que en combinación con la farmacodinamia (PD), cuyo principal indicador es la concentración inhibitoria mínima (CIM), contribuyendo al desarrollo de modelos farmacocinéticos /farmacodinámicos (PK/PD) que permiten mejorar la eficiencia del uso de los antimicrobianos (Figura 3). Existen a la fecha innumerables estudios experimentales y clínicos que avalan esta integración (McKinnon & Davis, 2004; San Andrés Larrea & Boggio, 2007; Lees et al, 2008).

Se acepta en términos generales, que un antibacteriano es efectivo cuando obtiene concentraciones superiores a la CIM en el sitio de infección (Beltrán, 2004; San Andrés Larrea & Boggio, 2007; Lees et al, 2008).

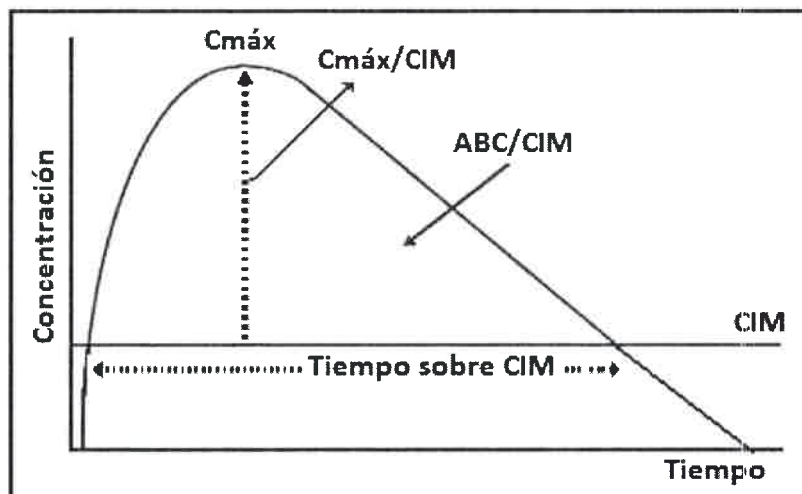


Figura 3. Relación PK-PD (McKinnon & Davis, 2004)

Los principales parámetros PK-PD que mejor se correlacionan con la eficacia terapéutica son la concentración máxima ($C_{máx}$), a través del cociente $C_{máx}/CIM$, la relación área bajo la curva de las 24 horas y el CIM (ABC/CIM) y el tiempo (t) que las concentraciones plasmáticas ó tisulares superan la CIM del patógeno considerado ($t > CIM$) (McKinnon & Davis, 2004; San Andrés Larrea & Boggio, 2007; Lees et al, 2008). Según estos parámetros, los antimicrobianos pueden clasificarse en:

a) Antibióticos con efecto tiempo-dependiente y diferente persistencia. Algunos grupos antibacterianos como betalactámicos y macrólidos clásicos, exhiben efectos poco persistentes requiriendo aplicaciones frecuentes para optimizar su actividad ó la administración de antibióticos con extensa vida media biológica.

En estos casos el parámetro farmacodinámico que mejor se correlaciona con la eficacia es el $t > CIM$, donde t refiere al porcentaje de tiempo entre intervalos de dosis, que excede la CIM (McKellar et al, 2004).

Otros antibióticos, como azitromicina ó los pertenecientes al grupo de las tetraciclinas, poseen efectos más persistentes debido al efecto postantibiótico, de modo que no demandan administraciones frecuentes, siendo el cociente ABC/CIM el

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

parámetro que mejor se correlaciona con eficacia clínica (Barger et al, 2003; McKellar et al, 2004; Rybak, 2006).

Con estos fármacos, se obtienen efectos bacteriostáticos cuando la estimación $t > CIM$ corresponde al 30 al 40% del intervalo entre dosis, y efectos bactericidas si el intervalo se ubica entre el 60 y 70% (McKellar et al, 2004).

b) Antibióticos concentración dependiente: su eficacia se correlaciona con niveles séricos ó tisulares elevados ocasionando un efecto persistente y prolongado. Dosis altas producen un elevado cociente inhibitorio y marcada acción bactericida, en esta categoría se encuentran fluoroquinolonas, entre ellas EFX y DFX.

En general la administración de antibacterianos siempre debe considerar los niveles alcanzados en el sitio target y la CIM de las bacterias susceptibles, de manera de asegurar la máxima eficacia del tratamiento.

En el éxito del tratamiento, la importancia de lograr concentraciones en el sitio de infección, avala la cuantificación de concentraciones plasmáticas ó tisulares de antimicrobianos (Beltrán, 2004; McKellar et al, 2004; Lees et al, 2008).

En infecciones sobre órganos con escaso ingreso, las consideraciones farmacodinámicas adquieren máxima importancia, por cuanto las concentraciones plasmáticas no siempre son similares a las del sitio de infección (McKellar et al, 2004; Lees et al, 2008).

En presencia de bacterias muy susceptibles en inóculos bajos, la eficacia del tratamiento no depende de manera crucial del modo de administración (Beltrán, 2004). En cambio, en infecciones causadas por agentes resistentes en inóculos altos, la predeterminación de objetivos farmacodinámicos específicos para cada antibacteriano puede ser fundamental en el éxito de la terapia y para establecer una dosis racional (McKellar et al, 2004; San Andrés Larrea & Boggio, 2007; Lees et al, 2008).

Los resultados que se obtienen de la relación entre t , CIM, $C_{m\acute{a}x}$ y ABC, originan lo que se conoce como “*predictores de eficacia*”, útiles para implementar un régimen de dosificación. Un tratamiento con antimicrobianos se define por la dosis y el intervalo de aplicación, establecidos a partir de la relación PK-PD integrados con los datos de variación intra e inter-individual (Martín-Jiménez & Riviere, 1998; Lees & Aliabadi, 2002b; McKellar et al, 2004; Toutain, 2008).

Estos conocimientos han llevado a la industria farmacéutica, a la reformulación de sus productos, con el objetivo de adecuarse a la relación PK-PD. En el caso de EFX se producen preparados al 10% con una dosis indicativa de 7,5 mg/kg versus la formulación original del 5% con dosis de 2,5-5 mg/kg. De la misma manera DFX se comercializa al 18% con una dosis de 6 mg/kg, respecto de su precursor al 2,5% a dosis de 1,25-2,5 mg/kg.

Si bien el objetivo de estas modificaciones es la búsqueda de de eficacia, interesa conocer también, como impactan estas nuevas formulaciones en la persistencia de estos agentes o sus metabolitos en los productos destinados a consumo, para evaluar si es necesario readecuar o no los plazos de espera.

10. Sistemas transportadores en la secreción de fluoroquinolonas en la leche

Es aceptado que los xenobióticos llegan a leche por difusión pasiva no iónica y la magnitud de la distribución está en relación a sus propiedades farmacocinéticas como liposolubilidad, grado de ionización y grado de unión a proteínas en sangre y en la ubre (Toutain & Busquet-Melou 2004 a, b, c, d; Ziv, 1980).

Estudios comparativos sugieren que durante la lactación se puede incrementar la tasa de eliminación de fluoroquinolonas desde la sangre. Estos cambios en la disposición han sido demostrados con enrofloxacin en ovejas (Pulido, 2006), marbofloxacin en cerdas (Petracca et al, 1993) y norfloxacin en ovejas (Soback et al, 1994).

En los últimos años se ha estudiado la participación de transportadores de alta capacidad de eflujo y su relación con la concentración elevada de quinolonas en leche. Estos transportadores cumplen roles importantes en el mantenimiento de la fisiología, protegiendo al organismo de la toxicidad de xenobióticos y metabolitos endógenos. Su disfunción también se asocia a la manifestación de distintas patologías (Haritova et al, 2006; Sharom, 2008).

Son proteínas de membrana denominadas ATP-Binding Cassettes (ABCs), están presentes en los sistemas biológicos y se expresan en en la mayoría de los organismos vivientes desde bacterias a humanos. Transportan un gran número de sustancias, que

incluyen azúcares, aminoácidos, toxinas, lípidos, esteroides, metabolitos endógenos, iones, diversas drogas y antibióticos (Sharom, 2008; Schrickx & Fink-Gremmels, 2007). Están localizadas en las membranas del hígado, intestino, riñón y barrera hemato-encefálica entre otras (Schrickx & Fink-Gremmels, 2007). Si bien numerosos, en Medicina Veterinaria son de relevancia los ABCs B1, C1, C2, C4 y G2, involucrados en el transporte de drogas (y/o sus metabolitos), siendo sustratos de uno o más de ellos cimetidina, loperamida, macrólidos, ivermectina, fluoroquinolonas y antineoplásicos.

En lo relativo a la farmacocinética, la relevancia de los ABC en la absorción y disposición de drogas ha sido establecida. La glicoproteína-P de permeabilidad y el BCRP (Breast Cancer Resistant Protein), están codificados por los genes ABCC1 y ABCG2 respectivamente. Ambos tienen una amplia distribución tisular afectando la absorción, distribución y eliminación. En tanto el MRP2 (Multidrug Resistance Protein), es codificado por el gen ABCC2 y es de suma importancia en el hígado y riñones como transportador de conjugados hidrofílicos y aniones en bilis y orina (Schrickx & Fink-Gremmels, 2007).

Trabajos de Jonker et al. (2005), Merino et al. (2005 a,b), Pulido et al. (2006), Merino et al. (2006) y Kusuhara & Sugiyama (2007), muestran que el BCRP, tiene una elevada expresión durante la lactancia en bovinos, ovinos, ratas y también en humanos, facilitando la excreción de drogas y xenobióticos. Esto que explicaría el pasaje a leche de enrofloxacin y ciprofloxacina en altas concentraciones del cual son sustratos. En este contexto y apoyándose en estos trabajos, Schrickx & Fink-Gremmels (2007) proponen también a DFX como sustrato de BCRP.

11. Residuos, implicancias, definiciones

El concepto de calidad es elemental en un sistema de producción animal, tanto extensivo como intensivo, puesto que la industria transformadora y el consumidor final, requieren un producto con características adecuadas, seguro y máximas garantías de salubridad (Riviere & Sundlof, 2009).

El empleo de productos farmacológicos con un fin terapéutico, zootécnico o como promotores de crecimiento es variado y susceptible de dejar residuos en los alimentos procedentes de los animales tratados.

Se considera *residuo* a la sustancia farmacológicamente activa, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación y sus metabolitos que se acumulen en células, tejidos, órganos o productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les ha administrado un medicamento veterinario determinado (Davicino, 2003; Riviere & Sundlof, 2009).

En el pasado, el control de los alimentos se orientaba al examen de productos finales y a la inspección de los establecimientos elaboradores. En la actualidad, la incorporación de nuevas tecnologías en los procesos de producción de alimentos, supone la necesidad de involucrar de manera integral y multidisciplinaria toda la cadena productiva desde el lugar donde se producen hasta su consumo, debido que muchos de los problemas de inocuidad de los alimentos se originan en la producción primaria.

Existen tres aspectos importantes a considerar relacionados con la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos (Davicino, 2003):

*Salud Pública: Existen antecedentes que han demostrado capacidad de provocar alergia, sinergismo o inhibiciones terapéuticas, resistencia microbiana, teratogenicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad y cambios morfo-fisiológicos por inducción de sustancias hormonales, entre otros.

*Comercio de alimentos: Satisfacer la demanda global de proteínas comestibles, especialmente de origen animal, implica mejorar la producción y la eficiencia en los sistemas productivos agroganaderos. El uso de plaguicidas en los cultivos, la utilización de fármacos veterinarios y drogas que permitan mejorar la conversión alimenticia y la producción de carne y leche, son herramientas que hoy disponen los productores y que seguramente no abandonarían, pues suponen beneficios productivos y económicos conexos. Sin embargo, la venta local de alimentos y la exportación, suponen la ausencia de residuos en los alimentos. Es importante destacar que las exigencias a este respecto son cada vez mayores y determinantes para acceder a los mercados internacionales de alimentos.

*Procesos tecnológicos de elaboración: se han desarrollado investigaciones orientadas a determinar la influencia de los residuos químicos en los procesos de producción de alimentos. La industria láctea es la principal afectada por residuos de medicamentos, especialmente antimicrobianos, por cuanto además de alterar la calidad de subproductos como quesos, manteca o yogures, imponen restricciones legales que penalizan la presencia de residuos en la leche.

La depleción completa de un fármaco en el organismo es difícil de establecer. Por ello, con el propósito de aminorar el impacto de los residuos y brindar seguridad al consumidor de alimentos, se estipula para cada fármaco y especie animal tratada, un periodo de retirada ó de resguardo (Lee & Ryu, 2000; Riviere & Sundlof, 2003; Rao & Malik, 2006).

Está demostrado que los niveles de residuos tienen directa relación con las etapas que influyen en la disposición de los fármacos (Koritz, 1988), de modo que el periodo de retirada se establece en función de parámetros cinéticos obtenidos propios para cada especie animal y de los tejidos, leche o huevos que se destinarán a consumo (Arboix & Martín-Jiménez, 2002; Riviere & Sundlof, 2003).

Los residuos pueden ser perjudiciales para la salud como se mencionó, en casos de toxicidad lleva el problema al terreno de la discusión, ya que en algunos casos es difícil probarlo por las bajas concentraciones residuales de estas drogas, en otros . El caso típico en los antibióticos es la alergia inducida por betalactámicos, problema conocido que afecta a población sensibilizada. En general las bajas concentraciones de estos antibióticos no alcanzan para sensibilizar pacientes, pero sí para desencadenar reacciones que por lo general no son graves y siempre con un fuerte componente individual en las mismas, representado por el terreno inmunológico del paciente (Errecalde, 2004).

Las fluoroquinolonas, se consideran seguras aun con reportes de casos de problemas hepáticos, reacciones alérgicas y renales. Según Budiati (2010) estas complicaciones son atribuibles a agentes en particular, sin que por ello deban generalizarse a todas las fluoroquinolonas y posiblemente donde deba ponerse mayor énfasis en los recaudos es en niños y embarazadas.

Se considera de mayor riesgo el desarrollo de resistencia en las bacterias de los animales, que pueden dar lugar a fallos terapéuticos en tratamientos veterinarios, con el consiguiente riesgo de transferencia de bacterias resistentes de los animales al hombre, o de genes portadores de información que codifican resistencia de bacterias de animales a bacterias humanas (Errecalde, 2004).

El incremento de la demanda de fluoroquinolonas y en algunos casos su uso desmedido, ha originado un aumento de casos de resistencia de *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* y *E. coli* sobre todo en aves de corral, que ha llevado en el caso de la Unión Europea a establecer sucesivas reglamentaciones sobre el empleo de fluoroquinolonas de uso veterinario.

La implementación de Buenas Prácticas de Manejo (BPM) en la producción agrícola, la utilización racional de medicamentos y el respeto de los tiempos de espera o retiro, se consigue reducir la presencia de sustancias hasta niveles aceptables en el organismo animal antes del ordeño o sacrificio, contribuyendo a disminuir los potenciales riesgos postratamiento.

Son pertinentes entonces, los estudios para establecer finalmente parámetros que garanticen la producción y el consumo de alimentos que respeten: los tiempos de espera o retiro (TR), Límite Máximo de Residuos (LMR) y sean seguros según los estudios de Ingesta Diaria Admisible (IDA). Tales parámetros pueden definirse como:

TR: Tiempo que debe transcurrir entre la última aplicación del medicamento, hasta que los residuos del mismo, se encuentren en proporción inferior al límite máximo admitido legalmente (LMR), para el aprovechamiento de los productos y/o subproductos obtenidos del animal tratado.

LMR: Según el Manual de Procedimientos de la Comisión del Codex Alimentarius, se define como “la concentración máxima de residuos resultante del uso de un medicamento veterinario, expresada en mg/kg ó en mg/L del peso del producto fresco, que se recomienda como legalmente permisible o reconoce como aceptables dentro de un alimento o en la superficie del mismo”. Se establece mediante estudios de toxicidad crónica en animales de laboratorio, que contemplan la dosis más elevada de una sustancia que no ha mostrado en las pruebas tener efectos perjudiciales para la salud

en personas o animales, conocido también como NOEL ó nivel sin efecto observable (Lee & Ryu, 2000; Miller & Flynn, 2002; Palermo Neto, 2006).

IDA: Es la máxima cantidad del medicamento que la especie experimental puede recibir sin ningún tipo de manifestación toxicológica. Para extrapolarla al humano se aplica un factor de seguridad de 100 a 1.000 veces para el NOEL -según la gravedad de los antecedentes toxicológicos disponibles- que avalen inocuidad al consumidor de alimentos (Arboix & Martín-Jiménez, 2002; Riviere & Sundlof, 2003; Palermo Neto, 2006).

Es importante considerar que para un determinado fármaco las exigencias regulatorias establecidas suelen diferir significativamente según el país, consecuencia de la gran diversidad de criterios en cuanto al uso de fármacos en los diferentes países. En algunos lugares los criterios son más permisivos en sus regulaciones que en otros, por lo tanto el problema de los residuos adquiere dimensiones diferentes según la modalidad productiva, los métodos analíticos utilizados y se agrava por la aplicación extra-rótulo en una especie animal no autorizada ó mediante el incremento de dosis y ritmo de aplicación (Mitchell et al., 1998; Miller & Flynn, 2002).

12. Aspectos regulatorios, organismos de control nacionales e internacionales

El SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), es el organismo sanitario rector de la República Argentina que fiscaliza y certifica los productos y subproductos de origen animal y vegetal, sus insumos y residuos agroquímicos, así como la prevención, erradicación y control de enfermedades animales, incluyendo las transmisibles al hombre, y de las plagas vegetales que afectan a la producción agropecuaria del país. Para implementar y promover estas acciones, elabora normas y controla su cumplimiento, asegurando la aplicación del Código Alimentario Argentino, dentro de las normas internacionales exigidas.

Asimismo, planifica, organiza y ejecuta programas y planes específicos que reglamentan la producción, orientándola hacia la obtención de alimentos inocuos para el consumo humano y animal.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Lleva a cabo un control de residuos a través del Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos (CREHA), presentado en el Foro Mundial FAO/OMS de Autoridades Sobre Inocuidad de los Alimentos en Marruecos en el año 2002. A partir de 2011 se promulgó la Resolución 559/2011 en los Anexos I y II, donde se autorizan los LMR para medicamentos veterinarios.

A nivel internacional son dos los referentes, la FDA (*Federal Drug Administration*) y la EMEA (*European Medicines Evaluation Agency*). La FDA, en Estados Unidos, está encargada de regular una amplia serie de ítems, entre los que se cuentan alimentos, medicamentos de uso humano, aditivos alimenticios y alimentos, medicamentos y dispositivos para animales domésticos, animales de granja y otros animales. La EMEA por su parte, emite resoluciones que se originan de la interacción de tres organismos oficiales. Regula la aprobación de medicamentos y los problemas de residuos en alimentos de origen animal en los diferentes mercados (Figura 4).

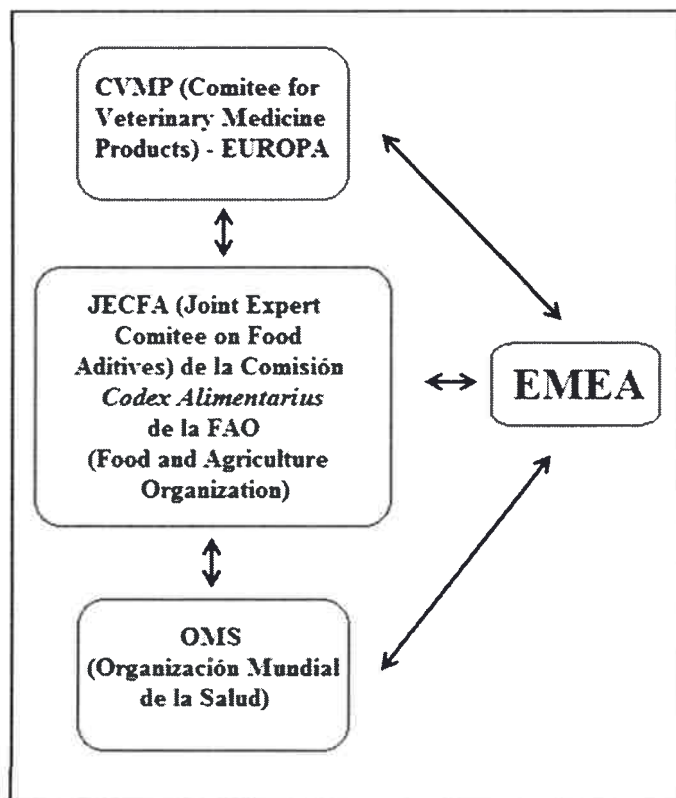


Figura 4. EMEA y organismos de interacción

13. Objetivos

13.1. General

- Describir la disposición plasmática y establecer el periodo de resguardo de enrofloxacin, su metabolito ciprofloxacina y danofloxacina, en leche de cabra.

13.2. Específicos

- Optimizar una técnica analítica para la detección de residuos de enrofloxacin, ciprofloxacina y danofloxacina en leche de cabra.
- Establecer parámetros descriptivos de la disposición de enrofloxacin, ciprofloxacina y danofloxacina, en plasma y leche de cabra.
- Determinar el periodo de resguardo para el consumo y/o destino a industria procesadora de leche de cabra tratada con enrofloxacin y danofloxacina.
- Establecer y comparar la disposición plasmática y láctea de enrofloxacin y danofloxacina luego de la aplicación subcutánea en cabras
- Obtener y aportar conocimientos básicos para transferir a profesionales, productores e industria, en pos de un manejo racional de estos recursos.

14. Materiales y Métodos

Lugar de realización y material biológico

El trabajo se realizó en las instalaciones de la Granja Siquem, ubicada aproximadamente 15 Km. al este de la ciudad de Río Cuarto, dentro de las coordenadas geográficas 33° 07' 21'' Latitud Sur y 64° 13' 28'' Longitud Oeste.

Se utilizaron cabras de raza criolla provenientes de un rebaño de 50 animales, en período de lactación de 60 días post parto para estandarizar los niveles de producción.

Los animales fueron evaluados clínicamente al comienzo de la experiencia, encontrándose los mismos clínicamente sanos, libres de enfermedades infecciosas y desparasitados de acuerdo a los registros del establecimiento.

Todas las cabras se encontraban sujetas a idénticas condiciones de alimentación, consistente en pastura natural desde la mañana hasta el encierro en horas de la tarde, momento en que se las suplementaba con heno de alfalfa y maíz molido.

Al inicio de la experiencia ninguno de los animales registraba antecedentes recientes de tratamientos con antibacteriano alguno. Durante el transcurso de la experiencia los animales permanecieron en el corral de encierro, contaron con alimento, agua ad-libitum y la sujeción mínima indispensable para facilitar la extracción de las muestras de sangre y leche, sin que los mismos manifestaran signos evidentes de estrés.

Se conformaron al azar 2 lotes de cabras: A (n=6), con un peso promedio de $42,5 \pm 4,78$ kg y B (n=6), con un peso promedio de $38 \pm 5,09$ kg.

Al lote A, se le inyectó una dosis única de 7,5 mg/kg de EFX (Baytril Max®) por vía subcutánea, por detrás de la escápula del lado izquierdo de cada animal, de la misma manera se procedió con el lote B, inyectando 6 mg/kg de DFX (Advocin 180®).

Previo a la administración de EFX y DFX, se tomó de cada animal una muestra de sangre control, para confirmar ausencia de tratamiento con antimicrobianos.

Posterior a la administración de EFX y DFX, se extrajeron de cada animal muestras de 4 ml de sangre de la vena yugular izquierda a los siguientes intervalos de tiempo 10, 20, 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Las muestras

se depositaron en tubos heparinizados estériles y fueron centrifugados a 1200 G por 5 minutos para separar el plasma.

El volumen de plasma obtenido se dividió en dos partes y se colocó en tubos Eppendorf, una se procesó y otra se dejó como reserva de resguardo. Cada una fue rotulada con el correspondiente tiempo de extracción y número de animal muestreado y sin aditivos. El material se conservó a -70°C hasta el momento de procesarlos por HPLC (Cromatografía de alta presión líquida) para la determinación de los parámetros cinéticos de disposición plasmática de ambas drogas.

Se procedió de forma similar con la leche, con la toma de una muestra control previa a la aplicación de los antimicrobianos y con posterioridad a los 15, 30, 45 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

Las muestras de leche se acondicionaron en tubos Eppendorf estériles sin aditivos, siguiendo el mismo procedimiento empleado para las muestras de sangre.

Material farmacológico y reactivos

- *Enrofloxacina (EFX), solución inyectable al 10%. (Baytril Max®, Laboratorio Bayer)
- *Danofloxacina (DFX), solución inyectable al 18% (Advocin 180®, Laboratorio Pfizer)
- *Enrofloxacina droga pura (100%) (Laboratorio Chile)
- *Danofloxacina droga pura (100%)
- *Ciprofloxacina base (CFX) 96% de pureza (Laboratorio Tritón)
- *Balofloxacina (BFX) droga pura (100%) (Laboratorio Chugai Pharmaceuticals, Japón).
- *Difloxacina (DIFLX) droga pura (100%) (Laboratorio Bedson)
- *Heparina, solución 5000 UI (Laboratorio Northia)
- *Ácido tricloroacético, cristales 99% de pureza (Laboratorio Biopack)
- *Acetonitrilo calidad HPLC (Laboratorio Baker)
- *Metanol calidad HPLC (Laboratorio Baker)

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacina en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

*Trietilamina calidad HPLC (Laboratorio Sintorgan)

* Acido Ortofosfórico (Laboratorio Sintorgan)

* Agua deionizada (Laboratorio Biopack)

Soluciones stock

Se prepararon soluciones stock de danofloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacina, marbofloxacina y difloxacina a partir de las cuales y mediante diluciones en agua deionizada, se prepararon las soluciones empleadas como estándar interno.

*Soluciones de Danofloxacin, enrofloxacin, balofloxacin y difloxacina (500 µg/ml, cada una). Se pesaron 50 mg de cada una de las drogas puras, que se disolvieron con 3 ml de HCL 0,1 N, adicionando luego agua deionizada y aforándolas en matraces a 100 ml.

*Ciprofloxacina (500 µg/ml). Se pesaron 52.8 mg de ciprofloxacina equivalente a 50 mg de droga pura, que se disolvieron con 3 ml de HCL 0,1 N, adicionando luego agua deionizada y aforándola en un matraz a 100 ml.

Todas las soluciones se sonicaron por 10 minutos para asegurar la completa disolución, conservándolas resguardadas de la luz y a una temperatura de 4°C.

Solución para el tratamiento de la muestras de leche

Solución de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Se pesaron 20.2 gramos de TCA, adicionando luego agua deionizada y aforándola en un matraz a 100 ml, sonicando durante 10 minutos para asegurar la completa disolución.

Soluciones para las curvas de calibración

Se tomaron muestras de leche y sangre de distintos animales del rebaño, libres de tratamiento con antimicrobianos, para constituir un pool de reserva para las curvas de calibración.

Para cada uno de los fármacos (DFX, EFX y CFX) a estudiar se elaboraron soluciones para los estándares de calibración y recuperabilidad, con las siguientes

concentraciones: 0,001218, 0,002437, 0,004875, 0,00975, 0,0195, 0,039, 0,078, 0,156, 0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ en agua deionizada.

Fase móvil

Para la preparación de la misma se empleó una mezcla de agua deionizada, acetonitrilo y trietilamina, en una proporción (79:19:1 v/v) respectivamente, ajustada a pH 3 con ácido ortofosfórico y filtrada con filtro de nylon de 0,22 μ mediante bomba de vacío.

Equipos y Material de Laboratorio

Para separación y cuantificación

La separación y cuantificación se llevó a cabo con un equipo de cromatografía líquida de alta presión Hewlett-Packard, serie 1050, inyector manual Rheodyne, dotado de bomba cuaternaria y desgasificador de fase móvil en línea y columna octadecilsilano C-18, 5 μm , de 25 cm marca Agilent, precolumna Phenomenex.

Medición de pH

Todas las calibraciones se realizaron con un pHmetro Orión 410A. Las mediciones se llevaron a cabo previa calibración con las respectivas soluciones buffer patrón pH 4.0 y pH 7.0.

Balanza

Ohaus Explorer, sensibilidad 0,0001g.

Sonicador

Ultrasonic Cleaner PS-10A

Centrífuga refrigerada

Presvac EPF-12R, régimen 14.000 rpm.

Software

Para el procesamiento de datos se empleó el programa farmacocinético PK Solution 2.0 Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis (Farrier, 1999).

Otros materiales de laboratorio

Heladera y freezer para la mantención de muestras, micropipetas Nichipet de 200 y 1000 μL de capacidad, pipetas de vidrio, matraces aforados, erlenmeyers, probetas graduadas, filtros de nylon 22 μ , tubos Eppendorf, jeringa Hamilton de 100 μL , para la inyección de la muestras, bomba de vacío con equipo de filtrado, jeringas y agujas.

Determinación de concentraciones plasmáticas y lácteas de EFX, su metabolito CFX y procesamiento de las muestras de plasma a diferentes tiempos

Para el análisis cromatográfico, cada muestra de plasma fue procesada utilizando el método propuesto por Bottcher et al. (2001).

Muestras de los animales tratados con EFX

Se incorporaron en un tubo Eppendorf 200 μL de plasma problema, 200 μL de agua deionizada, 20 μL de una solución de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BFX como standard interno y 800 μL de metanol; el conjunto fue sometido a 30 segundos de vortex, permaneciendo en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 14.000 rpm a 4°C durante 20 minutos, el sobrenadante obtenido se transvasó a un nuevo tubo Eppendorf, obteniéndose así la muestra para inyectar en el cromatógrafo.

Muestras de los animales tratados con DFX

Se incorporaron en un tubo Eppendorf 200 μL de plasma problema, 200 μL de agua deionizada, 40 μL de una solución de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DIFLX como standard interno y 800 μL de metanol; aplicando luego el mismo procedimiento que en las muestras de EFX.

Procesamiento de las muestras de leche a diferentes tiempos

Muestras de los animales tratados con EFX

El procesamiento inicial de estas muestras fue el siguiente: 200 μL de leche, 200 μL de agua de ionizada, 20 μL de una solución de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BFX como standard interno y 800 μL de metanol.

El conjunto fue sometido a 30 segundos de vortex, y luego centrifugado a 14000 rpm a 4°C durante 20 minutos, el sobrenadante obtenido se transvasó a un nuevo tubo Eppendorf, obteniéndose así la muestra para inyectar en el cromatógrafo.

Con este tratamiento de las muestras se originó un inconveniente con ciprofloxacina, cuya señal no era posible visualizar en el cromatograma al ser interferida con algún componente de la matriz. Luego de distintas consultas se replanteó el procesamiento, que consistió en tratar en primera instancia a la muestra de leche con ácido tricloroacético al 20%, 1:1 V/V (Yúfera, 2007), aplicación de 30 segundos de vortex y posterior centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos.

Al sobrenadante obtenido, se lo procesó tal como se describe al inicio, siendo posible obtener picos de áreas de CFX tras la elusión y poder cuantificar este antimicrobiano.

Muestras de los animales tratados con DFX

Las muestras de leche a diferentes tiempos, se procesaron de la siguiente manera: 200 μL de leche, 200 μL de agua de ionizada, 40 μL de una solución de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DIFLX como standard interno y 800 μL de metanol; aplicando luego el mismo procedimiento que en las muestras de EFX.

Procedimiento de separación y cuantificación

Se llevó a cabo a temperatura ambiente, mediante elusión isocrática en fase reversa con un flujo de 0,8 ml/minuto, empleando una columna octadecilsilano C-18, 5 μm , de 25 cm marca Agilent, precolumna Phenomenex.

La lectura del detector de fluorescencia se ajustó a 490 nm de emisión y 295 nm de excitación, según lo propuesto por Böttcher et al, (2001).

Cálculo de las concentraciones plasmáticas y lácteas para EFX, CFX y DFX

Procedimiento para cada una de las muestras

Con el cromatograma obtenido en la corrida de la muestra del ensayo cinético y con el patrón de concentración conocida, se obtuvo un cociente tomando el valor del área de pico de la droga evaluada y el estándar interno correspondiente. A partir de este cociente se determinaron las concentraciones plasmáticas y lácteas de EFX, CFX y DFX por regresión lineal simple, según Nouws y Ziv (1976), mediante la fórmula:

$$y = a + b \cdot x$$

dónde: y = índice de área, a = intercepto, b = pendiente y x = concentración, en cuya fórmula transformada:

$$x = \frac{y - a}{b}$$

se reemplazó y por los valores promedio correspondientes de los índices de área de las muestras, a y b por los valores indicados, para obtener los valores de concentración (x).

Análisis farmacocinético

Con los valores de cada muestra por tiempo, se obtuvo un valor promedio para el cálculo de la concentración final de la curva en plasma o leche de EFX, CFX y DFX, según corresponda en función del tiempo.

El programa cinético PK Solution 2.0, se empleó para el análisis farmacocinético individual en plasma y leche, a partir de los promedios de concentraciones de EFX, CFX y DFX para cada tiempo, dosis y peso de cada animal utilizado en el trabajo. Se calcularon para cada droga los parámetros farmacocinéticos robustos indispensables para valorar la disposición plasmática y láctea tales como: vida media ($t_{1/2\beta}$), concentración a tiempo cero (C_0), volumen de distribución ($V_{d_{ss}}$), clearance (Cl), área bajo la curva (ABC), concentración máxima ($C_{máx}$), tiempo para alcanzar concentración máxima ($T_{máx}$) y tiempo de residencia media (TMR).

Cálculo del período de retiro en leche

Se calculó mediante el software WTM1.4 (Hekman & Hoogland, 2000), utilizado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), se tomó como base el promedio de las concentraciones de EFX, CFX y DFX hasta las 120 horas, aplicando el Método

“Tiempo hasta concentración segura” (TTSC), recomendado por las normativas EMEA/CVMP/473/98-FINAL.

Los valores de referencia considerados para establecer los Límites Máximos de Residuos (LMR), fueron los establecidos por la Resolución 559/2011 (Anexo I) del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Este establece para leche de caprinos 100 µg/kg para la suma de EFX y CFX y 30 µg/kg para DFX, valores semejantes a los considerados por las normativas de la EMEA para EFX/CFX (EMEA/MRL/820/02-FINAL) y DFX (EMEA/MRL/507/98-FINAL), respectivamente.

Validación del método analítico

Para la validación del método se efectuaron los ensayos de linealidad, recuperabilidad, límite de detección, límite de cuantificación y precisión (reproducibilidad) correspondientes.

Linealidad: Capacidad de un método analítico de producir resultados que sean directamente, o por medio de una transformación matemática definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra (Thompson et al, 2002; OAA, 2008). Para el ensayo se utilizaron muestras de leche adicionadas con distintas concentraciones de las drogas evaluadas. Determinando el grado de ajuste de los valores de índice de área y sus respectivos estándares de calibración a una línea recta mediante una regresión lineal entre variables, método que permite garantizar la confiabilidad de las curvas de calibración. Se aceptó un coeficiente de determinación (r^2) ≥ 0.99 (Thompson et al, 2002; OAA, 2008).

Recuperabilidad (Rec): Permite establecer la bondad del método extractivo, determinándose la variación experimentada por la concentración del analito en estudio, cuando la muestra que lo contiene se somete a extracción. Se eluyeron tres estándares de calibración y tres de recuperabilidad de cada fluoroquinolona y se calculó el porcentaje de recuperabilidad (%Rec) para cada concentración aplicando la fórmula:

$$\%Rec = (\text{índice área calibración} / \text{índice área recuperabilidad}) \times 100$$

Precisión: se puede definir como el grado de coincidencia entre los resultados de pruebas independientes obtenidas de material de prueba homogéneo bajo condiciones estipuladas de uso. En este ítem se consideran: la reproducibilidad que es la variabilidad analítica entre diferentes laboratorios y la repetibilidad o variabilidad de análisis repetidos dentro de un mismo laboratorio, que consisten en procedimientos para evaluar la variabilidad de los ensayos intradía e interdía (PROSAIA, 2011b).

Por lo general no se considera necesario determinar la reproducibilidad (precisión entre laboratorios) para poder realizar un estudio de eliminación de residuo, ya que el laboratorio que desarrolla el método es el mismo que lleva a cabo el ensayo con las muestras del estudio de residuos (PROSAIA, 2011b).

Se considera adecuado, determinar la repetibilidad intradía e interdía como parte del procedimiento de validación, las que deben realizarse mediante la evaluación de un mínimo de tres repeticiones en tres concentraciones diferentes que representen el rango de validación objetivo al menos en tres días de análisis (PROSAIA, 2011b).

El ensayo intradía, consistió en la elusión por sextuplicado de los estándares de calibración, considerándolo aceptable cuando el coeficiente de variación (CV) entre elusiones, respecto a tiempos de retención, altura y área de los picos en los cromatogramas fue $\leq 2\%$.

El ensayo interdía, se llevó a cabo eluyendo los estándares de calibración en ensayos efectuados en seis días diferentes, se consideró aceptable si el CV fue $\leq 3\%$, aun cuando pueden llegar a aceptarse variaciones hasta del 15-20% (FDA, 1998).

Límite de detección (LD): Se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Puede decirse que es la concentración que proporciona una señal instrumental significativamente diferente de la señal de una muestra en blanco; concretamente la cantidad de analito que proporciona una señal igual a la del blanco más 3,3 veces la desviación estándar del blanco. Para la determinación del LD se empleó la fórmula sugerida por la EMEA (2006), que contempla la superficie del área en el cromatograma originada por la elusión de las concentraciones más pequeñas de las

drogas en estudio, mediante las que se estableció una curva de calibración y la pendiente de la curva de calibración, según la fórmula:

$$LD = (\sigma \times 3.3) / S$$

donde σ es la desviación estándar de la respuesta, 3.3 la constante que indica el margen de seguridad y S es el valor de la pendiente en la curva de calibración.

Límite de cuantificación (LC): Es considerado como el límite de concentración más bajo para mediciones cuantitativamente precisas. Se define como la cantidad de analito que proporciona una señal igual a la del blanco más diez veces la desviación estándar del blanco. Para determinarlo se aplicó la misma fórmula y valores que para LD, sólo que la desviación estándar de la respuesta multiplica por 10:

$$LD = (\sigma \times 10) / S$$

15. Resultados

Validación de la técnica cromatográfica

En las Tablas 2, 3 y 4 se detallan los valores obtenidos en los ensayos de linealidad, recuperabilidad y precisión con EFX, CFX y DFX en leche. La Tabla 5 indica los valores de límite de detección y límite de cuantificación.

Tabla 2. Ensayo de linealidad de los antimicrobianos analizados

Fármaco	Rango de concentración (µg/ml)	a	b	r ²
EFX	0,00975 / 4	0,002249	0,3898	0,997
CFX	0,0156 / 1	0,004152	0,1415	0,999
DFX	0,00975 / 5	0,03806	0,4738	0,995

a: intercepto, b: pendiente de la regresión, r²: coeficiente de determinación

Tabla 3. Ensayo recuperabilidad de los antimicrobianos analizados

Fármaco	Concentraciones ensayadas (µg/ml)	% Recuperabilidad
EFX	0,312/0,5/2,5	95,81 ± 2,28
CFX	0,09/0,625/1,25	98,2 ± 1,7
DFX	0,078/2,5/10	89,96 ± 7,4

Tabla 4. Ensayo de precisión de los antimicrobianos analizados

Fármaco	Concentraciones ensayadas (µg/ml)	Intradía (*)	Interdía (*)
EFX	0,5/2,5/5	1,412 ± 0,608	2,35 ± 3,33
CFX	0,039/1,25/2,5	1,027 ± 0,401	2,17 ± 1,68
DFX	0,078/0,31/2,5/10	1,47 ± 1,53	1,5 ± 1,49

(*) % CV: porcentaje de coeficiente de variación

Tabla 5. Ensayos limite detección y límite de cuantificación

Fármaco	LD ($\mu\text{g/ml}$)	LQ ($\mu\text{g/ml}$)
EFX	0,00143	0,0043
CFX	0,001071	0,003214
DFX	0,0016	0,0048

LD: limite detección y LQ: límite de cuantificación

Farmacocinética plasmática de EFX y CFX

En la Tabla 6, se indican las concentraciones promedio (\pm D.E.) y la figura 5 muestra las curvas de disposición para EFX y CFX en función del tiempo.

Tabla 6. Concentraciones plasmáticas medias (\pm D.E.) de EFX y CFX en función del tiempo

Tiempo (h)	EFX($\mu\text{g/ml}$)	CFX ($\mu\text{g/ml}$)
0,16	0,234 \pm 0,150	0,029 \pm 0,001
0,33	0,541 \pm 0,210	0,031 \pm 0,001
0,5	0,690 \pm 0,197	0,032 \pm 0,002
0,75	0,896 \pm 0,218	0,034 \pm 0,011
1	1,157 \pm 0,303	0,037 \pm 0,012
2	1,828 \pm 0,694	0,055 \pm 0,014
3	2,410 \pm 1,254	0,068 \pm 0,014
4	2,691 \pm 1,517	0,071 \pm 0,014
6	2,668 \pm 1,743	0,078 \pm 0,027
8	2,097 \pm 1,505	0,213 \pm 0,330
12	1,122 \pm 1,193	0,063 \pm 0,035
24	0,232 \pm 0,280	0,033 \pm 0,025
48	0,180 \pm 0,006	0,027 \pm 0,027

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

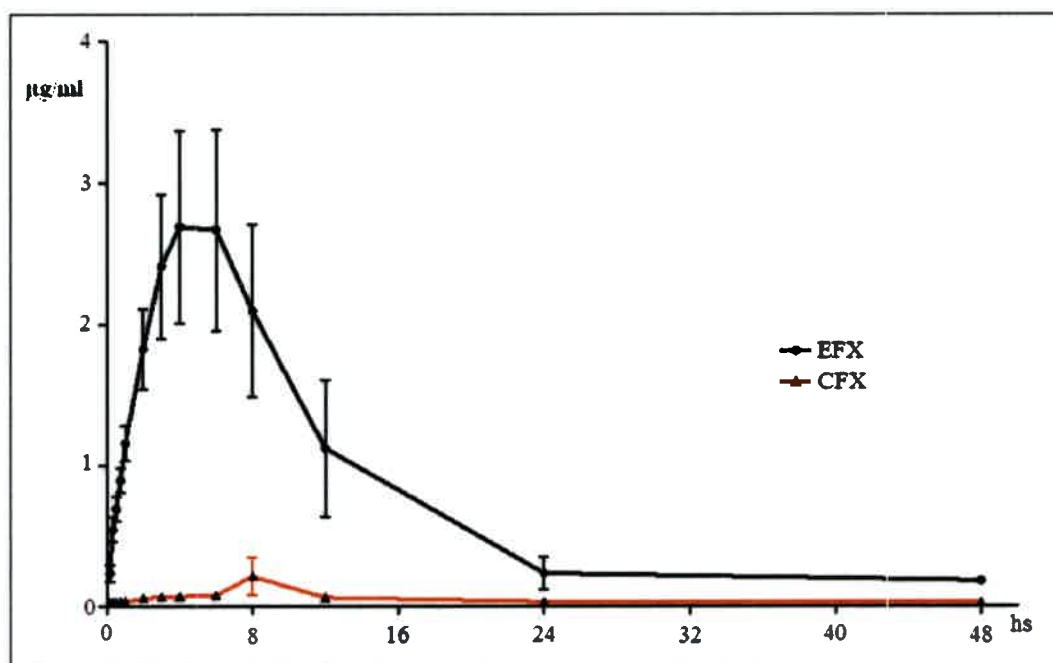


Figura 5. Curvas de disposición plasmática de EFX y CFX

En la Tabla 7, se indican los parámetros farmacocinéticos robustos, obtenidos luego del análisis de las concentraciones plasmáticas de EFX y CFX en el tiempo, mediante el software PK Solution.

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos promedio (\pm D.E.) correspondientes a EFX y CFX

Parámetro	EFX	CFX
$t_{1/2 \text{ ab}}$ (h)	1,405 \pm 0,353	2,503 \pm 1,549
$t_{1/2 \alpha}$ (h)	1,433 \pm 0,328	2,538 \pm 1,792
$t_{1/2 \beta}$ (h)	4,698 \pm 1,167	2,962 \pm 4,651
$C_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g/ml}$)	2,883 \pm 1,644	0,233 \pm 0,327
$T_{\text{máx}}$ (h)	5,00 \pm 1,54	6,50 \pm 1,97
$ABC_{\text{área}}$ ($\mu\text{g-h/ml}$)	33,105 \pm 25,186	2,283 \pm 1,583
TMR (h)	8,55 \pm 1,66	16,37 \pm 6,691
$Vd_{\text{área}}$ (l/kg)	2,02 \pm 1,08	4,283 \pm 4,191
Cl (ml/min/kg)	5,236 \pm 2,666	4,918 \pm 2,437

Referencias: $t_{1/2 \text{ ab}}$: vida media de absorción; $t_{1/2 \alpha}$: vida media de distribución; $t_{1/2 \beta}$: vida media de eliminación; $C_{\text{máx}}$: concentración máxima alcanzada; $T_{\text{máx}}$: tiempo en

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacina en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

alcanzar la $C_{m\acute{a}x}$; $ABC_{\text{área}}$: área bajo la curva; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{\text{área}}$: volumen de distribución; Cl = clearance

El grado de conversión de EFX a CFX observado fue de $6,4 \pm 5,9\%$.

Farmacocinética láctea de EFX y CFX

Los datos de concentración promedio en función del tiempo y los parámetros farmacocinéticos robustos (\pm D.E.), para EFX y su metabolito CFX en la leche, se indican en las Tablas 8 y 9, respectivamente. En tanto en la Figura 6, la evolución de las concentraciones lácteas.

Tabla 8. Concentración promedio (\pm D.E.) para EFX y CFX en la leche, en función del tiempo

Tiempo (h)	EFX ($\mu\text{g/ml}$)	CFX ($\mu\text{g/ml}$)
0,25	$0,018 \pm 0,0006$	n/d*
0,5	$0,036 \pm 0,033$	n/d*
0,75	$0,042 \pm 0,018$	$0,024 \pm 0,002$
1	$0,072 \pm 0,037$	$0,029 \pm 0,005$
2	$0,110 \pm 0,067$	$0,062 \pm 0,042$
3	$0,295 \pm 0,260$	$0,095 \pm 0,075$
4	$0,433 \pm 0,352$	$0,203 \pm 0,175$
6	$0,428 \pm 0,189$	$0,256 \pm 0,248$
8	$0,360 \pm 0,143$	$0,139 \pm 0,105$
12	$0,199 \pm 0,054$	$0,106 \pm 0,075$
24	$0,084 \pm 0,066$	$0,048 \pm 0,022$
48	$0,044 \pm 0,055$	$0,033 \pm 0,006$
72	$0,016 \pm 0,006$	$0,023 \pm 0,002$

*n/d: no detectable

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos lácteos promedio (\pm D.E.) de EFX y CFX

Parámetro	EFX	CFX
$t_{1/2 \text{ ab}}$ (h)	$1,258 \pm 0,844$	--
$t_{1/2 \alpha}$ (h)	$1,172 \pm 0,964$	$1,446 \pm 0,653$
$t_{1/2 \beta}$ (h)	$9,112 \pm 5,304$	$12,44 \pm 5,677$
$C_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g/ml}$)	$0,50 \pm 0,29$	$0,267 \pm 0,242$
$T_{\text{máx}}$ (h)	$5,667 \pm 1,506$	$5,50 \pm 1,22$
$ABC_{\text{área}}$ ($\mu\text{g-h/ml}$)	$6,667 \pm 2,794$	$3,417 \pm 1,786$
TMR (h)	$15,76 \pm 8,331$	$20,23 \pm 9,001$

Referencias: $t_{1/2 \text{ ab}}$: vida media de absorción; $t_{1/2 \alpha}$: vida media de distribución; $t_{1/2 \beta}$: vida media de eliminación; $C_{\text{máx}}$: concentración máxima alcanzada; $T_{\text{máx}}$: tiempo en alcanzar la $C_{\text{máx}}$; $ABC_{\text{área}}$: área bajo la curva; TMR: tiempo medio de residencia; LMR: límite máximo de residuo

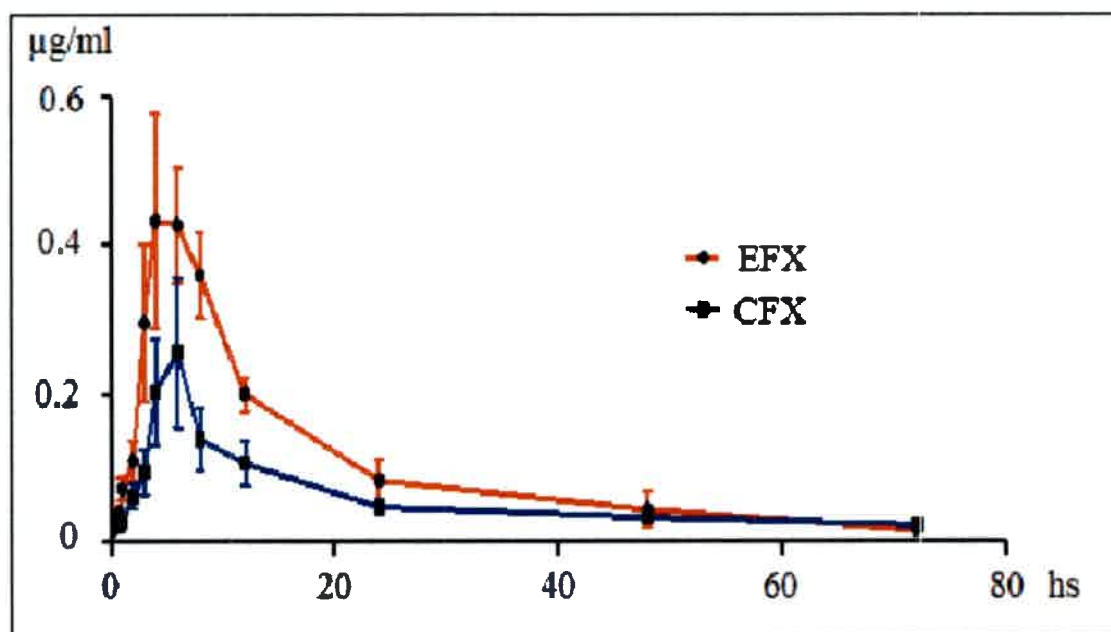


Figura 6. Evolución de las concentraciones lácteas de EFX y CFX en el tiempo

Se determinó un plazo de espera de 4,06 días (97, 58 horas), para respetar un LMR de $100\mu\text{g/ml}$ para la suma de EFX + CFX, acorde a las normativas de Resolución 559/2011, Anexo I de SENASA

Farmacocinética plasmática de DFX

Los resultados correspondientes a la evolución temporal de DFX por aplicación SC en plasma, se muestran en la Tabla 10 y en la Figura 7 y los parámetros cinéticos plasmáticos en la tabla 11.

Tabla 10. Concentraciones plasmáticas promedio (\pm D.E.) de DFX, administrada por vía SC

Tiempo (h)	DFX ($\mu\text{g/ml}$)
0,16	0,602 \pm 0,193
0,33	0,874 \pm 0,291
0,5	1,085 \pm 0,320
1	1,213 \pm 0,159
2	1,131 \pm 0,252
4	0,793 \pm 0,247
6	0,546 \pm 0,178
8	0,289 \pm 0,091
12	0,167 \pm 0,097
24	0,041 \pm 0,012

Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos promedio (\pm D.E.) de DFX

Parámetro	DFX ($X \pm DE$)
$t_{1/2 \text{ ab}}$ (h)	0,322 \pm 0,172
$t_{1/2 \alpha}$ (h)	2,087 \pm 0,726
$t_{1/2 \beta}$ (h)	9,177 \pm 8,129
$C_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g/ml}$)	1,333 \pm 0,225
$T_{\text{máx}}$ (h)	1,417 \pm 0,665
$ABC_{\text{área}}$ ($\mu\text{g-h/ml}$)	11,30 \pm 6,68
TMR (h)	10,68 \pm 9,93
$Vd_{\text{área}}$ (l/kg)	6,75 \pm 2,47
Cl (ml/min/kg)	10,78 \pm 4,23

Referencias: $t_{1/2 \text{ ab}}$: vida media de absorción; $t_{1/2 \alpha}$: vida media de distribución; $t_{1/2 \beta}$: vida media de eliminación; $C_{\text{máx}}$: concentración máxima alcanzada; $T_{\text{máx}}$: tiempo en alcanzar la $C_{\text{máx}}$; $ABC_{\text{área}}$: área bajo la curva; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{\text{área}}$: volumen de distribución; Cl= clearance

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

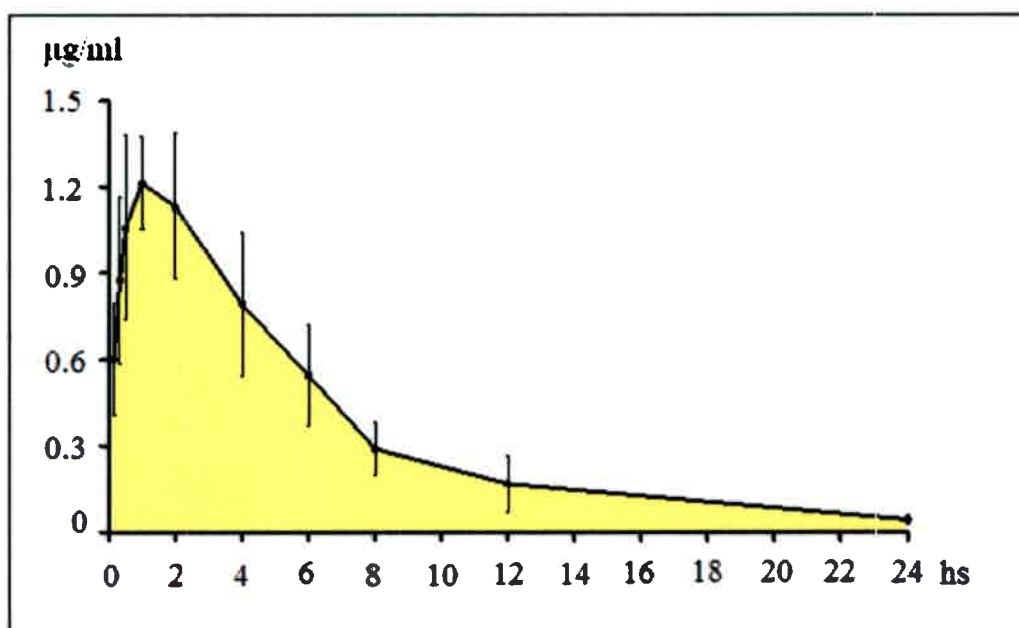


Figura 7. Curva de disposición plasmática de DFX en cabras

Farmacocinética láctea de DFX

La Tabla 12, indica la evolución de la concentración promedio de DFX en leche.

Tabla 12. Concentraciones promedio (\pm D.E.) de DFX en leche en función del tiempo.

Tiempo (h)	DFX ($\mu\text{g/ml}$)
0,25	3,080 \pm 2,612
0,5	6,967 \pm 5,043
0,75	9,033 \pm 5,476
1	12,014 \pm 6,672
2	16,537 \pm 8,981
4	15,625 \pm 8,950
6	8,395 \pm 5,741
8	5,430 \pm 3,596
12	1,334 \pm 0,761
24	0,206 \pm 0,038
48	0,142 \pm 0,006
72	0,129 \pm 0,007
96	0,120 \pm 0,013
120	0,108 \pm 0,006

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Los parámetros farmacocinéticos robustos promedio (\pm D.E.) y la relación plasma/leche para DFX se indican en la Tabla 13. En tanto, la Figura 8, muestra la evolución de las concentraciones lácteas.

Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos robustos promedio ($X \pm$ D.E.) y relación plasma/leche ($X \pm$ D.E.) para DFX

Parámetro	DFX
$t_{1/2 ab}$ (h)	$0,322 \pm 0,172$
$t_{1/2 \alpha}$ (h)	$2,087 \pm 0,726$
$t_{1/2 \beta}$ (h)	$9,177 \pm 8,129$
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/ml}$)	$12,53 \pm 9,83$
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	$2,50 \pm 1,22$
$ABC_{\acute{a}rea}$ ($\mu\text{g-h/ml}$)	$85,15 \pm 61,08$
ABC plasma/leche	$7,53 \pm 9,14$

Referencias: $t_{1/2 ab}$: vida media de absorción; $t_{1/2 \alpha}$: vida media de distribución; $t_{1/2 \beta}$: vida media de eliminación; $C_{m\acute{a}x}$: concentración máxima alcanzada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo en alcanzar la $C_{m\acute{a}x}$; $ABC_{\acute{a}rea}$: área bajo la curva

Se determinó un plazo de espera de 7,41 días (177, 88 horas), para respetar un LMR de $30\mu\text{g/ml}$ para DFX, acorde a las normativas de Resolución 559/2011, Anexo I de SENASA.

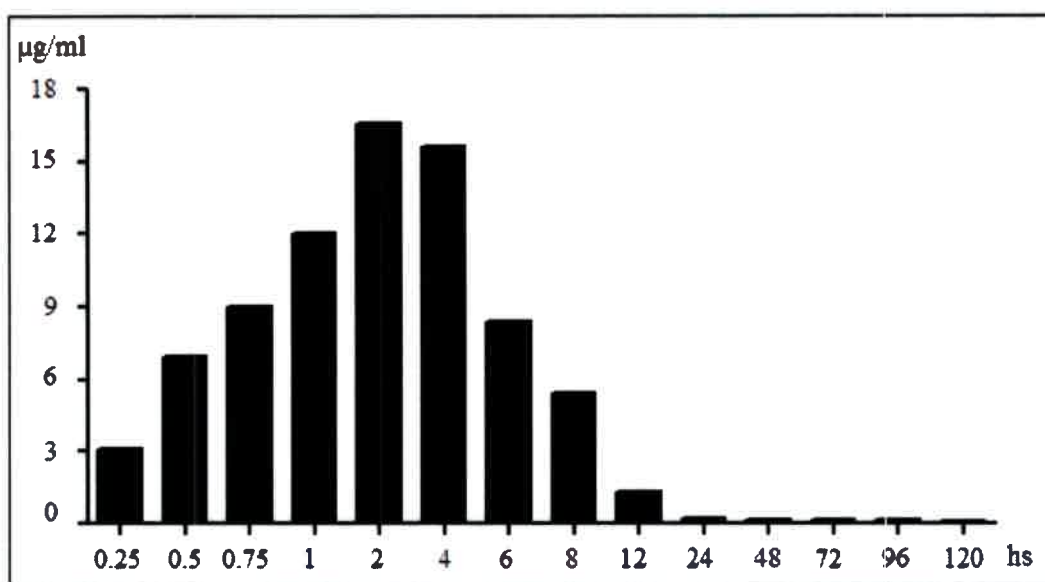


Figura 8. Evolución de las concentraciones lácteas de DFX

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacina en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

16. Discusión

La expansión en número de agentes y la gran variedad de usos que presentan las fluoroquinolonas, ha motivado el desarrollo de diversos métodos analíticos para permitir la cuantificación de las mismas en formulaciones farmacéuticas (control de calidad), en fluidos biológicos para estudios farmacocinéticos y en productos alimenticios de origen animal destinados al consumo humano, con el objetivo de garantizar la salud del consumidor.

En el presente estudio la separación de quinolonas se realizó por HPLC, empleando una columna C-18, coincidente con lo propuesto en la bibliografía internacional (Manceau et al, 1999; Stolker et al, 2005; Hassouan, 2007), donde se hace referencia al empleo de esta columna o en su defecto a la C-8.

El método empleado, adaptado de Böttcher et al, 2001, modificando la fase móvil original, compuesta de agua deionizada: metanol: trietilamina 75:25:4 v/v/v, reemplazándola por una relación agua deionizada, acetonitrilo y trietilamina en una proporción 79:20:1 v/v/v, ajustada a pH 3 (Posyniak et al, 1990; Carlucchi, 1998; Yorke & Froc, 2002; Ramos, 2003; Bailac et al, 2004; Verdón et al, 2005), con el detector de fluorescencia regulado para la lectura a 490 nm de emisión y 295 nm de excitación (Aerts et al, 1995; Hernández-Arteseros et al, 2002), fue lo suficientemente sensible para estudios cinéticos de disposición plasmática de EFX, CFX y DFX.

La regulación del pH a 3 y la inclusión de trietilamina en la composición de la fase móvil, contribuyó a evitar la competencia de las fluoroquinolonas con eventuales grupos silanol residuales en los empaques de fase reversa (Hassouan, 2007), reduciendo de esa forma colas cromatográficas e incrementando la agudeza de los picos.

También es importante destacar que el pH ácido mejora la intensidad de la fluorescencia de las fluoroquinolonas evaluadas, ya que la misma disminuye al incrementarse el pH del medio, según lo reportado por Amin et al, (1995) y Sortino et al, (1998).

Los resultados obtenidos corroboran la suficiencia del procedimiento de extracción del analito del plasma empleando metanol como solvente polar seguido de

extracción líquida y centrifugación, tal lo propuesto por otros investigadores (Posyniak et al, 1990; Marzo & Dal Bo, 1998 y Bailac et al, 2004).

El ensayo de linealidad, con altos coeficientes de correlación ($r^2 > 0,99$) avalan la confiabilidad de las curvas de calibración empleadas para los cálculos de concentración del analito en las muestras problema.

Considerando en este estudio farmacocinético, puntos de comparación entre HPLC y el método microbiológico, pueden jugar a favor de este último, que aún cuando es un método desarrollado en la década del 60, hoy se lo considera válido, sencillo, rápido y de bajo costo.

A favor del método de HPLC, se cuenta la mayor sensibilidad y particularmente en lo que respecta a la evaluación plasmática y láctea de EFX, permite discriminar entre esta y el metabolito CFX, lo que no ocurre con el método microbiológico, ya que el resultado del halo de inhibición mide la actividad global.

DFX, como ya se mencionó, si bien origina un metabolito con actividad antibacteriana, no justifica su consideración por el bajo nivel de concentración que alcanza en tejidos, carente de relevancia terapéutica (Hassouan, 2007).

Con respecto al análisis de quinolonas en muestras alimentarias complejas como la leche, requieren una etapa de extracción del analito de la matriz, seguida de una o varias etapas de limpieza o clean-up, en las que se intenta eliminar la máxima cantidad posible de sustancias de la matriz y preconcentrar los analitos, para finalmente llevar a cabo la determinación de los mismos mediante una técnica adecuada (Aerts et al, 1995; Hassouan, 2007).

Gran parte de los tratamientos que se describen en la literatura se basan en extracciones líquido-líquido y/o extracciones en fase sólida. Sin embargo los procedimientos de limpieza pueden variar ampliamente; reportándose extensos tratamientos que involucran varias etapas de extracción líquido-líquido o combinaciones de estas con extracciones en fase sólida, el uso de diálisis o la ultrafiltración, en tanto que autores como Belal et al, (1999) y Hernández-Arteseros et al, (2002), reportan incluso que pueden no ser necesarias. Con la técnica empleada para procesar la leche de los animales tratados con DFX, pudo detectarse a la misma sin inconveniente alguno.

Al momento de la determinación de EFX y CFX, empleando similar técnica que para DFX, se visualizaban correctamente los picos de EFX, no así los de CFX, por la interferencia de algún componente de la matriz no identificado, problema oportunamente descrito por Aerts et al, (1995), dada la compleja composición de la leche. El inconveniente pudo ser subsanado, tratando las muestras con ácido tricloroacético al 20 %, lo que permitió visualizar la señal de CFX.

El tratamiento implementado, se mostró eficaz comparándolo con otros más complejos como los propuestos por San Martín et al, (2001) y Cinquina et al, (2003), que constan de no menos de cinco procedimientos antes de obtener la muestra para el análisis cromatográfico. En cambio, guarda más relación con la técnica propuesta por Idowu & Peggins (2004), que emplea una combinación de ácido orto-fosfórico / acetonitrilo como único tratamiento.

Los altos coeficientes de correlación (r^2) que se obtuvieron en los ensayos de linealidad realizados para los tres antimicrobianos: 99,79 para EFX, 99,95 para CFX y 99,58 para DFX, otorgan confiabilidad a los cálculos de concentraciones de los analitos, con las curvas de calibración empleadas. Además, concuerdan con los propuestos por la FAO (2005), que indica que el coeficiente, preferentemente, debe ser mayor o igual 99,5 aunque puede situarse entre 98 y 99 según el método analítico empleado.

Los índices de recuperabilidad obtenidos, respecto del 100% teórico ideal fueron: $95,81 \pm 2,28\%$, $98,2 \pm 1,7$ y $89,96 \pm 7,4\%$ para EFX, CFX y DFX respectivamente, permitiendo establecer la bondad del método extractivo, que supera ampliamente el 50-60% que acepta la FDA (1998, 2001), siempre que los resultados sean precisos, lo que pudo determinarse en el presente estudio, de acuerdo a los resultados de repetibilidad y reproducibilidad.

Los ensayos de repetibilidad intradía fueron: $1,412 \pm 0,608 \%$, $1,027 \pm 0,401 \%$ y $1,47 \pm 1,53\%$ para EFX, CFX y DFX respectivamente, valores inferiores al 2% considerado límite. En tanto la reproducibilidad, eluyendo los estándares de calibración en ensayos efectuados en seis días diferentes, arrojó resultados que en ningún caso superaron un coeficiente de variación del 3%, en concordancia con lo propuesto por Vinagre (1997) y Eurachem (1998) y lejanos al 15-20% posible de aceptar según la FDA (1998) y Friedecký et al, 2004).

El análisis de la curva de disposición plasmática de enrofloxacin con el programa PK Solution 2.0, tras la aplicación subcutánea de 7,5 mg/kg de una solución al 10% en cabras lactantes, determina una absorción lenta, alcanzando picos plasmáticos, a las 5 y 6.5 horas para EFX y el metabolito CFX respectivamente. Estos tiempos son similares a los reportados en alpacas (Gandolf et al, 2005), novillos (Davis et al, 2007) y terneros (Errecalde et al, 2010), Por el contrario contrastan con otros mucho más breves obtenidos en cabras (Ramesh et al, 2002; Ambros et al, 2007) y bovinos (De Lucas et al, 2008) por la misma vía, y tras la aplicación intramuscular en cabras (Rao et al, 2001; Elsheikh et al, 2002; Javed et al, 2009), búfalos (Sharma et al, 2003; Javed et al, 2009) y ovinos (Elsheikh et al, 2002; Islam et al, 2008; Javed et al, 2009).

La $C_{m\acute{a}x}$ plasmática alcanza los $2,883\pm 1,644$ y $0,233\pm 0,327$ $\mu\text{g/ml}$, para EFX y CFX respectivamente, excediendo para EFX a las halladas en cabras (Rao et al, 2001; Elsheikh et al, 2002 y Al-Nazawi, 2011), ovinos (Elsheikh et al, 2002); búfalos (Sharma et al, 2003) y novillos (Davis et al, 2007). En tanto son semejantes para su metabolito, CFX, en terneros y cabras, aunque menores a las de novillos, según se desprende de los estudios de los mismos autores y de estudios en alpacas realizados por Gandolf et al, (2005).

Los elevados volúmenes de distribución (V_d): $2,02\pm 0,08$ L/kg (EFX) y $4,288\pm 4,191$ L/kg (CFX), en consonancia con vidas medias de distribución de $1,433\pm 0,328$ horas (EFX) y $2,538\pm 1,792$ horas (CFX), indican un pasaje rápido desde la sangre hacia los tejidos, acorde con las propiedades físico-químicas de enrofloxacin, por tratarse de un fármaco con características anfóteras, liposoluble y con reducida unión a s plasmáticas (Rao et al, 2000) y coincide a lo informado en animales domésticos en términos generales por Papich & Riviere (2009), aun cuando se reportan amplias variaciones inter e intra especie, según los estudios realizados.

Analizando por separado los valores de V_d del presente estudio, se refleja tal variabilidad, observándose para EFX cifras semejantes a las obtenidas en bovinos (Kartinen et al, 2007a), ovinos (Pozzin et al, 1997), caninos (Cester & Toutain, 1997), equinos (Birmingham et al, 2000; Kartinen et al, 1997b) y en aves (Garcia Ovando et al, 1999). En el mismo sentido, los valores de V_d obtenidos, son inferiores a los de

cerdos (Nielson & Gyrd-Hansen, 1997), perros (Kung et al, 1993) y pollos (Knoll et al, 1999). Y mayores a los de vacas (Varma et al, 2003), cerdos Anadon et al, 1999), cabras (Rao et al, 2000; Elmas et al, 2001) y ovinos (Otero et al, 2009).

En tanto para CFX, los valores presentan similitudes con los de cabras (Garcia Ovando et al, 1999; Anadon et al, 2001), perro (Abadia et al, 1994) y humanos (Lode et al, 1988). Son mayores a los de vacas (Nouws et al, 1988a), cerdos (Nouws et al, 1988a), ovinos (Muñoz et al, 1996) y pollos (Garcia Ovando et al, 1997) y menores a los reportados por Dudley et al, (1987a) en tres estudios en humanos.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se observa cierta disparidad de resultados para EFX y CFX por especie según diferentes autores. Esta amplia variabilidad, según De Lucas et al, (2008), puede tener explicación en la metodología empleada en las pruebas, en aspectos fisiológicos, edad y diferencias entre especies, entre otros.

El mayor volumen de distribución de CFX, respecto de EFX, puede atribuirse a su mayor liposolubilidad y baja unión a proteínas plasmáticas, de acuerdo a lo propuesto por Singh et al, (2001).

CFX experimenta mayor permanencia en el organismo respecto a EFX y mayor distribución tisular, acorde los antecedentes disponibles en otras especies (Gandolf et al, 2005; De Lucas et al, 2008; Errecalde et al, 2010).

La conversión de EFX a CFX es del $6,4 \pm 5,9$ %, inferior a la comunicada en caprinos (Rao et al, 2001; Otero et al, 2009; Fernández-Varón et al, 2009), en terneros con idéntica dosis y formulación (Errecalde et al, 2010) y en vacas lecheras y ovinos (Idowu, 2010). Esto indicaría menor capacidad de biotransformación en los animales utilizados, probablemente atribuible a una deficiencia dietaria de proteínas, capaz de modificar la actividad de las enzimas microsomaes hepáticas (Mgbodile & Campbell, 1972; Beasley & Poppenga, 1999), responsables del proceso de de-etilación, que convierte EFX a CFX.

Los trabajos referidos a DFX reportan resultados variables según la dosis y concentración del producto, el que originariamente se recomendaba a razón de 1,25-2,5 mg/kg con una concentración final del 2,5%.

La aplicación subcutánea DFX al 18% en cabras, se caracteriza por una rápida absorción y por alcanzar picos plasmáticos en breve tiempo, reflejados por el $t_{1/2ab}$ de 0,32 horas y un $T_{m\acute{a}x}$ de 1,41 horas, dichos resultados concuerdan con lo observado en todas las especies aun cuando se la emplee a diferentes dosis y vías, según se desprende de los trabajos realizados por Atef et al, (2001), Ismail (2006) y Escudero et al, (2007) en cabras y ovejas, Aliabadi & Lees (2003) en terneros, Mann & Frame (1992) en cerdos, Fernández-Varón et al, (2007) en equinos, Fernández-Varón et al, (2008) en conejos y Shem-Tov et al, (1998) y Mestorino et al, (2009) en vacas lecheras.

La $C_{m\acute{a}x}$ alcanzada (1,33 $\mu\text{g/ml}$), comparándola con los trabajos de Escudero et al, (2007) en cabras y ovejas y el de Mestorino et al, (2009) en vacas lecheras, en similares condiciones de vía, concentración y dosis, es ligeramente inferior a la observada en las cabras (1,48 $\mu\text{g/ml}$) y superior a las de ovejas y vacas de 1,05 y 0,53 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. También se observa una amplia diferencia con lo encontrado por Atef et al, (2001) e Ismail (2006) en cabras, empleando un producto de menor concentración y una dosis menor.

La vida media plasmática (9,17 horas), es mayor a la observada en estudios llevados a cabo por Fernández-Varón et al, (2007) en equinos, Atef et al, (2001), Ismail (2006), Escudero et al, (2007) en caprinos y ovinos, e inferior a lo reportado en vacas lecheras por Mestorino et al, (2009).

A semejanza de EFX y CFX, el elevado volumen de distribución (V_d) 6,75 L/kg y una vida media de distribución de 2,087 horas, permiten inferir un rápido pasaje de DFX desde la sangre hacia los tejidos, coherente con sus características anfóteras, elevada liposolubilidad y reducida unión a proteínas plasmáticas (Rao et al, 2000) y conforme a lo informado en animales domésticos en términos generales por Papich & Riviere (2009).

DFX, según lo expresan los valores de $t_{1/2b}$ y TMR obtenidos, exhibe moderada permanencia plasmática, a semejanza de lo que acontece en distintas especies domésticas, según los estudios de Mann & Frame (1992), Richez et al, (1996), Mc Kellar et al, (1998), Atef et al, (2001), Aliabadi & Lees (2003) y Otero et al, (2009), luego de la aplicación por distintas vías.

Con respecto a la cinética en leche para los antimicrobianos evaluados, se observa para EFX y CFX una disposición láctea muy rápida posterior a su aplicación, alcanzando las máximas concentraciones ($C_{m\acute{a}x}$), a tiempos semejantes a los del plasma.

La comparación ABC_{leche}/ABC_{plasma} de EFX arroja cocientes de $0,2\pm 0,1$; mientras CFX es más persistente y provee cocientes de $1,4\pm 1,1$ en ambos casos inferiores a los reportados en cabras por otros autores (Fernández-Varón et al, 2009).

Haritova et al, (2003), describen para EFX un panorama similar en ovinos, donde tras la administración endovenosa e intramuscular, se observan altos niveles de la misma en leche, con una $C_{m\acute{a}x}$ más elevada y que se alcanza a tiempos algo menores, datos coincidentes con los de Kaartinen et al, (1995) en bovinos, comparándolas con el presente estudio.

De acuerdo a Haritova et al, (2003), estas diferencias observadas en la disposición láctea respecto del plasma, pueden atribuirse, en parte, a las características físico-químicas de ambos compuestos, ya mencionadas (bajo porcentaje de unión a proteínas, liposolubilidad, etc.). Incluso la mayor capacidad de penetración a la glándula mamaria por parte de CFX, según sostiene Idowu (2010), se deben a una amplificación de tales características.

Sin embargo, en la actualidad es conocida la interacción de estos fármacos con sistemas transportadores, tal como ha sido descrito por Jonker et al, (2005), Merino et al, (2006), Pulido et al, (2006) y Kusuhara & Sugiyama (2007), en donde se demuestra una elevada expresión durante la lactancia en bovinos, ovinos, ratas y también en humanos, facilitando la excreción de drogas y xenobióticos, comportándose EFX y CFX como sustratos de los mismos. En este contexto y apoyándose en estos trabajos, Schrickx & Fink-Gremmels (2007), demostraron idéntica condición para DFX.

DFX exhibe gran disposición láctea, alcanzando su pico máximo a las 2,5 horas, sólo 1 hora después que en plasma y en concentraciones que exceden ampliamente a este, lo que se refleja en las relaciones $ABC_{leche/plasma}$: 7,53 y $C_{max\ leche/plasma}$: 9,42. Otras investigaciones, utilizando la droga a dosis, vía y concentración similares al presente, registraron en ovejas concentraciones 10 veces mayores a las plasmáticas a las 12 horas y 8 veces a las 24 horas y que se repitió en cabras con valores semejantes (Escudero et al., 2007). En tanto Mestorino et al, (2009), obtuvieron relaciones en vacas lecheras

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

$ABC_{\text{leche/plasma}}$: 1,59 y $C_{\text{máx leche/plasma}}$: 2,68, con una $C_{\text{máx}}$ en leche de 1,57 $\mu\text{g/ml}$, $T_{\text{máx}}$ a las 8,67 horas y establecieron un plazo de espera de 3,07 días.

Shemtov et al, (1998), luego de administrar DFX intramuscular, en dosis de 1,25 mg/kg, registraron una $C_{\text{máx}}$ de 0,71 $\mu\text{g/ml}$ a las 10 horas, obteniendo una relación $ABC_{\text{leche/plasma}}$: 3,52.

Además de este comportamiento en leche, DFX lo exhibe en otros tejidos según lo describen Soback et al, (1994), McKellar et al, (1999), Lindecrona et al, (2000), Atef et al, (2001), Aliabadi & Lees (2001), Sarasola et al, (2002) y Haritova et al, (2003), lo que destacaría la relevancia de los transportadores referidos por Fink-Gremmels (2007) y Real et al. (2011), en la cinética del fármaco, además de sus aspectos físico-químicos.

Si bien tradicionalmente las fluoroquinolonas evaluadas se consideraron agentes de una permanencia moderada en el organismo, estos nuevos estudios permiten verificar elevadas y persistentes concentraciones a nivel tisular, aspecto sumamente significativo considerando que su eficacia clínica es concentración-dependiente, lo que permite maximizar su potencial terapéutico y evitar resistencias.

En lo que respecta a la calidad de alimentos, la importancia de la presencia sustancias en los productos comestibles de origen animal estará en función de la velocidad y el grado de absorción del compuesto original, del metabolismo y la tasa de excreción tanto de la droga original como de sus metabolitos. Por lo tanto, el residuo total compondrá de la molécula original inalterada y metabolitos. Con los resultados obtenidos se ha podido conocer el comportamiento cinético diferencial de EFX, CFX y DFX, pudiendo establecer períodos de resguardo diferenciales para la especie, acordes a la legislación vigente en nuestro país.

17. Conclusiones

*La metodología analítica empleada para EFX, CFX y DFX en plasma y leche, es sencilla. Requiriendo de pocas etapas en su desarrollo y baja demanda de solventes.

*El objetivo de desarrollar una técnica de HPLC para detectar residuos de fluoroquinolonas en leche de cabra se logró satisfactoriamente.

*Los resultados obtenidos permiten sugerir que el método implementado para cuantificar EFX, CFX y DFX, llevado a cabo con una técnica simple y rápida, resulta una alternativa válida en estudios farmacocinéticos y/o el monitoreo de residuos en esta matriz biológica; debiendo no obstante considerarse su viabilidad para otras fluoroquinolonas.

*El período de retiro estimado para leche de 4,06 días y 7,41 días para EFX-CFX y DFX respectivamente, se considera compatible con las condiciones de explotación.

*El software PK Solution, es adecuado para interpretar las curvas de disposición plasmática y láctea de los antimicrobianos evaluados, ajustando con altos coeficientes de correlación para la aplicación subcutánea, a fin de estimar los parámetros cinéticos robustos de utilidad.

*Los resultados obtenidos, reafirman la necesidad de realizar estudios por especie y por droga, para asegurar la calidad de un alimento de origen animal, cuando los mismos son tratados con agentes farmacológicos.



18. Bibliografía

Abadia A.R.; Aramayona J.J.; Muñoz M.J.; Pla-Delfina J.M. & Bregante, M.A. (1995) Ciprofloxacin pharmacokinetics in dogs following oral administration. *Zentralblatt für Veterinärmedizin (A)* 42: 505–511.

Aerts M.; Hogemboom A. & Brinkman U. (1995) Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *J. Chromatogr. B* 667: 1-40.

Aliabadi F.; Landoni M. F. & Lees P. (2003) Pharmacokinetics (PK), Pharmacodynamics (PD), and PK-PD Integration of Danofloxacin in Sheep Biological Fluids Antimicrobial. *Agents and Chemotherapy* 47 (2): 2626–2635.

Al-Nazawi M. H. (2011) Kinetics of enrofloxacin in goat following intravenous and intramuscular administration.

<http://www.kfu.edu.sa/ar/Deans/Research/Documents/2030.pdf>

Ambros, L., Montoya, L., Kreil, V., Waxman Dova, S., Albarellos, G., Rebuelto, M., Hallu, R. y San Andrés Larrea, M.I. (2007) Farmacocinética de la enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacin en cabras. *Revista Argentina de Producción Animal* 27 (Supl. 1): 329-345.

Amín A. S.; El-Sayed G. O. & Issa Y. M. (1995) Utility of certain π -acceptors for the spectrophotometric determination of norfloxacin. *Analyst* 120: 1189-1993.

Anadón A. (1992) Les Fluoroquinolones: aspects pharmacologiques et toxicologiques. *Bull. Acad. Vet. France* 65 : 207-216.

Anadón A.; Martínez-Larrañaga M. R.; Díaz M. J., Bringas P.; Martínez M. A., Fernández-Cruz M. L.; Fernández M. C. & Fernández R. (1995) Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. *American Journal of Veterinary Research* 56 (4): 501-506.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Anadón A.; Martínez-Larrañaga M.R.; Díaz M.J.; Fernández-Cruz M.L.; Martínez M.A.; Frejo M.; Martínez M.; Iturbe J. & Tafur M. (1999) Pharmacokinetic variables and tissue residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in healthy pigs. *Am. J. Vet. Res.* 60 (11): 1377-1382.

Anderson V.E.; Gootz T.D. & Osheroff N. (1998) Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (28): 17879-17885.

Andersson M. & Mac Gowan A. (2003). Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (Suppl 1): 1-11.

Arboix M. & Martín-Jiménez T. (2002). Aspectos terapéuticos y de salud pública de los residuos farmacológicos. En *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* por Botana L.; Landoni F. & Martín-Jiménez T. Madrid, España, McGraw-Hill-Interamericana. Pp: 681-689.

Atef M.; El-Gendi A.; Aziza Y.; Amer M.M. & Abd El-Aty A.M. (2001) Some pharmacokinetic data for danofloxacin in healthy goats. *Vet. Res. Commun.* 25 (5): 367-377.

Bailac S.; Ballesteros O.; Jiménez-Lozano E.; Barron D.; Sanz-Nebot V.; Navalon A.; Vilchez J. & Barbosa J. (2004). Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. A* 1029: 145-151.

Ball P. (2000) Quinolone generations: Natural history or natural selection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 46 (Topic T1)

Ball P. (2003). Efficacy and safety of levofloxacin in the context of other contemporary fluoroquinolones: a review. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64: 646–661.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

- Barger A.; Fuhst C. & Wiedemann B. (2003). Pharmacological indices in antibiotic therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 893-898.
- Bauditz R. (1987) Results of clinical studies with Baytril™. *Poultry Vet. Med. Rev.* 2: 130-136.
- Beasley V. & Poppenga R.H. (1999) *Veterinary Toxicology*. Beasley V. (Ed.). Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.
- Belal F.; Al-Majed A.A. & Al-Obaid A.M. (1999) Methods of analysis of 4-quinolone antibacterials. *Talanta* 50: 765–786.
- Beltrán C. (2004). Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: utilidad práctica. *Rev. Chil. Infect.* 21 (Suppl. 1): 39-44.
- Bermingham E.; Papich M.G. & Vivrette S. L. (2000) Pharmacokinetics of enrofloxacin administered intravenously and orally to foals. *Am. J. Vet. Res.* 61(6): 706-709.
- Bertino J. & Fish D. (2000) The safety profile of the fluoroquinolones. *Clin. Ther.* 22 (7): 798-817.
- Boggio J.C. (2006) PICTOR. Mejoramiento de la eficiencia productiva de caprinos de leche de la zona norte de la provincia de Córdoba por el control de enfermedades infecciosas y parasitarias. Agencia Córdoba Ciencia.
- Bolon M. K. (2009) The newer fluoroquinolones. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 23: 1027–1051.

Böttcher S.; Baum T. H.; Hoppe-Tycho C.; Benz N. & Sonntag H. (2001) An HPLC assay and a microbiological assay to determine levofloxacin in soft tissue, bone, bile and serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25: 197-203.

Brouwers J.R. (1987) Pharmacokinetics of the newer fluoroquinolones. *Pharm. Weekbl. Sci.* 9 (Suppl): 16-22.

Brown S.A. (1996) Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 19 (1): 1–14.

Budiati T. (2010) The presence of fluoroquinolones as antibiotic on catfish: a risk assessment. *International Journal of Engineering Science and Technology* 2 (10): 5912-5914

Cancho G. B.; García F. M. S. & Simal G. J. (2000) El uso de los antibióticos en la alimentación animal: Perspectiva actual. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 3 (1): 39-47.

Carlucci G. (1998). Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 812: 343-367.

Cattoir V. (2004) Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria *Pathologie Biologie* 52: 607–616.

Cester C.C.; Toutain P.L.(1997) A comprehensive model for enrofloxacin and ciprofloxacin transformation and disposition in dog. *Journal of Pharmacol. Sciences* 86 (10):1148-1155.

Chagra Dib P. (2004) La producción caprina de carne: INTA (<http://www.minagri.gob.ar>)

Cinquina A. L.; Robertia P.; Giannettia L.; Longoa F.; Draiscib R.; Fagioloa A. & Brizioli N.R. (2003) Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection optimization and validation. *Journal of Chromatography A* 987: 221–226.

COFECYT (Consejo Federal de Ciencia y Tecnología) (2008) Lácteo caprino, La Pampa y Córdoba. Debilidades y desafíos tecnológicos del sector productivo. http://www.cofecyt.mincyt.gov.ar/pcias_pdfs/cordoba/UIA_lacteo_caprino_08.pdf

Concordet D. & Toutain P. L. (1997) The withdrawal time estimation of veterinary drugs revisited. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 20: 380-386.

Cordiés Jackson L.; Machado Reyes L. A. & Hamilton Cordiés M.L. (1998) Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta Médica* 8 (1):58-65.

Dall'Acqua F.; Viola G.; Vedaldi D.; Aloisi G. G.; Latterini E. & Passeri R. (2007) Photoinduced modifications by fluoroquinolone drugs in bovine serum albumin (BSA) and ribonuclease A (RNase) as model proteins. *ARKIVOC* (viii): 231-244.

Davicino R. A. (2003) Residuos de medicamentos veterinarios y anabólicos en carnes: enfoque técnico-legal en Argentina y el Mercosur. <http://www.comersinriesgos.com/?p=115>

Davis J. L.; Foster D. M. & Papich M. G. (2007) Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in calves. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 30: 564–571.

De Lucas J. J. & M. I. San Andrés & F. González & R. Froyman & C. Rodríguez (2008) Pharmacokinetic behaviour of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after subcutaneous administration in cattle. *Vet. Res. Commun.* 32:275–279.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacina en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Díaz P. A & Anadón A. (2000) Residuos de sustancias con actividad biológica en alimentos de origen animal y responsabilidad legal (1ª parte). Eurocarne. 83: 83-94.

Díez P. & Calderón V. (1997) Empleo de antibióticos en veterinaria. Revista Española de Quimioterapia 10 (4).

Drlica K. & Zhao X. (1997) DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61 (3): 377-392.

Dudley M. N.; Ericson J. & Zinner S. H. (1987) Effect of dose on serum pharmacokinetics of intravenous ciprofloxacin with identification and characterization of extravascular compartments using noncompartmental and compartmental pharmacokinetic models. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1782-1786.

Elmas M.; Tras B.; Kaya S.; Bas A.L.; Yazar E. & Yarsan E. (2001) Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular administration in Angora goats. The Canadian Journal of Veterinary Research 65: 64–67.

El Sheikh A.A.; Taha W.; Khalafallah A. I. & Osman I. A. (2002) Disposition kinetics of enrofloxacin (Baytril 5%) in sheep and goats following intravenous and intramuscular. Res. Vet. Sci. 73 (2): 125-129.

Emami S.; Shafiee A. & Foroumadi A. (2005) Quinolones: recent structural and clinical developments. Clinical Developments. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 3: 123-136.

EMA (European Medicines Agency) (1998a) Enrofloxacin (modification for bovine, porcine and poultry) Summary report (2) - Committee for veterinary medicinal products. EMA/MRL/388/98-FINAL

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

EMEA (European Medicines Agency) (2002) Enrofloxacin (Extension to all food producing species): Summary report (5) - Committee for Veterinary Medicinal Products. EMEA/MRL/820/02-FINAL

EMEA (European Medicines Agency) (1998) Danofloxacin (Extension to milk): Summary report - Committee for Veterinary Medicinal Products EMEA/MRL/507/98-FINAL

EMEA (European Medicines Agency) (1998) Note for guidance for the determination of withdrawal periods for milk. Committee for Veterinary Medicinal Products EMEA/CVMP/473/98-FINAL

EMEA (European Medicines Agency) (1998) Enrofloxacin (modification for bovine, porcine and poultry). Summmary Report 2 EMEA/MRL/388/98 –FINAL.

EMEA (European Medicines Agency) (1998) Guidelines on validation of analytical procedures: methodology. VICH Topic GL2. CVM/VICH/591/98-FINAL

EMEA (European Medicines Agency) (1998) Guidelines on validation of analytical procedures: definition and terminology. VICH Topic GL1. CVM/VICH/590/98-FINAL

EMEA (European Medicines Agency) (2006) Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (CPMP/ICH/381/95)

Emmerson A. M. & Jones A. M. (2003) The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 (Suppl. S1): 13–20.

Errecalde J. (2004) Uso de antimicrobianos en animales de consumo, incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. En: *FAO Producción y sanidad animal – Estudio 162*. Roma. <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm>

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Escudero E.; Cárceles Rodríguez C.M.; Fernández Varón E.; Marín Carrillo P. & Benchaoui H. (2007) Pharmacokinetics of danofloxacin 18% in lactating sheep and goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 30: 572-577.

Eurachem (1998) A laboratory guide to method validation and related topics. <http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf>

FAO/OMS (2002) Foro Mundial FAO/OMS de Autoridades sobre Inocuidad de los Alimentos. CRD sobre Informes Nacionales de Argentina. Tema 4.2 a) GF/CRD Argentina-1. Plan de Control de Residuos e Higiene 2001, Marruecos. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/004/x6922s.pdf>

FAO (2005) Proyecto TCP/RLA/3013 (A) Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de calidad para laboratorios de análisis de alimentos en América del Sur. <http://faorlc.cgnet.com/es/inocuidad/codex/rla3013/pdf/metodo.pdf>

FDA (Food and Drug Administration) (1998) Guidance for industry bioanalytical methods validation for human studies. US Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER)

FDA (Food and Drug Administration) (2001) Guidance for industry bioanalytical method validation. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). <http://www.fda.gov/cvm>

Farrier D.S. (1999) PK Solution 2.0, Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis. Summit Research Services. Ashland, USA.

Fernández-Varón E.; Ayala I.; Marín P.; Carrión A.; Martos N.; Escudero E. & Cárceles C.M. (2006) Pharmacokinetics of danofloxacin in horses after intravenous, intramuscular and intragastric administration. *J. Equine Vet.* 38 (4): 342-346.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Fernandez-Varón, E.; Marin P.; Escudero E.; Vancraeynest D. & Carceles C. (2007) Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of danofloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to rabbits. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 30: 18–24.

Fitton A (1992) The quinolones. An overview of their pharmacology. *Clinical Pharmacokinetics* 22 (Suppl 1):1-11.

Friedecký B.; Sprongl L. & Kratochvíla J. (2004) Validation and verification of analytical methods in clinical laboratories. Board of the Czech Society for Clinical Biochemistry 1-14.

Friis C. (1993) Penetration of danofloxacin into the respiratory tract tissues and secretions in calves. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1122-1127

Gandolf A.R.; Papich, M.G.; Bringardner A.B. & Atkinson M.W. (2005) Pharmacokinetics after intravenous, subcutaneous, and oral administration of enrofloxacin to alpacas. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 767–771.

Garcia Ovando H.; Errecalde C.; Prieto G.; Luders C.; Puelles I.; Berccochea C. & Fernandez W. (1996) Pharmacokinetics of enrofloxacin in calves. *Archivos de Medicina Veterinaria* 28: 107-111.

Garcia Ovando H.; Gorla N.; Poloni G.; Trotti N.; Prieto G. & Errecalde C. (2000) Intravenous pharmacokinetics of ciprofloxacin in goats. *International Journal of Antimicrobial Agents* 15: 77–79.

García Ovando H.; Gorla N.; Luders C.; Poloni G.; Errecalde C.; Prieto G. & Puelles I. (1999) Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 22: 209–212.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Gardner S. (2010) The evolution of modern fluoroquinolones. *Advanced Ocular Care*: 39-41.

Giguere S. & Belanger M. (1997) Concentration of enrofloxacin in equine tissues after long term oral administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 20: 402-404.

Giles C. J.; Magonigle R. A. & Grimshaw W.T. (1991) Clinical pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin in cattle. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 14: 400-10.

González Gómez F. & Martínez J.N. (2007) Quinolonas y fluoroquinolonas. En: M. San Andrés Larrea y J. C. Boggio *Antimicrobianos y Antiparasitarios en Medicina Veterinaria*. Ed. Intermédica, Buenos Aires. Pp. 249-281.

Grobbe M.; Lubke-Becker A.; Wieler L.H.; Froyman R.; Friederichs S. & Filios, S., (2007) Comparative quantification of the *in vitro* activity of veterinary fluoroquinolones, *Veterinary Microbiology* 124(1-2):73-81.

Gutierrez-Zufiaurre N. (2004) Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas. *Revista Española de Quimioterapia*, 17 (3): 232-243.

Haritova A.; Lashev L. & Pashov D. (2003) Pharmacokinetics of enrofloxacin in lactating sheep. *Research in Veterinary Science* 74: 241–245.

Haritova A. (2008) A role of p-glycoprotein in modulation of antibiotic pharmacokinetics. *Trakia Journal of Sciences* 6 (Suppl. 1): 1-6.

Hassouan M.K.; Ballesteros O.; Vilchez J.L.; Zafra A. & Navalón A. (2007) Simple multiresidue determination of fluoroquinolones in bovine milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Letters* 40: 779-791.

Hawkins E.C.; Boothe D.M. & Guinn A. (1998) Concentration of enrofloxacin and its active metabolite in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid of dogs. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 21: 18-23.

Hernández-Arteseros J.; Barbosa J.; Compañó R. & Prat M. (2002) Analysis of quinolone residues in edible animal products. *J. Chromatogr. A* 945: 1-24.

Hooper D.C. (1999) Mechanism of quinolone resistance. *Drug Resistance Update* 2: 38-55.

Hekman P. & Hoogland J.P. (2000) WTM1.4 Milk withdrawal time calculation program. (Freeware, distributed by the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA), London, UK.

Hopkins K. L.; Davies R. H. & Threlfall E. J. (2005) Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 25 (5): 358-73.

Idowu O.R. & Peggins J.O. (2004) Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35: 143–153.

Idowu O.R.; Peggins J.O.; Cullison R. & von Bredow J. (2010) Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Res. Vet. Sci.* 89 (2): 230-235

INTA (2011) Producción sustentable de carne y leche caprina en Córdoba
<http://inta.gob.ar/proyectos/cordo-620051>

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Islam M. M.; Sikder M. H.; Awal M. A.; Mostofa M. & Trisha A. A. (2008) Plasma pharmacokinetics of ciprofloxacin in sheep. *Bangl. J. Vet. Med.* 6 (1): 93–97.

Ismail M. (2006) A pharmacokinetic study of danofloxacin in febrile goats following repeated administration of endotoxin. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 29: 313–316.

Javed I.; Iqbal Z.; Rahman Z.; Zargham Khan M.; Muhammad F.; Aslam B.; Sandhu M. A. & Sultan J. I. (2009) Disposition Kinetics and Optimal Dosage of Ciprofloxacin in Healthy Domestic Ruminant Species. *Acta Vet. Brno* 78: 155–162.

Jonker J.W.; Merino G.; Musters S.; van Herwaarden A.E.; Bolscher E.; Wagenaar E.; Mesman E.; Dale T.C. & Schinkel A.H. (2005) The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat. Med.* 11:127–129.

Kaartinen L.; Panu S. & Pyörälä S. (1997) Pharmacokinetics of enrofloxacin in horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine Veterinary Journal.* 29 (5): 378-381.

Kaartinen L.; Salonen M.; Alli L. & Pyorala, S. (1995) Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 18: 357–362.

Kaminski W. E.; Piehler A. & Wenzel J. J. (2006) ABC a subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762: 510–524.

Kato M. (2008) Chondrotoxicity of quinolone antimicrobial agents. *J. Toxicol. Pathol.* 21: 123-131.

Khaliq Y. & Zhanel G. G. (2003) Fluoroquinolone-associated tendinopathy: a critical review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 36 (11): 1404-1410.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Knoll U.; Glunder G. & Kietzmann M. (1999) Comparative study of the plasma pharmacokinetics and tissue concentrations of danofloxacin and enrofloxacin in broiler chickens. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 22: 239-246

Koritz G.D. (1988). Drugs disposition and pharmacokinetic considerations for food safety. Proceeding 6th Symposium AAVPT, Backsburg, USA: 17-20.

Kung K.; Riond J. L. & Wanner M. (1993) Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 16 (4): 462-468.

Kusuhara H & Sugiyama Y (2007) ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Eur. J. Physiol.* (2007) 453:735–744.

Lee M. & Ryu P. (2000). Public Health Risks: drug and antibiotic residues. 2000 APEC China Seminar. Beijing, China: 80-98.

Lees P. & Aliabadi F. (2002) Antimicrobianos que inhiben la función de los ácidos nucleicos. En: Botana L.E; Landoni M.F & Martín-Jiménez T. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Ed. Mc Graw Hill- Interamericana de España. Madrid. Cap. 37, Pp: 484-492.

Lees P.; Svendsen O. & Wiuff, C. (2008) Strategies to minimise the impact of antimicrobial treatment on the selection of resistant bacteria. En: *Guide to Antimicrobial Use in Animals* por Guardabassi L.; Jensen L.B. & Kruse H. (Ed). Garsington Road, Oxford, UK, Blackwell Publ.: 77-101.

Leyva S. & Leyva E. (2008) Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones físicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol. Soc. Quím. Méx.* 2 (1): 1-13.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacina en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Lindecrona R. H.; Friis C. & Nielsen J. P. (2000) Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin into the gastrointestinal tract in healthy and in *Salmonella typhimurium* infected pigs. Res. Vet. Sci. 68: 211-216.

Lode H.; Borner K. & Koeppel P. (1998) Pharmacodynamics of fluoroquinolones. Clinical Infectious Diseases 27: 33-39.

Lozano M. C. & Arias D. C. (2008) Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. Rev. Colomb. Cs. Pecuarias 21: 121-135.

Manceau M.; Gicquel M.; Laurentie N. & Sanders P. (1999) Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biological fluids by high-performance liquid chromatography. Application in pharmacokinetic studies in pig and rabbit. Journal of Chromatography B 726: 175-184.

Mann D.D. & Frame G.M. (1992) Pharmacokinetic study of danofloxacin in cattle and swine. Am. J. Vet. Res. 53 (6): 1022-1026.

Marín-Carrillo M. (2008) Aplicación de fluoroquinolonas en Medicina Veterinaria: Criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD). Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España.

Martín-Jiménez T. & Riviere J. (1998). Population pharmacokinetics in veterinary medicine: Potential use for therapeutic drug monitoring and prediction of tissue residues. J. Vet. Pharmacol. Therap. 21: 167-189.

Martínez M.; Mc Dermott P.; Walker R. (2006) Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. The Veterinary Journal 172(1): 10-28.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Marzo A. & Dal Bo L. (1998). Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *J. Chromatogr. A* 812: 17-34.

Maślanka T.; Jaroszewski J.J. & Chrostowska M. (2004) Pathogenesis of quinolone-induced arthropathy: a review of hypotheses. *Pol. J. Vet. Sci.* 7 (4): 323-331.

Mc Kellar Q. A.; Gibson I. F. & Mc Cormack R. Z. (1998) Pharmacokinetics and tissue distribution of danofloxacin in sheep. *Biopharm. Drug Dispos.* 19: 123-129.

McKellar Q.; Gibson I.; Monteiro A. & Bregante M. (1999) Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma, inflammatory exudate, and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1988–1992.

McKellar Q.; Sanchez Bruni S. & Jones D. (2004) Pharmacokinetic / pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 27: 503-514.

McKinnon P. & Davis S. (2004) Pharmacokinetic and pharmacodynamic tissues in the treatment of bacterial infectious diseases. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.* 23: 271-288.

Miller M. & Flynn W.T. (2002). Regulación del empleo de antibióticos en los animales. En: *Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria* por J Prescott J., Baggot J. & Walters R. 3Ed, Buenos Aires, Intermédica Pp: 657-667.

Merino G.; Jonker J.W.; Wagenaar E.; Van Herwaarden A.E. & Schinkel AH. (2005a) The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol. Pharmacol.* 67 (5): 1758-1764.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

- Merino G.; Van Herwaarden A.E.; Wagenaar E. ; Jonker J.W. & Schinkel A.H. (2005b) Sex-dependent expression and activity of the ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in liver. *Mol. Pharmacol.* 67 (5): 1765-1771.
- Merino G.; Alvarez A.I.; Pulido M.M.; Molina A.J.; Schinkel A.H. & Prieto J.Gg (2006) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metab Dispos.* 34 (4): 690-695.
- Mestorino N.; Marchetti E.; Turic J.; Pesoa J.& Errecalde J. (2009) Concentrations of danofloxacin 18% solution in plasma, milk and tissues after subcutaneous injection in dairy cows. *Analytica Chimica Acta* 6 (37): 33–39.
- Miller M. & Flynn W.T. (2002). Regulación del empleo de antibióticos en los animales. En *Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria* por J Prescott J., Baggot J. & Walters R. 3 Ed., Buenos Aires, Intermédica: 657-667.
- Mitchell J.; Griffiths M.; Mc Ewen S.; Mc Nab S. & Yee A. (1998). Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, test and test performance. *J. Food Prot.* 61 (6): 742-756.
- Mgbodile M. U. & Campbell C. (1972) Effect of protein deprivation of male weanling rats on the kinetics of hepatic microsomal enzyme activity. *J. Nutrition* 102: 53-60.
- Moreno G. B.; García A. M. R. & López M. T. (2000) Riesgos sanitarios de la contaminación de los alimentos. *Alimentaria* (Enero-Febrero): 19-28.
- Muñoz M.M.; Llovería P.; Santos M.P.; Abadía A.R.; Aramayona J.J. & Bregante, M.A. (1996) Pharmacokinetics of ciprofloxacin in sheep alter single intravenous or intramuscular administration. *The Veterinary Quarterly* 18: 45–48.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Moudgal V. V. & Kaatz G. W. (2009) Fluoroquinolone Resistance in Bacteria En: Mayers D. L. Antimicrobial Drug Resistance Vol. 1, Humana Press, London. Chap. 16:195-206.

Nielsen P. & Gyrd-Hansen N. (1997) Bioavailability of enrofloxacin after oral administration to fed and fasted pigs. *Pharmacol. Toxicol.* 80 (5): 246-250.

Nouws J. & Ziv G. (1976). The effect of storage at 4°C on antibiotic residues in kidney and meat tissues of dairy cows. *Tijdschr. Diegeneesk* 101 (20): 119-127.

Nouws J. F. M.; Mevius D. J.; Vree T. B.; Baars A. M. & Laurensen J. (1988) Pharmacokinetics, renal clearance and metabolism of ciprofloxacin following intravenous and oral administration to calves and pigs *Veterinary Quarterly* 10 (3): 156-163.

OAA (Organismo Argentino de Acreditación) (2008) Guía para validación de métodos de ensayo. <http://www.oaa.org.ar/200504/DataFile.asp?FileID=2698>

Otero J. L.; Mestorino N. & Errecalde J. O. (2001a) Enrofloxacin una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria Parte I: Química, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. *Analecta Veterinaria* 21 (1): 31-41.

Otero J.L.; Mestorino N. & Errecalde J. O. (2001b) Enrofloxacin una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria Parte II: Farmacocinética y toxicidad. *Analecta Veterinaria* 21 (1): 42-49.

Otero J.L., N. Mestorino & J.O. Errecalde (2009) Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous administration in sheep. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 28 (3): 1129-1142.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Palermo Neto J. (2006). Uso de medicamentos veterinários: impactos na moderna avicultura. VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Chapecó, SC, Brasil: 70-78.

Pallo-Zimmerman L.; Byron J. & Graves T. (2010) Fluoroquinolones: then and now. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 32 (7): E1-9.

Papich M. & Riviere J. E. (2009) Fluoroquinolone antimicrobial drugs. En: Papich M., Riviere J. E. & Adams H.R. (Ed.) *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 9th Ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames Iowa. Chap. 38, Pp: 983-1001.

PEA² (2011) Plan Estratégico Alimentario y Agroindustrial – Participativo y Federal. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentos de Córdoba y Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación.

Petracca K.; Riond J.L.; Graser T. & Wanner M. 1993 Pharmacokinetics of the gyrase inhibitor marbofloxacin: influence of pregnancy and lactation in sows. *Zentralbl Veterinarmed* 40 (1): 73-79.

Posyniak A.; Zmudzki J.; Semeniuk S.; Niedzielska J. & Eblis R. (1990). Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues by liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 13: 279-285.

Pozzin O.; Harron D.W.G.; Nation G.; Tinson A.H.; Sheen R. & Dhanasekharan S. (1997) Pharmacokinetics of enrofloxacin following intravenous/intramuscular/oral administration in Nedji sheep. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 20 (Suppl. 1): 50.

PROSAIA (2011a) Guía N° 1: Guía técnica para la conducción de estudios de metabolismo y cinética de residuos de fármacos veterinarios en animales productores de alimentos. Estudios de eliminación de residuos para establecer períodos de espera del producto. Fundación PROSAIA. Buenos Aires. 15 Pp.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacina en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

PROSAIA (2011b) Guía N° 2: Guía para la validación de los métodos analíticos utilizados en matrices biológicas. Fundación PROSAIA. Buenos Aires. 21 Pp.

Pulido M.M.; Molina A.J.; Merino G.; Mendoza G.; Prieto J.G. & Alvarez A.I. (2006) Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 9: 279-287.

Pyörälä S. (1994) Local tissue damage in cows after intramuscular injections of eight antimicrobial agents. *Acta Veterinaria Scandinavica* 35: 107-110.

Ramesh S., Rao G.S. and Malik J.K. (2002) Pharmacokinetic disposition of subcutaneously administered enrofloxacin in goats. *Veterinary Research Communications* 26, 563–569.

Ramos M.; Aranda A.; Garcia E.; Reuvers T. & Hooghuis H. (2003). Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 789: 373-381.

Rao G. & Malik K. (2006) Drug residues in poultry products - monitoring for safety and quality assurance. National Seminar Poultry Research Priorities to 2020. By Sasidhar P.V.K. (Ed). Izatnagar, India: 211-217.

Rao G.S.; Ramesh S.; Ahmad A.H.; Tripathi H.C.; Sharma L.D. & Malik J.K. (2000) Effects of endotoxin-induced fever and probenecid on disposition of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravascular administration of enrofloxacin in goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 23: 365–372.

Rao G.S.; Ramesh S.; Ahmad A.H.; Tripathi H.C.; Sharma L.D. & Malik J.K. (2002) Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goats given enrofloxacin alone and in combination with probenecid. *Vet J.* 163 (1): 85-93.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacina en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Rao G.S.; Ramesh S.; Ahmad A.H.; Tripathi H.C.; Sharma L.D. & Malik J.K (2001) Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intramuscular administration of enrofloxacin in goats. *Veterinary Research Communications* 25: 197-204

Rao G.S.; Ramesh S.; Ahmad A.H.; Tripathi H.C.; Sharma L.D. & Malik, J.K. (2002) Disposition kinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin following intravenous administration of enrofloxacin in goats. *Small Ruminant Research* 44: 9-15.

Real R.; Egido E.; Pérez M.; González-Lobato L.; Barrera B.; Prieto J. G.; Álvarez A.I. & Merino G. (2011) Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the secretion of danofloxacin into milk: interaction with ivermectin. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 34: 313-321.

Richez P.; Pedersen M. A.; De Jong A. & Monlouis, J. D. (1997). Plasma pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin and enrofloxacin in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 20: 41-42.

Riveros Morcillo L. E. (2008) Tesis: Cinética sanguínea y láctea de enrofloxacina en vacas lecheras en el último tercio de gestación. Maestría en Inocuidad y Calidad de Alimentos. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Riviere J. E. & Sundlof S. F. (2009) Chemical residues in tissues of food animals. En: Papich M.; Riviere J. E. & Adams H. R. (Ed.) *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (9th Ed.). Wiley-Blackwell Publishing, Ames. Chap. 61Pp. 1453-1462.

Rodríguez-Martínez J. M. (2005) Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23 (1): 25-31.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacina en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Rothlin R. P. (1999) Quinolonas Revisión Histórica. Medicina (Buenos Aires) 59 (Supl. I): 3-7.

Rouveix B. (2003) Antibiotic Safety Assessment. International Journal of Antimicrobial Agents 21 (2003) 215-/221.

Rubio Langre S. (2011) Comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin y de la enrofloxacin en llamas ("*Lama glama*"). Tesis de Doctorado, Departamento de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España. (<http://eprints.ucm.es/13190/1/T32991.pdf>)

Ruiz J. (2003) Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51: 1109–1117.

Rybak M. (2006). Pharmacodynamics: relation to antimicrobial resistance. Am. J. Med. 119 (6A): 37-44.

San Andrés Larrea M. & Boggio J.C. (2007). Introducción a los antimicrobianos. En Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria por San Andrés Larrea M. & Boggio, J.C. (Ed.). Buenos Aires, Ed. Intermédica, Pp: 1-24.

San Martín A.; Cañon H. & Iragüen D. (2001) Ensayo rápido para la determinación simultánea de enrofloxacin y ciprofloxacin en leche mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Archivos de Medicina Veterinaria. 33 (1)

Sarasola P.; Lees P.; AliAbadi F.& McKellar Q. A.; Donachie W.; Marr M.A.; Sunderland S. J. & Rowan T. G. (2002) Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profiles of Danofloxacin Administered by Two Dosing Regimens in Calves Infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy Sept: 3013–3019.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Sárközy G. (2001) Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Vet. Med. Czech* 46 (9–10): 257–274.

Scheer M. (1987) Concentrations of active ingredient in the serum and in tissue after oral and parenteral administration of Baytril®. *Veterinary Medicine Review* 2: 104-118.

Scholar E.M. (2002). Fluoroquinolones: Past, Present and future of a novel group of antibacterial agents. *American. J. Pharmaceut. Educ.* 16:14-22.

Schrickx J.A. & Fink-Gremmels J. (2007) Danofloxacin-mesylyate is a substrate for ATP-dependent efflux transporters. *British Journal of Pharmacology* 150: 463–469

SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) (2011) Res. 559/2011

<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1501&ino=1501&io=18007>

Shafarin M.S.; Zamri-Saad M.; Khairani B.S. & Saharee A.A. (2009) Pathological changes in the respiratory tract of goats infected by *Pasteurella multocida* B:2. *J. Comp. Pathol.* 194-197.

Sharma P.C.; Jain A. & Jain S. (2009) fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research.* 66 (6): 587-604.

Sharma P.K.; Ahmad A.H.; Sharma L.D. & Rachna Varma T. (2003) Pharmacokinetics of enrofloxacin and the rate of formation of its metabolite ciprofloxacin following intravenous and intramuscular single dose administration to male buffalo calves. *The Veterinary Journal* 166: 101–104.

Sharom F J (2008) ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 9 (1): 105–127.

Shem-Tov M.; Rav-Hon O.; Ziv G.; Lavi E.; Glickman A. & Saran A. (1998b) Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of cows. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 21 (3):209-213.

Singh C. S.; Singh S.D.; Jayachandran C.; Akhtar M.H. & Singh M.K. (2001) Kinetics and distribution of ciprofloxacin in biological fluids of goats after intramuscular administration. *Indian J. Anim. Res.* 35 (2): 116 – 119.

Smith, J.T. (1984) Awakening the slumbering potential of the 4-quinolone antibacterials. *The Pharmaceutical Journal* 10: 123-139.

Soback S.; Gips M.; Bialer M. & Bor A. (1994) Effect of lactation on single-dose pharmacokinetics of norfloxacin nicotinate in ewes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (10): 2336–2339.

Sortino S.; De Guidi G.; Giuffrida S.; Monti S. & Velardita A. (1998) pH effects on the spectroscopic and photochemical behavior of enoxacin: a steady-state and time-resolved study. *Photochem. Photobiol.* 67 (2): 167-73.

Soulsby, L. (1999) El uso de antibióticos en producción animal y la resistencia antimicrobiana. XI Reunión Interamericana de Salud Animal a Nivel Ministerial, Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Washington, D.C.

Sprandel KA.; Rodvold KA. (2003) Safety and tolerability of fluoroquinolones. *Clin. Cornerstone Suppl* 3: S 29-36.

Stahlmann R. (2002) Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. *Toxicology Letters* 127: 269-277.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Stahlmann R. & Lode H. (2000) Safety overview. toxicity, adverse effects and drug interactions. En: Andriole V.T. The Quinolones (3rd Ed). Academic Press, San Diego. Pp. 397-453.

Stolker A. A. M. & Brinkman U. A. (2005) Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals a review. *Journal of Chromatography A* 1067: 15–53.

Sumano López H. (1993) Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Veterinaria México* 24 (2): 83-92.

Thompson M.; Ellison L. R. & Wood R. (2002) Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.* 74 (5): 835–855.

Tillotson G. S. (1996) Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J. Med. Microbiol.* 44: 320-324.

USP (United States Pharmacopeial Convention) (2007a) Danofloxacin package insert (A180, Pfizer US). Available at www.pfizerah.com. Accessed on August 23, 2005.

Toutain P. L. (2008). Plasma vs. tissue concentration to predict antibiotic efficacy. 4th International Conference on AAVM. Prague, Czech Republic, august 24-28.

Toutain P. & Bousquet-Mélou A. (2004a). Clearance. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 27: 415-425.

Toutain P. & Bousquet-Mélou A. (2004b). Plasma terminal half-life. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 27: 427-439.

Toutain P. & Bousquet-Mélou A. (2004c). Volumes of distribution. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 27: 441-453.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacina en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Toutain P. & Bousquet-Mélou A (2004d). Bioavailability and its assessment. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 27: 455-466.

USP (United States Pharmacopeial Convention) (2007) Fluoroquinolones (Veterinary-Systemic). <http://vetmed.tamu.edu/common/docs/public/aavpt/fluoroquinolones.pdf>

Van der Linden P. D.; Van de Lei J.; Nab H.W.; Knol A. & Stricker B. H. (1999) Achilles tendinitis associated with fluoroquinolones. *J. Clin.Pharmacol.* 48: 433–437.

Vancutsem P. M.; Babish J. G. & Schwark W. S. (1990) The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Veterinarian* 80: 173–186.

Varma R.; Ahmad A. H.; Sharma L. D. , Aggarwal P. & Ahuja V. (2003) Pharmacokinetics of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in cows following single dose intravenous administration *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 26: 303–305.

Verdon E.; Coudeudor P.; Roudault B. & Sanders P. (2005). Multiresidue method for simultaneous determination of ten quinolone antibacterial residues in multimatrix/multispecies animal tissues by liquid chromatography with fluorescence detection: single laboratory validation study. *J. AOAC Int.* 88: 1179-1192.

Vinagre J. (1997) Calidad de métodos analíticos. En: FAO-Universidad de Chile Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. En: Morón C.; Zacarías I. & de Pablo S. (Eds.). Cap. 13.

Walker R. (2002). Fluoroquinolonas. En: *Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria por Prescott J.; Baggot J. & Walters R. (3 Ed.)*, Buenos Aires, Intermédica Pp: 278-298.

Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacina y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

Wang J.C. (1974) Interactions between twisted DNAs and enzymes: the effect of superhelical turns. *Journal of Molecular Biology* 87:797.

Wise R. (1991) Comparative penetration of selected fluoroquinolones into respiratory tract fluids and tissues. *The American Journal of Medicine*. 91 (Suppl. 6A): 67s-70s.

Yorke J. & Froc P. (2000). Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 882: 63-77.

Yúfera E.P. (2007) *Química orgánica básica y aplicada: De la molécula a la industria*. Vol. 2. Ed. Reverté, Barcelona. Pp. 990-991

Ziv, G. 1980. Drug selection and use in mastitis: Systemic vs. local therapy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176:1109–1115.



Disposición plasmática y determinación de residuos de danofloxacin y enrofloxacin en leche de cabras en lactancia.

Maestrando: M.V. Esp. Cs. Clínicas Guillermo F. Prieto

U N R C
Biblioteca Central



71177

71177