

RODRIGUEZ TRIANA, LU.
Deplecion de los niv

2014

73213

75213



Universidad Nacional de Río Cuarto

Maestría en Inocuidad y Calidad de Alimentos

Tesis:

**DEPLECION DE LOS NIVELES DE DANOFLOXACINA EN
PLASMA Y EN TEJIDOS COMESTIBLES DE POLLOS
PARRILLEROS**

Maestrando: Qco. Alimentos Ludy Yised Rodríguez Triana

Director: Dr. Carlos Errecalde

Río Cuarto - 2014

1527

73213

NFN:
Clasif: T.875

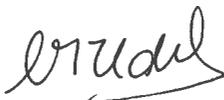
DEPLECION DE LOS NIVELES DE DANOFLOXACINA EN PLASMA Y EN
TEJIDOS COMESTIBLES DE POLLOS PARRILLEROS

LUDY YISED RODRIGEZ TRIANA


Dr. Carlos Errecalde
Director

Evaluadores:

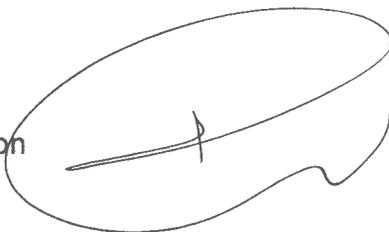
M.V. M.Sc Laura Ugnia



M.V. M.Sc Jaquelina Valek



M.V. M.Sc Armando Nilson



Prof. M.Sc. Rubén Davicino

Director Maestría en Inocuidad y Calidad de Alimentos

DEDICATORIA

A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, a mis madres, Marilyn y Susana Ríos, a mi padre que siempre luchó por mi educación, ellos han sido y serán quienes a lo largo de mi vida velarán por mi bienestar y superación siendo mi apoyo en todo momento, depositando su entera confianza en cada reto que se me presenta sin dudar ni un solo momento en mi capacidad. Es por ellos que soy lo que soy ahora. Los amo con mi vida. A mi abuelito Guillermo, a mis hermanas y sobrinos, incluyendo a Cintia, Melisa y Jazmín; por siempre haberme dado su fuerza y apoyo incondicional y me han ayudado y llevado hasta donde estoy. Y por último mi novio, David, quien me apoyo desde el comienzo de esta experiencia.

Ludy

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento al director de Tesis el Dr. Carlos Errecalde por el asesoramiento a la realización de la misma, por sus consejos, amistad y por su valiosa guía.

Para el Dr. Guillermo prieto, quien me apoyo incondicionalmente ayudándome siempre con sus conocimientos.

A mi familia argentina Ríos Gómez, incluyendo a Julio que me adoptaron y me dieron un lugar en su hogar.

Al Dr. Rosendo Liboa quien me acompañó y asesoró con sus invaluable consejos.

Al Dr. Rubén Davicino, por el apoyo brindado para la culminación de esta tesis.

A mis profesores y compañeros de clase quienes hicieron las clases agradables y enriquecedoras

Igualmente quiero agradecerles a los dueños y compañeros de trabajo y amigos de Luis María & Cía., con los que compartí momentos especiales y quienes fueron mi segunda familia argentina.

A Nati y Paula quienes me acompañaron en el laboratorio y me apoyaron.

También al M.V. Martín Bina y personal de Agroimperio SRL., Río Cuarto, quienes me ayudaron con los animales y me prestaron las instalaciones.

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

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

INDICE	Pág.
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Resumen	8
Summary	9
I. INTRODUCCIÓN	10
I.1. La producción avícola	10
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO	14
III. OBJETIVOS	14
III.1. General	14
III.2. Específicos	14
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
IV.1. Terapia antimicrobiana en avicultura	15
IV.2. Fluoroquinolonas	25
IV.2.1. Farmacocinética	27
IV.2.2. Reacciones adversas	29
IV.2.3. Antecedentes en aves	29
IV.2.4. Danofloxacin	34
IV.2.4.1. Antecedentes en aves	36
IV.2.5. Residuos en alimentos de origen animal	37
IV.3. Aspectos Regulatorios	45
V. MATERIALES Y METODOS	46
V.1. Reactivos	46
V.2. Soluciones	46
V.3. Equipos	47
V.4. Software	47
V.5. Antimicrobianos	47
V.6. Animales	47
V.7. Toma de muestras	48
V.8. Tratamiento de las muestras	49

V.9. Separación y cuantificación	49
V.10. Cálculo de concentraciones	50
V.11. Análisis farmacocinético	50
V.12. Cálculo periodo de resguardo	50
V.13. Validación del método cromatográfico	50
VI. RESULTADOS	53
VI.1. Validación del método cromatográfico	53
VI.2. Ensayo farmacocinético y de disposición tisular	54
VI.3. Periodo de resguardo	57
VII. DISCUSIÓN	58
VIII. CONCLUSIONES	63
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

INDICE DE TABLAS

N.	Título	Pág.
1	LMR establecidos para fluoroquinolonas en pollos, expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$.	40
2	Ensayo de linealidad de danofloxacinina en plasma y tejidos de pollos.	53
3	Ensayo de recuperabilidad de danofloxacinina en plasma y tejidos de pollos.	53
4	Ensayo de repetibilidad y reproducibilidad de danofloxacinina en plasma y tejidos de pollos.	53
5	Ensayos de límite de detección (LD) y cuantificación (LC)	53
6	Concentraciones plasmáticas de danofloxacinina ($X \pm \text{DE}$) versus tiempo	54
7	Concentraciones tisulares ($X \pm \text{DE}$) de danofloxacinina en pollos luego de la administración oral de 5 mg/kg	55
8	Parámetros cinéticos plasmáticos obtenidos con danofloxacinina en pollos por vía oral.	56
9	Parámetros farmacocinéticos tisulares obtenidos con 5 mg/kg de danofloxacinina por vía oral en pollos.	57

INDICE DE FIGURAS

N.	Título	Pág.
1	Fórmula estructural de las fluoroquinolonas	26
2	Fórmula estructural de danofloxacinina	34
3	Representación de las concentraciones plasmáticas, hepáticas y musculares de danofloxacinina tras la administración oral de 5 mg/kg.	55

RESUMEN

El uso y abuso indiscriminado de antimicrobianos en los productores de pollo de engorde y en la mayoría de granjas avícolas, ha llevado a muchos productores al fracaso y tiene a otros al borde de la quiebra, sin minimizar el peligro que corre el consumidor, debido a la mala información de cuándo usar estos productos y por qué usarlos, por lo que se hace necesario saber que antimicrobiano puede funcionar en medicina veterinaria y en que concentraciones.

De esta manera se estudió la farmacocinética de danofloxacin, una fluoroquinolona de segunda generación, la cual desarrolla acciones bactericidas al inhibir selectivamente la enzima DNA-girasa en microorganismos G⁺, G⁻ y mycoplasmas. Frente a *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus sommus*, utilizada con frecuencia en aves, tras la administración única de 5 mg/kg por vía oral. Las aves fueron sacrificadas en distintos tiempos hasta las 120 horas, se obtuvieron muestras de plasma y tejidos con el propósito de cuantificar el antimicrobiano por HPLC. Mediante el programa PK Solution se analizaron los datos de concentraciones plasmáticas y tisulares, el análisis de éstas concentraciones residuales versus tiempo permitió estimar un período de resguardo a la faena de 1.4 y 3.34 días, para músculo e hígado, respectivamente, compatibles con la brevedad de los ciclos de producción de pollos parrilleros.

SUMMARY

The indiscriminate use and abuse of antimicrobials in broiler producers and most poultry farms, has led many producers to failure and has more on the brink of bankruptcy, without minimizing the danger to the consumer because misinformation when using these products and why to use them, so it is necessary to know that antimicrobial can work in veterinary medicine and in what concentrations.

Thus pharmacokinetics danofloxacin a second generation fluoroquinolone, which develops bactericidal action to selectively inhibit the DNA gyrase enzyme in microorganisms was studied G+, G - and mycoplasma. Against *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus sommus*, frequently used in poultry, after a single administration of 5 mg / kg orally. Birds were sacrificed at various times up to 120 hours, samples of plasma and tissue were obtained for the purpose of quantifying the antimicrobial by HPLC. By PK Solution program data plasma and tissue concentrations were analyzed, the analysis of these residual concentrations versus time allowed us to estimate a period backup to the slaughter of 1.4 and 3.34 days for muscle and liver, respectively, consistent with the short cycles of broiler production.

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. La producción avícola

En la historia del hombre el consumo de alimentos de origen animal ha tenido importantes repercusiones nutricionales y culturales. En este contexto, la carne de pollo formaliza un rol primordial por cuanto conforma un ingrediente básico en la dieta del ser humano, siendo aceptado por todas las clases sociales (Carbajal, 1987; Fernández & Marsó, 2003).

La carne de pollo es un alimento de elevado valor nutritivo, apetecible, muy versátil desde lo gastronómico, sencillo de elaborar y económico. El consumo se ha incrementado en forma progresiva y paralela con los cambios relacionados con la industrialización, urbanización y el progreso económico-social producido en las últimas décadas en la población de los países desarrollados (Carbajal, 1987).

A partir de la década del 60' a la actualidad, el desarrollo de los sistemas intensivos de crianza ha transformado la posición de este alimento en el mercado y también la composición de la dieta (Yagüe, 2005). Además, la imagen de alimento saludable acuerda con los objetivos nutricionales que recomiendan moderar la ingesta de grasa total, grasa saturada y colesterol para reducir el riesgo de algunas de las enfermedades crónicas más prevalentes (Higgs & Pratt, 1998).

Es una carne magra reconocida, y como consecuencia, minimiza el riesgo de padecer colesterol en los consumidores (Dapcich et al., 2004), con predominio de la “grasa buena”, con efectos benéficos sobre la salud cardiovascular. La carne de ave constituye una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados, sobre todo de ácidos grasos omega (n)-3 (Fernández & Marsó, 2003; Carbajal, 2005).

La carne de pollo constituye una atractiva fuente de proteínas, presente en cantidad equivalente al resto de las carnes (20-22%): provee aminoácidos esenciales de fácil digestión: un filete pequeño de pechuga aporta a nuestro organismo el 30% de las necesidades medias de proteínas diarias (Carbajal, 2005).

Abunda en minerales, tales como hierro, fósforo y potasio (Chizzolini et al., 1999; Fernández & Marsó, 2003; Dapcich et al., 2004) y es fuente de vitamina B3, indispensable para transformar lo que consumimos en energía, y de vitamina B6, que interviene en la formación de glóbulos rojos y el funcionamiento del tejido nervioso (Chizzolini et al., 1999).

El hígado de pollo también aporta ácido fólico, necesario en los primeros meses de gestación para evitar deterioros en el tubo neural del bebé y prevenir enfermedades cardiovasculares en humanos (Rodríguez, 1998).

En correspondencia con el crecimiento de la producción, el consumo mundial de carne de pollo exhibe un crecimiento sostenido desde hace tres décadas. Representa alrededor del 30% del consumo mundial de carnes, que se ha mantenido en los últimos cinco años.

La FAO proyecta para el futuro crecimientos importantes del consumo en América Latina, en el norte de África y el Cercano Oriente. En Egipto, Irán y Turquía se han registrado en años recientes incrementos del consumo de carnes, centrados casi exclusivamente en pollos. Con relación a la India, existe cierto consenso en que el consumo se ampliaría en la próxima década.

Cannavan (2004), proyecta un crecimiento del consumo del 44 % en los países en desarrollo, entre los años 2002 y 2030. En cambio, en los estados industriales las proyecciones revelan crecimientos más discretos, por cuanto en la actualidad estos países ostentan niveles muy elevados de consumo de carnes y, eventuales alzas en el consumo per cápita responderían a un reemplazo de las carnes rojas por carne de aves.

En el transcurso de la última década, el sector avícola en Argentina ha evidenciado un notable desarrollo. La implementación de estrategias productivas orientadas a la satisfacción integral de las necesidades de los clientes, ha sido fundamental para lograr este crecimiento.

La expresión de numerosas patologías infecciosas como consecuencia del hacinamiento al que son sometidos estos animales en las explotaciones modernas, ha causado enormes pérdidas económicas. Con el propósito de contrarrestar este problema, durante años se han utilizado fármacos antimicrobianos.

Estas son sustancias que se obtienen por síntesis o naturalmente a partir de los cultivos de microorganismos. Estos fármacos permiten llevar la producción avícola de un modo eficaz, sin embargo, su empleo debe ser limitado y manejado en base a una planificación estratégica tendiente a mantener a las enfermedades por debajo del umbral de daño económico.

Una importante cantidad de antibacterianos son usados en la práctica veterinaria y muchos de ellos en medicina aviar. Además con la elevada producción de antimicrobianos disponible en medicina humana, se facilita la adquisición y extrapolación a las aves.

La relación costo/beneficio hace que muchos veterinarios y/o empresas dedicadas a este sector contemplen la aplicación de estas sustancias; igualmente los avicultores requieren nuevos productos quimioterapéuticos a bajo precio que resuelvan parte de los problemas infecciosos que afectan a sus aves.

La incorporación de un nuevo compuesto antibacteriano para uso exclusivo en el sector avícola resulta oneroso, no sólo debido a su descubrimiento o síntesis, sino por la necesidad de estudios farmacológicos que avalen su empleo, que comprenden ensayos farmacocinéticos, toxicológicos y de residuos.

Uno de los grupos antibacterianos que más evolución ha tenido en medicina humana como en veterinaria son las fluoroquinolonas (Martínez et al., 2006 b; Bhavsar & Thaker, 2012; Gupta et al., 2012). Estas sustancias representan una alternativa atrayente para el tratamiento de infecciones provocadas por diversos microorganismos que incluyen *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Haemophilus paragallinarium*, *Pasteurella*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* spp, entre otros, y en ocasiones para controlar infecciones causadas por *Mycoplasma* spp (Brown, 1996; Gupta et al., 2012).

En avicultura se aplican con frecuencia las fluoroquinolonas de segunda generación, destinadas al tratamiento y profilaxis de enfermedades entéricas y respiratorias (Glisson et al., 2004; Löhren et al., 2008; Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010).

El uso de estos agentes fue fomentado por su actividad bactericida frente a bacterias gramnegativas y micoplasmas, provocado por el bloqueo de la

subunidad A de la enzima ADN girasa ó topoisomerasa II, indispensable para la duplicación del ADN microbiano (González Gómez & Nieto Martínez, 2007; Fábrega et al., 2008; Gupta et al., 2012).

El grupo emerge como alternativa terapéutica no sólo por sus propiedades farmacológicas sino como respuesta frente a la resistencia bacteriana creciente manifestada por otros antibacterianos utilizados en aves (Huang et al., 2009; Lozano & Trujillo, 2012) y por las restricciones impuestas por motivos toxicológicos a los nitrofuranos, cloranfenicol y sulfonamidas (Paige & Tollefson, 2003; Reig & Toldrá, 2009; Lozano & Trujillo, 2012).

Considerando que danofloxacin -fluoroquinolona de segunda generación- representa una alternativa terapéutica en pollos parrilleros, se procura cuantificar su disposición en el plasma y en tejidos comestibles tras la administración única por vía oral y proponer un periodo de resguardo basado en parámetros farmacocinéticos obtenidos en tejidos comestibles mediante un modelo poblacional debido que no siempre existe una correlación lineal entre las concentraciones plasmáticas y tisulares (Bergogne-Bérézin, 1996; Beltrán, 2004), con el propósito de aportar información que permita el uso racional de este recurso antimicrobiano y simultáneamente proteger al consumidor de carne de pollo.

II. HIPÓTESIS

Las concentraciones plasmáticas de danofloxacin se condicen con las generadas en tejidos comestibles.

III. OBJETIVOS

III. 1. General

Establecer parámetros cinéticos que orienten el uso racional de danofloxacin en avicultura comercial.

III.2. Específicos

- Describir la disposición temporal de danofloxacin en plasma de pollos parrilleros tras la aplicación oral.
- Proponer un plazo de espera para tejidos comestibles en pollos parrilleros.
- Poner a punto una técnica de HPLC para determinar danofloxacin en plasma de aves comerciales



IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

IV.1. Terapéutica antimicrobiana en avicultura

El descubrimiento de los antibióticos, su modo de acción, y su aplicación al control de las enfermedades del ganado acompañó el desarrollo de la industria avícola desde el fin de la Segunda Guerra Mundial, desde entonces, los antimicrobianos desempeñaron un importante rol en el crecimiento exitoso de la industria a través del control de las enfermedades infecciosas y la promoción de una producción eficiente (Lister, 2011).

El objetivo terapéutico consiste en controlar ó erradicar el agente infeccioso, sin provocar efectos nocivos en el huésped. En consecuencia, la susceptibilidad del microorganismo patógeno al agente es crucial; sin embargo deben contemplarse las características cinéticas del fármaco seleccionado por cuanto es necesario conseguir niveles suficientes en el tejido afectado (Baggot, 2007; Walker & Giguère, 2007; Page & Gautier, 2012).

La disposición tisular es importante no sólo desde el punto de vista terapéutico por cuanto diferentes respuestas interespecificas pueden atribuirse a variaciones en su absorción, distribución, biotransformación y excreción (Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010; Toutain et al., 2010; Bhavsar & Thaker, 2012; Jerzsele, 2012) y además porque la disposición se asocia con la posibilidad de generar residuos del antimicrobiano en los tejidos comestibles (Lozano & Trujillo, 2012).

Las características de disposición son estudiadas por la farmacocinética, una rama de la farmacología que evalúa la evolución temporal de los niveles del fármaco en el organismo mediante estudios realizados sobre un grupo homogéneo de animales sanos quienes reciben una dosis única por una ó más vías y a partir de la aplicación se colectan muestras de sangre en diferentes tiempos en las cuales se cuantifica el fármaco en estudio (Sharma & Coulombe, 1996; Brown, 2003; Bhavsar & Thaker, 2012).

Con el propósito de prever el curso temporal de las concentraciones plasmáticas, establecer su disposición en organismo y diseñar así una pauta lógica de administración, es necesario no sólo interpretar el conjunto de procesos involucrados en la disposición de fármacos sino explicarlos mediante

parámetros utilizados en la farmacocinética clínica (Sharma & Coulombe, 1996; Brown, 2003).

El destino del fármaco en el organismo es establecido por un conjunto de procesos simultáneos denominados absorción, distribución, metabolismo y eliminación, determinantes de una curva de concentración plasmática versus tiempo denominada **ABC** ó área bajo la curva; $ABC_{0-\infty}$ = de 0 a infinito, que difiere según el fármaco se aplique intravascular ó extravascular (Brown, 2003; Bhavsar & Thaker, 2012; Jerzsele, 2012).

El ABC, es un parámetro útil para calcular otros parámetros farmacocinéticos como el clearance total, el volumen de distribución y el tiempo medio de residencia y también para realizar cálculos de biodisponibilidad.

La absorción implica el ingreso del fármaco en el organismo que comprende también la liberación de su forma farmacéutica, disolución y absorción propiamente dicha (Lozano & Trujillo, 2012).

El proceso de absorción es influenciado cuanti-cualitativamente por la concentración del fármaco, el pH, sus características físico-químicas, el área de la superficie absorbente y la irrigación del sitio de administración, etc. (Botsoglou & Fletouris, 2001; Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010; Jerzsele, 2012).

Cuando se procuran acciones sistémicas por aplicación no intravenosa, es requisito la absorción del fármaco luego que se libere de la formulación farmacéutica, en éste caso la absorción se expresa en función de los parámetros **F** o fracción absorbible o biodisponibilidad, **C_{máx}** y **T_{máx}**.

La velocidad de absorción se estima a través de la concentración máxima de la droga alcanzada en la sangre ó **C_{máx}** y el tiempo en que ello ocurre ó **T_{máx}** (Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010). Estos parámetros no reflejan las características de absorción de un fármaco, aunque revelan su capacidad para acceder a la circulación sistémica (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004 c).

Las concentraciones plasmáticas y los tiempos a que éstas se logran resultan del equilibrio dinámico establecido entre los diferentes procesos cinéticos que regulan la disposición del fármaco en el organismo. Toutain & Bousquet-Mélou (2004 c), afirman que la magnitud de la **C_{máx}** depende de la

dosis aplicada y de la relación entre las constantes de velocidad de absorción (**K_a**) y de eliminación (**K_{el}**).

La biodisponibilidad (F) de un fármaco es una medida de la cantidad y de la velocidad con que éste alcanza inalterado la circulación sistémica. Representa una estimación de la cantidad de fármaco que puede estar disponible en el sitio de acción y suele ser diferente según la vía de administración y difiere según la especie animal, sobre todo cuando se utiliza la vía oral (Brown, 2003; Toutain et al., 2010; Jerzsele, 2012).

La biodisponibilidad relaciona los valores establecidos de ABC extravascular versus los obtenidos de ABC intravascular en un determinado periodo de tiempo. Por la vía intravenosa, la biodisponibilidad es completa y el valor de F es 100 %, debido que se evita el proceso de absorción y el fármaco accede directamente a la circulación general, en tanto para una vía extravascular puede situarse entre 0 y 100.

El valor obtenido de F para un determinado fármaco no sólo depende de la absorción sino también de los eventos que disminuyen su exposición sistémica, inclusive el metabolismo presistémico (Brown, 2003; Baggot, 2007; Toutain et al., 2010; Jerzsele, 2012).

Mediante la administración intravenosa de un fármaco se consigue la concentración máxima en sangre (**C₀**) de inmediato. Luego, la concentración decrece en dos fases diferentes: la primera, inicial, caracterizada por un descenso rápido, denominada fase de distribución (α), en la cual, a medida que descienden los niveles séricos éstos se incrementan en los tejidos hasta que se logra la fase de equilibrio ó fase de eliminación (β) (Sharma & Coulombe, 1996; Baggot, 2007; Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010).

Durante la fase de eliminación las concentraciones plasmáticas y tisulares descienden de modo paralelo. Los niveles plasmáticos del fármaco en la fase de eliminación, constituyen un índice valioso de las concentraciones tisulares, y una orientación terapéutica (Jerzsele, 2012).

La distribución es el proceso mediante el cual el fármaco se incorpora desde la circulación sanguínea a los diferentes tejidos, inclusive el sitio blanco ó biofase, donde ejerce su acción.

La transferencia del fármaco se produce por procesos a favor de gradiente y es determinada por las propiedades fisicoquímicas del fármaco tales como el peso molecular, el coeficiente de partición, el pKa y por la afinidad hacia proteínas plasmáticas y tisulares, debido que sólo la fracción que permanece libre en el plasma posee capacidad para difundir a los espacios extravasculares (Botsoglou & Fletouris, 2001; Brown, 2003; Lees et al., 2008; Jerzsele, 2012).

Los antimicrobianos utilizados en la terapéutica son ácidos ó bases débiles, que en solución a pH fisiológico se encuentran en forma ionizada ó no ionizada. Las moléculas ionizadas son poco liposolubles y ofrecen dificultades para atravesar membranas celulares, limitando su distribución al fluido extracelular, en cambio las no ionizadas son más lipofílicas y difunden pasivamente a través de las membranas celulares, hasta obtener un equilibrio dinámico de concentraciones (Botsoglou & Fletouris, 2001; Baggot 2007; Lees et al., 2008; Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010).

La proporción de fármaco ionizado-no ionizado, sujeto a la constante de disociación del fármaco (pK_a), difiere según el pH del medio que se encuentra la molécula. En consecuencia, el gradiente de pH entre el plasma y los tejidos determina en gran medida las concentraciones tisulares del fármaco (Botsoglou & Fletouris, 2001; Brown, 2003; Baggot, 2007; Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010).

Los ácidos débiles, en gran medida ionizados en la sangre (pH= 7.4), difunden poco a los tejidos, en cambio, la relación previsible para las bases débiles supera la unidad, siempre que tenga carácter liposoluble, de modo que los fármacos básicos suelen lograr niveles tisulares varias veces superiores a las séricos (Brown, 2003; Baggot, 2007; Lees et al., 2008; Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010).

La farmacocinética implica la construcción de modelos que representan un sistema de compartimientos en el organismo, que puede estar representado por un grupo de tejidos con características fisiológicas y fisicoquímicas similares, tales como flujo sanguíneo, afinidad por fármacos, etc, en los cuales se presume la distribución uniforme del fármaco (Sharma & Coulombe, 1996; Brown, 2003).

La cantidad de compartimentos varía según la naturaleza del fármaco. Cuando éste no tiene afinidad por ningún elemento orgánico y se distribuye por toda el agua corporal, se trata de un modelo de distribución monocompartimental. En cambio, si no se distribuye instantáneamente ó lo hace de modo heterogéneo, se tratará de un modelo multicompartmental (Sharma & Coulombe, 1996; Brown, 2003; Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010).

La distribución se cuantifica por el parámetro volumen de distribución ó Vd. En general, el Vd no tiene un significado fisiológico, es irreal, y se define como el volumen teórico que ocuparía un fármaco, si la concentración alcanzada en todo el organismo fuese igual a la existente en la sangre.

El Vd otorga sólo una estimación sobre el grado de distribución, pero no revela el patrón de distribución que sólo se puede describir cuantificándolo en distintos órganos. (Brown, 2003; Toutain & Bousquet-Melou, 2004 b; Baggot, 2007; Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010).

El metabolismo ó biotransformación comprende los cambios bioquímicos verificados en el organismo mediante los cuales las sustancias extrañas se convierten en otras más ionizadas, más polares, más hidrosolubles, menos difusibles y más fácilmente eliminables respecto a la sustancia original (Brown, 2003; Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010; Jerzsele, 2012).

La biotransformación de fármacos acontece en dos fases, habitualmente secuenciales. La Fase I comprende reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y descarboxilación que generalmente tienden a inactivar ó restarle actividad biológica al fármaco aunque a veces sucede lo opuesto y el metabolito es más activo que su precursor, mientras las reacciones de Fase II procuran incrementar la polaridad de modo de promover su eliminación, implican reacciones de síntesis ó conjugación (Aerts, 1995; Botsoglou & Fletouris, 2001; Jerzsele, 2012; Lozano & Trujillo, 2012).

Las reacciones son consumadas por el sistema microsomal, las mitocondrias, enzimas solubles en citosol, lisosomas y flora intestinal. La mayoría de los fármacos se metabolizan en el hígado debido al gran tamaño

del órgano, a su elevado riego sanguíneo y por la gran cantidad de enzimas metabolizadoras (Jerzsele, 2012).

La eliminación de los fármacos sucede principalmente en el riñón y en el hígado. En general, una sustancia polar e hidrosoluble se elimina más fácilmente, en cambio, las liposolubles exhiben mayor persistencia en el organismo (Lozano & Trujillo, 2012).

La intensidad con que un fármaco se une a las proteínas del plasma también influye en la fracción que puede ser extraída por el órgano u órganos de eliminación, ya que sólo la fracción se puede depurar. La interacción fármaco-proteína disminuye la difusión, retarda la eliminación, y prolonga el efecto biológico (Botsoglou & Fletouris, 2001; Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010; Jerzsele, 2012).

En el riñón la eliminación está determinada por la filtración, la secreción y la reabsorción. En el túbulo renal son secretados diversos fármacos por sistemas de transporte de ácidos orgánicos. El clearance ó CL, es el parámetro que indica el volumen de sangre ó plasma que es depurado de una sustancia por unidad de tiempo.

Esta relación permanece constante para cada fármaco y expresa el volumen de plasma depurado del mismo por unidad de tiempo (Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010). Este parámetro evalúa la eliminación, si bien no explicita el tiempo que requiere un fármaco para eliminarse del organismo ni el modo de eliminación (Brown, 2003; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004 a).

El parámetro denominado semi-vida de eliminación ó vida media biológica ó $t_{1/2\beta}$, refiere al tiempo requerido para que la máxima concentración plasmática ($C_{m\acute{a}x}$) de un fármaco decline a la mitad. El $t_{1/2\beta}$ se expresa en minutos ú horas, es constante para la mayoría de los fármacos y depende del grado de depuración o aclaramiento plasmático, y del volumen de distribución (Sharma & Coulombe, 1996).

El $t_{1/2\beta}$ brinda una idea de su permanencia en el organismo y sustenta la identificación del intervalo de dosis: su valor multiplicado por 10 estima el tiempo en que se elimina del organismo el 99.99% del fármaco y además, el $t_{1/2\beta}$ ofrece una aproximación del tiempo de eliminación de residuos. Según

Sumano López & Gutiérrez Olvera (2010), se requieren de $20 t\frac{1}{2}\beta$ para calcular el tiempo mínimo de retiro de un medicamento.

El tiempo medio de residencia (**TMR**), representa el tiempo medio en que las moléculas de un fármaco residen en el organismo tras la administración de una dosis única. Este parámetro es la analogía del momento estadístico de la vida media y puede variar según la vía de administración (Baggot, 2007).

El cálculo del TMR se fundamenta en las áreas totales debajo de las curvas de concentración (ABC), las cuales son estimadas mediante la integración numérica empleando la regla trapezoidal, desde el tiempo cero hasta la última concentración medida, con extrapolación al tiempo infinito.

El conjunto de procesos descritos intentan explicar la concentración de un fármaco en su lugar de acción, de la cual dependen sus efectos terapéuticos (Sharma & Coulombe, 1996; Brown, 2003). Debido que éste sitio ó tejido, no es de fácil acceso, suelen estimarse niveles del fármaco en el suero o plasma versus tiempo, puesto que éstos fluidos se encuentran en contacto directo con los receptores y, en consecuencia cualquier modificación de los niveles plasmáticos redundará en el efecto farmacológico (Brown, 2003; Lashev et al., 2009; Reyes Herrera et al., 2011), aunque no siempre se percibe una correlación lineal entre ambas concentraciones (Beltrán, 2004).

Los valores de los distintos parámetros farmacocinéticos exhiben alta variabilidad individual y son afectados por factores fisiopatológicos tales como enfermedades, la edad, el sexo, el estado nutricional de los animales (Lashev et al., 2009; Page & Gautier, 2012), como alternativa se utilizan estudios cinéticos poblacionales con la finalidad de moderar la influencia de las variables mencionadas y obtener información confiable (Martín-Giménez & Riviere, 1998; San Andrés Larrea & Boggio, 2007; Lees et al., 2008; Toutain et al., 2010; Page & Gautier, 2012).

El resultado práctico de los estudios cinéticos es la obtención de modelos matemáticos que describen el curso temporal de la concentración de fármacos en el organismo animal, con cualquier régimen de dosificación y permiten estimar la posible acumulación del fármaco ó sus metabolitos, correlacionar concentraciones de fármaco con el efecto farmacológico ó toxicológico, evaluar la biodisponibilidad, describir el efecto de los cambios

fisiológicos ó patológicos en la absorción, distribución y eliminación de los fármacos y explicar interacciones entre fármacos e inclusive, resultan útiles para estimar el período de resguardo para animales destinados al consumo (Kinabo & McKellar, 1989; Brown, 2003; Sumano López & Gutiérrez Olvera, 2010).

Los modelos se conciben mediante términos matemáticos que expresan relaciones cuantitativas. Para simular los procesos de absorción, distribución y eliminación se utilizan diferentes modelos matemáticos, a partir de los cuales se desarrollan las ecuaciones que describen la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas del fármaco.

La cantidad de parámetros requeridos para describir un modelo depende de la complejidad de los procesos implicados y de la vía de administración, puesto que los parámetros no se determinan experimentalmente sino a partir de pares de datos de concentración (variable dependiente) y tiempo (variable independiente), la limitación en el número de datos disponibles es importante para estimar los parámetros farmacocinéticos.

La descripción de las curvas de concentración *versus* tiempo, se puede realizar mediante modelos compartimentales o no compartimentales. En los primeros, un modelo monocompartimental, el organismo animal se considera como si fuera solo un compartimiento, es decir, que el fármaco que ingresa en la circulación general se distribuye y elimina simultáneamente (Sharma & Coulombe, 1996; Brown, 2003).

En un modelo bicompartimental, se produce una distribución rápida del fármaco seguida de un punto de pseudoequilibrio y luego una pendiente de eliminación. También podría resultar que una distribución rápida se continúe con una pendiente con menos caída, señalando una distribución lenta a tejidos menos irrigados y profundos, y por último se observa la pendiente de eliminación, tratándose en este último caso de un comportamiento farmacocinético que podría ser interpretado a través de un modelo tricompartmental (Sharma & Coulombe, 1996; Brown, 2003).

El organismo en sí se comporta como multicompartimental, más de los que arriba se describen, por lo tanto en la actualidad se tiende a la aplicación de

modelos no compartimentales, entregando con ellos parámetros cinéticos robustos de utilidad clínica (Kinabo & Mc Kellar, 1989; Brown, 2003).

La ventaja de utilizar modelos no compartimentales para estimar parámetros farmacocinéticos robustos, como el tiempo medio de residencia (MRT), la depuración sistémica (Cl), el volumen de distribución (Vd) y la disponibilidad sistémica (F), reside en que pueden aplicarse a cualquier vía de administración y no requiere la selección de un modelo compartimental.

El único requisito para aplicar un modelo no compartimental es que la absorción y disposición del fármaco cumplan una farmacocinética de primer orden (Baggot, 2007), de todos modos la elección del modelo dependerá del propósito del estudio, propiedades fisico-químicas del fármaco que se estudia, especificidad y sensibilidad del método analítico utilizado y de la especie estudiada (Kinabo & Mc Kellar, 1989).

Los datos requeridos para efectuar el análisis farmacocinético y obtener los parámetros respectivos, son valores de concentraciones sanguíneas del analito en estudio y los respectivos tiempos en que fueron tomadas las muestras de sangre del animal.

En la actualidad existen programas informáticos que permiten graficar los datos en curvas y estiman los parámetros cinéticos mediante fórmulas preestablecidas. En el presente trabajo de tesis, se utiliza un programa cinético no comparimental (Farrier, 1999).

Con los datos de concentraciones versus tiempo, el programa construye una curva semilogarítmica (log) de los valores transformados de concentración plasmática versus tiempo, donde es posible observar las pendientes que representan los distintos procesos.

Un fármaco administrado por vía intravenosa, puede presentar una o dos pendientes. Presenta una pendiente ó es monoexponencial cuando predomina la eliminación, y dos pendientes o biexponencial cuando es posible distinguir una fase previa de distribución, mientras que si la administración es extravascular, está presente también la pendiente de absorción (Sharma & Coulombe, 1996).

El objetivo siguiente es determinar cuál es la curva teórica, modelo o función que mejor interpreta los datos experimentales, que tenga valor predictivo, con el mínimo error.

El operador del programa elige cuántas y qué pendientes va a utilizar y decidir los puntos de corte, es decir los tiempos entre los cuales considera que se verifica el proceso en estudio. Esto significa "a priori" estar definiendo cuál sería la mejor función logarítmica.

A continuación se realizan cálculos de regresión no lineal de los logaritmos de concentración versus tiempo, comenzando por la fase de eliminación y siguiendo según el caso, por la de distribución y/o la de absorción. Estos cálculos efectuados por el programa, permiten determinar los interceptos y las diferentes constantes, y además el valor de los coeficientes de regresión y de determinación (r^2), que contribuye a elegir los mejores puntos de corte.

Con los valores de interceptos y constantes, el programa calcula valores teóricos de concentración para cada tiempo graficando una curva "teórica", según la función logarítmica seleccionada. Estos valores se contrastan con los valores observados mediante la suma de los cuadrados mínimos, lo que permite discriminar si la curva calculada es confiable.

Utilizando los valores de área bajo la curva (ABC), la constante de velocidad de eliminación (β) y la dosis empleada, el programa calcula el volumen de distribución (Vd), el clearance total (Cl tot), y la vida media de eliminación ($t\beta^{1/2}$), mediante las fórmulas cinéticas clásicas. Otros parámetros que determina son el área bajo la curva del primer momento estadístico ó ABCM y el tiempo de residencia medio ó TMR (Sharma & Coulombe, 1996; Baggot, 2007).

El método de análisis modelo-independiente, se aplica sólo si el comportamiento cinético de la fase de eliminación es de primer orden, lo cual significa que una fracción constante de la droga se elimina por unidad de tiempo. En este caso la velocidad del proceso de eliminación es proporcional a la concentración del fármaco en el organismo, lo que puede evidenciarse en la curva semilogarítmica por la linealidad de la fase de eliminación y el elevado coeficiente de determinación (> 0.9). Afortunadamente la mayoría de los fármacos exhiben este comportamiento aplicados a las dosis terapéuticas convencionales, lo que hace muy versátil a éste tipo de programa.

IV.2. Fluoroquinolonas

Son antimicrobianos sintéticos desarrollados en la década de los 60', mediante la síntesis del ácido nalidíxico ó ácido 1-etil-1,4-dihidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridina-3- carboxílico (Cué Brugueras et al., 2005; Martínez et al., 2006 b; Fábrega et al., 2008).

Las primeras quinolonas sintetizadas ofrecían un estrecho margen de actividad antimicrobiana, escasa biodisponibilidad oral, distribución limitada en el organismo y alta capacidad para inducir resistencia bacteriana. El uso clínico se reducía al tratamiento de infecciones provocadas por bacterias gramnegativas en el tracto urinario (Cué Brugueras et al., 2005; Walker & Dowling, 2007; Bhavsar & Thaker, 2012).

Mas tarde, la incorporación posterior de flúor, y otras modificaciones estructurales realizadas en la estructura básica de la molécula, tales como la sustitución del grupo CH por N en posición 8 y el agregado de un anillo de piperazina en posición 7, permitió extender el espectro frente a bacterias gramnegativas, inclusive abarca especies de *Pseudomonas*, dieron origen a las fluoroquinolonas actuales (Martínez et al., 2006 b; Fábrega et al., 2008; Sharma et al., 2009).

La fluoración de la molécula en C₈ brinda estabilidad metabólica, restringe el ritmo de eliminación e incrementa la actividad biológica, en tanto el agregado de un segundo átomo de flúor en la misma posición redundaba en progresos en el perfil farmacocinético (Cué Brugueras et al., 2005; Martínez et al., 2006 b; Fábrega et al., 2008). El nitrógeno de la posición N₁ y el ácido carboxílico en el C₃ son indispensables para desarrollar la actividad antibacteriana (Fábrega et al., 2008; Sharma et al., 2009).

Los cambios estructurales introducidos modificaron las aplicaciones clínicas, y además derivaron en mayor potencia antibacteriana y mejoras farmacocinéticas, especialmente en lo referente a su liposolubilidad.

Con el transcurso del tiempo, se establecieron tres generaciones de fluoroquinolonas; la primera representada por los ácidos nalidíxico y oxonílico, la segunda que comprende a ciprofloxacina, norfloxacina y danofloxacina, entre otros y la tercera generación, que incluye a moxifloxacina y levofloxacina, etc.,

éstas reservadas para uso clínico en medicina humana (Scholar, 2002; Cué Brugueras et al., 2005).

Son moléculas de bajo peso molecular, ubicado entre 300-500 daltons, muchas de las cuales son zwitteriones, con diferentes grados de solubilidad, de acuerdo al pH; en general, son poco solubles en medio ácido; mientras a pH 7.4 son isoelectrónicas y exhiben mínima solubilidad en agua. Son compuestos termoestables en las formas farmacéuticas orales y parenterales, sensibles a la luz (Brown, 1996; Bhavsar & Thaker, 2012).

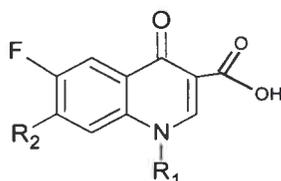


Figura 1: fórmula estructural de las fluoroquinolonas

Las quinolonas de primera generación exhiben un espectro de acción muy limitado, actuando sólo contra algunas bacterias gram negativas, aunque conforme avanzan las generaciones incluyen también patógenos gram positivos y bacterias intracelulares de difícil erradicación por otros antibacterianos (Fábrega et al., 2008).

El cromosoma bacteriano comprende una doble cadena de ADN de doble hélice que es una molécula continua miles de veces más extensa que la célula bacteriana (Cué Brugueras et al., 2005; Fábrega et al., 2008). Las fluoroquinolonas ingresan a través del canal acuoso de las porinas e inhiben la enzima ADN girasa ó topoisomerasa de tipo II, integrada por 4 subunidades cuya función es controlar el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN bacteriano.

El superenrollamiento permite a la extensa molécula de ADN empaquetarse dentro de la bacteria. Esta estructura debe ser desenrollada para permitir diferentes funciones como replicación, transcripción y reparación del ADN. La inhibición de las enzimas impide a la célula bacteriana producir las proteínas necesarias para su reparación, crecimiento y reproducción, que conduce a la muerte de la célula (Fábrega et al., 2008; Sharma et al., 2009).

Las fluoroquinolonas actúan a nivel de ADN-girasa, también denominada topoisomerasa tipo II, y de la topoisomerasa tipo IV, sin afectar las

topoisomerasas I y III (Cué Brugueras et al., 2005; Fábrega et al., 2008; Sharma et al., 2009).

La compleja interacción con las topoisomerasas condiciona el espectro antibacteriano dentro del grupo y también de la selección de cepas resistentes. La actividad frente a las bacterias grampositivas se debe a su acción "blanco" en las topoisomerasas IV, en cambio la actividad sobre gram negativas es consecuencia del bloqueo de la ADN-girasa (Cué Brugueras et al., 2005; Fábrega et al., 2008).

La resistencia a estas sustancias puede expresarse por tres mecanismos que en importancia creciente son: reducción de la permeabilidad, activación de una bomba de flujo del fármaco hacia el exterior de la bacteria y mutación de la enzima ADN girasa o topoisomerasa IV (Cué Brugueras et al., 2005; Fábrega et al., 2008).

La selección de mutantes resistentes mediante los dos primeros mecanismos, en general equivale a un incremento de 2 a 8 veces la CIM ó concentración inhibitoria mínima, mientras que la alteración del receptor de la ADN-girasa puede inducir resistencia de mayor nivel.

La resistencia a una fluoroquinolona con frecuencia extiende la resistencia a todas las demás (Bhanot et al., 2001; Paige & Tollefson, 2003) y ciertas mutaciones que confieren resistencia mediante alteraciones en la activación en la bomba de flujo, también pueden extenderlas a las cefalosporinas y tetraciclinas (Cué Brugueras et al., 2005).

IV.2.1. Farmacocinética

El perfil farmacocinético común a éstos agentes contempla diversos aspectos. La absorción oral es variable según el análogo considerado; en general es rápida y se generan niveles séricos y tisulares que exceden la CIM para la mayoría de las bacterias sensibles (Sharma et al., 2009; Bhavsar & Thaker, 2012; Gupta et al., 2012).

En humanos se informaron valores de biodisponibilidad oral de 80 al 100%, excepto para norfloxacin y ciprofloxacina (Cué Brugueras et al., 2005); la $C_{m\acute{a}x}$ se obtuvo en 1 a 3 horas (Cué Brugueras et al., 2005) y en animales domésticos se situó entre 2 a 5 horas, según la especie animal, con una

biodisponibilidad cercana al 80% en monogástricos y bovinos pre-rumiantes (Brown, 1996).

La distribución y difusión tisular es elevada, penetran bien a todos los tejidos y fluidos corporales; los niveles alcanzados en los tejidos son comparativamente superiores a los plasmáticos (Brown, 1996; Bhavsar & Thaker, 2012; Gupta et al., 2012).

Los valores de Vd reportados son >1 L/Kg, acorde a la reducida afinidad por las proteínas plasmáticas, que oscila en alrededor de 10 al 30 % (Brown, 1996; Gupta et al., 2012), y además porque sus puntos isoeléctricos se encuentran en un rango de 6.8 a 7.4, lo que indica mínima disociación en el plasma, aspecto que facilita su pasaje extravascular y explica su elevada difusión a tejidos (Brown, 1996; Bhavsar & Thaker, 2012; Gupta et al., 2012).

Estos agentes experimentan biotransformación en grado variable según el análogo. Los sitios metabólicamente inestables en la molécula en orden de importancia son el anillo piperazínico y el grupo carboxílico. En las quinolonas N-metiladas, el anillo piperazínico puede experimentar N-oxidación ó N-demetilación; en tanto en las no N-metiladas, se verifica una 3-oxometabolización (Brown, 1996; Sharma et al., 2009; Gupta et al., 2012)

Otras vías metabólicas de menor importancia son la N-acetilación, N-sulfato conjugación, ruptura del anillo piperazínico y la N-formilación. Se ha reportado la síntesis y actividad antimicrobiana de análogos 3-formil de norfloxacin, ciprofloxacina y pefloxacina, estos estudios han demostrado evidencias definitivas que este tipo de análogos se comportan como profármacos que muestran biodisponibilidad elevada y que se oxidan *in vivo* a ácidos carboxílicos (Brown, 1996).

Se excretan por vía urinaria, la más importante, tanto en el hombre como en las distintas especies animales estudiadas y por vía biliar y por heces, en forma inalterada ó parcialmente como metabolitos. Algunas fluoroquinolonas sufren circulación enterohepática, probablemente tras la conjugación de betaglucuronidasa sobre los conjugados.

Las concentraciones urinarias de las fluoroquinolonas se mantienen altas durante 24 horas o más. Algunos compuestos son secretados en el túbulo proximal renal mediante el sistema transportador de ácidos orgánicos. La vida

media de estos compuestos está en el intervalo 2-7 horas, dependiendo del compuesto y la especie (Bhavsar & Thaker, 2012; Gupta et al., 2012).

Las fluoroquinolonas exhiben cinética de muerte celular concentración dependiente (Brown, 1996; Cué Brugueras et al., 2005; Gupta et al., 2012). Diversos estudios clínicos *in vitro* señalan la relevancia de parámetros dosis dependientes tales como la $C_{máx}$ y el ABC respecto a la concentración inhibitoria mínima (CIM_{90}) de microorganismos susceptibles.

El cociente $C_{máx}/CIM_{90} >8$ reduce la manifestación de resistencia bacteriana mientras la relación $ABC/CIM_{90} >125$ es indispensable para conseguir la erradicación bacteriana y prevenir el crecimiento de microorganismos durante 24 horas; éstos parámetros constituyen predictores de eficacia clínico-microbiológica (Brown, 1996; Walker & Dowling, 2007; Gupta et al., 2012).

IV.2.2. Reacciones adversas

En general, estas sustancias exhiben amplio margen de seguridad en mamíferos y aves, posiblemente debido que en los mamíferos, existe una enzima similar a la ADN girasa que interviene en los cortes dobles del ADN; sin embargo, ésta no superenrolla el ARN y no resulta afectada por las fluoroquinolonas (Cué Brugueras et al., 2005).

Un inusual pero característico efecto es la acción erosiva sobre los cartílagos en crecimiento. Esta artropatía afecta especialmente a las articulaciones que soportan peso, aunque esta característica sólo está documentada en cánidos, por este motivo no se administran en individuos inmaduros ó gestantes. En otras especies se han descrito reacciones adversas como mareos, cefaleas, náuseas y vómitos (Cué Brugueras et al., 2005; Walker & Dowling, 2007; Gupta et al., 2012).

IV.2.3. Antecedentes en aves

En la actualidad, los antimicrobianos utilizados con mayor frecuencia en aves de corral son las tetraciclinas, las sulfonamidas potenciadas y las fluoroquinolonas. Actualmente, en los países europeos en los cuales su uso en animales de producción está permitido las fluoroquinolonas son los de mayor

consumo, recomendados en el tratamiento y profilaxis de las enfermedades entéricas y respiratorias de las aves, sobre todo los integrantes de la segunda generación (Anjum & Rizvi, 1998; Avrain et al., 2003; Löhren et al., 2008).

Enrofloxacin, es el fármaco más efectivo y aplicado en aves (Glisson et al., 2004), con menos intensidad se emplean ciprofloxacina -principal metabolito de enrofloxacin- además de norfloxacina, sarafloxacina, difloxacina, danofloxacina, y marbofloxacina (Brown, 1996; Lees & Shojaee Aliabadi, 2002 a). Similar a lo que acontece en los mamíferos, el empleo de cada integrante del grupo difiere según el país (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001).

Las propiedades farmacológicas del grupo, demostradas en humanos (Sharma, et al., 2009) y animales domésticos (Brown, 1996; Gupta et al., 2012), alientan el empleo clínico en avicultura, facilitada por sus características físico-químicas: son estables en soluciones acuosas (Jenkins & Friedlander, 1988; Brown, 1996), por lo tanto es factible la aplicación en el agua de bebida, modo corriente de administración de medicamentos en los criaderos comerciales (Vermeulen et al., 2002; De Backer, 2006; Toutain et al., 2010).

La aplicación en el agua de bebida es poco estresante, permite el tratamiento de gran cantidad de aves en poco tiempo (Anadón et al., 2009) y ventajosa, debido que el animal enfermo suele no alimentarse pero continúa el consumo de agua (Vermeulen, 2002; Löhren et al., 2008, Toutain et al., 2010).

Los antecedentes disponibles indican que luego de la administración por vía oral el conjunto de fluoroquinolonas experimenta rápida absorción (Anadón et al., 1993; Anjum & Rizvi, 1998; Gupta et al., 2012).

Norfloxacina, exhibe un tiempo medio de absorción de 0.9 horas (Laczay et al., 1998), enrofloxacin de 1.4 horas (Anadón et al., 1995; Knoll et al., 1999) y marbofloxacina de 4.2 horas (Anadón et al., 2002).

La cantidad de fármaco que accede a la circulación general difiere según el compuesto (Anadón et al., 1993; Chen et al., 1994; Gupta et al., 2012). Los antecedentes cinéticos disponibles revelan que la absorción oral en pollos de difloxacina, norfloxacina y marbofloxacina excedió ligeramente el 50% (Anadón et al., 1992; Anadón et al., 2002; Ding et al., 2008); flumequine alcanzó el 57% (Martínez et al., 2006 a), mientras que enrofloxacin osciló entre el 64 y 89% (Anadón et al., 1995; Bugyei et al., 1999; Knoll et al., 1999), similar a lo

informado con ciprofloxacina (Anadón et al., 2001). En cambio, la absorción fue completa con ofloxacina (Kalaiselvi et al., 2006) y levofloxacina (Errecalde, 2010).

En algunos casos, la absorción oral de fluoroquinolonas puede ser afectada por la presencia de cationes bivalentes presentes en el alimento (Lees & Shojaee AliAbadi, 2002a; Hofacre, 2007; Gupta et al., 2012).

La $C_{m\acute{a}x}$ provista por estas sustancias, resulta dosis dependiente: los valores menos significativos correspondieron a 1.05 $\mu\text{g/ml}$ aplicando 2 mg/kg de marbofloxacina (Anadón et al., 2002) y 2.6 $\mu\text{g/ml}$ conseguidos tras la administración de 8 mg/kg de ciprofloxacina (Anadón et al., 2001).

Enrofloxacina, luego de aplicar 10 mg/kg, produjo una $C_{m\acute{a}x}$ de 2.4 $\mu\text{g/ml}$ (Anadón et al., 1995). El valor más importante reportado correspondió a 3.6 $\mu\text{g/ml}$, provisto con ofloxacina (Kalaiselvi et al., 2006) y por flumequine (Martínez et al., 2006 a), administrando 10 y 12 mg/kg, respectivamente.

Luego de la aplicación oral de 5 mg/kg de levofloxacina, la curva disposición plasmática generó áreas bajo la curva (ABC) levofloxacina de 13.2 $\mu\text{g-h/ml}$ (Errecalde, 2010) y con 8 mg/kg de ciprofloxacina de 12.2 $\mu\text{g-h/ml}$ (Anadón et al., 2001).

Aplicando 10 mg/kg, los valores del ABC oscilaron entre 5.1 $\mu\text{g-h/ml}$ con sarafloxacina (Ding et al., 2001), 10.4-12.6 $\mu\text{g-h/ml}$ con norfloxacina (Anadón et al., 1992; Laczay et al., 1998), 14.4-22.2 $\mu\text{g-h/ml}$ con enrofloxacina (Anadón et al., 1995; Knoll et al., 1999), 15.8 $\mu\text{g-h/ml}$ con difloxacina (Ding et al., 2008) y 40 $\mu\text{g-h/ml}$, con ofloxacina (Kalaiselvi et al., 2006).

La permanencia plasmática de fluoroquinolonas en pollos es moderada (Anadón et al., 1993). Se comunicaron valores de $t_{1/2\beta}$ de 3.8 horas con sarafloxacina (Ding et al., 2001), 5.8 horas con enrofloxacina (Knoll et al., 1999), ofloxacina (Kalaiselvi et al., 2006) y levofloxacina (Errecalde, 2010), 8.6 horas con marbofloxacina (Anadón et al., 2002) y difloxacina (Ding et al., 2008), 10 horas con flumequine (Martínez et al., 2006 a) y 11.8 horas con norfloxacina (Laczay et al., 1998) y ciprofloxacina (Anadón et al., 2001).

Knoll et al. (1999), comunicaron un TMR de 7.5 horas para enrofloxacina. Otros estudios, indicaron 8.8 horas con norfloxacina (Laczay et al., 1998), 9.1 horas con levofloxacina (Errecalde, 2010), 9.9 horas con

flumequine (Martínez et al., 2006 a) y 13.3 horas con ciprofloxacina (Anadón et al., 2001).

Las fluoroquinolonas se metabolizan en el hígado; el grado de biotransformación depende del compuesto y varía según la especie animal (Haritova & Lashev, 2009). Se producen reacciones de metilación, dietilación y de oxidación, que las transforma en oxoquinolonas, las cuales se someten luego a reacciones de fase 2, consistentes en la conjugación con ácido glucurónico. Los glucuronoconjugados resultantes son excretados en la orina y la bilis (Anjum & Rizvi, 1998; Lees & Shojaee AliAbadi, 2002 a),

Marbofloxacin, en parte es transformada a N-desmethyl marbofloxacin, que presenta características cinéticas similares al compuesto precursor (Anadón et al., 2002). Pefloxacin, deriva en norfloxacina y ésta es convertida a desethylenenorfloxacina y oxonorfloxacina (Anadón et al., 1992) y flumequine es transformado a 7-hidroxi flumequine (Martínez et al., 2006 a).

Luego de la aplicación de dosis únicas orales en aves, todas las quinolonas de segunda generación se determinan en el plasma al menos hasta 24 horas post administración, con frecuencia los valores declinan bruscamente luego de las 12 horas siguientes a la administración producto de la rápida y amplia distribución en el organismo (Anadón et al., 2001; Errecalde, 2010).

Exhiben valores de $V_d > 1.5$ L/kg, que exceden el agua total corporal (Anadón et al., 1993; Lees & Shojaee AliAbadi, 2002 a; Gupta et al., 2012). En pollos, se comunicaron valores de V_d de 1.4 L/kg con ciprofloxacina (el-Gendi et al., 2001) de 2.5 ± 0.2 L/kg con enrofloxacin (Bugyei et al., 1999), 3.3 L/kg con levofloxacin (Errecalde, 2010) y 3.4 ± 1.2 L/kg con sarafloxacin (Ding et al., 2001).

Los niveles tisulares equiparan ó exceden a las plasmáticos, acorde sus propiedades lipofílicas (el-Gendi et al., 2001; Lees & Shojaee AliAbadi, 2002 a; Gupta et al., 2012) aunque también incide la limitada afinidad por las proteínas plasmáticas, estimada para el grupo en animales domésticos en el 15 al 20% (Anadón & Martínez Larrañaga, 1999; Papich & Riviere, 2003; Haritova & Lashev, 2009).

Knoll et al. (1999) y Anadón et al. (2002), hallaron tasas tisulares más elevadas que las plasmáticas, con enrofloxacin. La administración diaria de 5

mg/kg por vía oral de enrofloxacin produjo elevados niveles en los tejidos; en el hígado se obtuvo un cociente tejido/plasma de 5.4 (Knoll et al., 1999).

En pollos parrilleros naturalmente infectados con micoplasmas, la administración oral de 5 mg/kg de enrofloxacin cada 12 horas, determinó importantes niveles en el tejido muscular, que alcanzan el máximo a las 24 horas de concluido el tratamiento, a partir del cual declinan gradualmente hasta las 120 horas, mientras pollos sanos tratados con ciprofloxacina con idéntico esquema terapéutico, los niveles de éste antimicrobiano en el tejido muscular fueron poco relevantes, alcanzando los valores mas significativos a las 72 horas post aplicación (García Ovando et al., 2006).

Aplicando 5 mg/kg de levofloxacina, la comparación de las ABC obtenidas en los tejidos homogeneizados respecto a la ABC plasmática por vía oral, arroja cocientes de 1,43; 1,62; 1,78 y 4,15 en riñón, músculo, pulmón e hígado, respectivamente (Errecalde, 2010).

La disposición tisular de las fluoroquinolonas es significativa desde el enfoque terapéutico, acorde la necesidad de obtener niveles del antimicrobiano que excedan la CIM en el sitio de infección (McKellar et al., 2004; San Andrés Larrea & Boggio, 2007; Lees et al., 2008), pero también la disposición tisular se asocia con la magnitud de los residuos en tejidos comestibles.

Norfloxacina y sus metabolitos, desetileno y oxo norfloxacina, se determinaron tras la administración oral de 8 mg/kg durante 4 días. Los niveles en el tejido adiposo, riñón, e hígado fueron de 0.5 µg/gramo luego de 12 días de aplicación (Anadón et al., 1992).

La declinación plasmática de ciprofloxacina se caracteriza por rápida distribución y lenta eliminación por aplicación oral; es ampliamente distribuida en tejidos, consecuente con el elevado Vd informado, de 7.7 Lt/kg (Anadón et al., 2001).

A los 5 días de la última aplicación, ciprofloxacina se determinó en riñón, hígado, músculo, piel con tejido adiposo, pero no en el plasma. A los 10 días post administración, sólo se hallaron los metabolitos principales en hígado y piel con tejido adiposo (Anadón et al., 2001).

Anadón et al. (1995), sostienen que los niveles de ciprofloxacina en plasma y tejido fueron más importantes que las del precursor, enrofloxacin.

Sin embargo en otros estudios, los valores fueron menores, tal como reportaron Knoll et al. (1999) y García Ovando et al. (2006).

Niveles elevados de marbofloxacin se determinaron en riñón, hígado, músculo y piel, a las 24 horas de la última dosis oral de 2 mg/kg. El principal metabolito N-desmethyl-marbofloxacin sólo fue establecido en hígado y riñón a las 72 horas tras finalizar la aplicación (Anadón et al., 2002).

La eliminación de fluoroquinolonas se realiza por orina y en menor cantidad, por bilis (Anjum & Rizvi, 1998). El CI total ofrece fluctuaciones importantes según el agente (Haritova & Lashev, 2009); en pollos parrilleros se reportaron 1.2 ml/h/kg con sarafloxacin (Ding et al., 2001), 2.8 ml/h/kg con marbofloxacin (Anadón et al., 2002), 3.0 ml/h/kg con enrofloxacin (Bugyei et al., 1999); 4.5 ml/h/kg con ofloxacin (Kalaiselvi et al., 2006), 6.7 ml/h/kg con levofloxacin (Errecalde, 2010), 7.5 ml/h/kg se informaron con ciprofloxacin (Anadón et al., 2001) y 16.6 ml/h/kg con norfloxacin (Laczay et al., 1998).

IV.2.4. Danofloxacin

Danofloxacin, representada en la Figura N° 2, es una fluoroquinolona de origen sintético autorizada sólo para uso exclusivo en Medicina Veterinaria (Giles et al., 1991), que desarrolla acciones antimicrobianas frente a gram negativos, ciertos gram positivos y micoplasmas relevantes en animales domésticos (Shojaee Aliabadi & Lees, 2003).

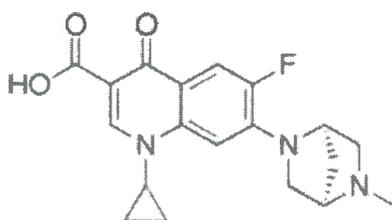


Figura 2: fórmula estructural de danofloxacin

En distintas experiencias realizadas en mamíferos, los antecedentes cinéticos por aplicación parenteral indican pronta absorción y biodisponibilidad superior al 65 % (Atef et al, 2001; Mc Kellar et al., 1998; Richez et al., 1996; Shojaee Aliabadi & Lees, 2003). Genera $C_{m\acute{a}x}$ plasmáticos próximos a 0.3 $\mu\text{g/ml}$ (Mc Kellar et al., 1998; Atef et al, 2001) y significativos volúmenes de

Deplecion de los niveles de danofloxacin en plasma y en tejidos comestibles de pollos parrilleros
Maestrando Qco. Alimentos : LUDY YISED RODRIGEZ TRIANA

distribución (Vd), que oscilan en 1.42 L/kg en caprinos (Atef et al., 2001), 2.7 L/kg en ovinos (McKellar et al., 1998) y 4.3 L/kg en bovinos (Friis, 1993), valores que insinúan notable disposición tisular.

En mamíferos domésticos danofloxacin experimenta moderada permanencia en el organismo (Friis, 1993; Mc Kellar et al., 1998), conforme señala la vida media de eliminación ($t_{1/2\beta}$) que oscila en 1.3 horas en caprinos (Atef et al., 2001), de 2.9 a 7.4 horas en bovinos (Friis, 1993; Shojaee Aliabadi & Lees, 2003), de 3.3 horas en ovinos (Mc Kellar et al., 1998) y de 5.4 a 6.9 horas en porcinos (Richez et al., 1996).

IV.2.4.1 Antecedentes en aves.

En aves, danofloxacin se administra para el tratamiento de patologías producidas por *E. coli* (Charleston et al., 1998), enfermedades respiratorias asociadas con *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *H. somnus* y micoplasmas (Cooper et al., 1993; Burch & Valks, 2002). En presencia de éstos microorganismos, la CIM se estableció en $<0.015 \mu\text{g/ml}$ (Knoll et al., 1999).

El laboratorio fabricante propone la aplicación oral en el agua de bebida mediante polvos solubles en dosis de 5-10 mg/kg/día durante 3 a 5 días (Lynch et al., 1994; Knoll et al., 1999).

En pollos parrilleros, por aplicación oral los antecedentes disponibles señalan que la absorción de danofloxacin es pronta, según el tiempo medio de absorción informado de 0.89 horas (Zhong et al., 2001) a 1.2 horas (Knoll et al., 1999) y casi completa (Lynch et al., 1994; Knoll et al., 1999; El-Gendi et al., 2001, Zhong et al., 2001).

Aplicando dosis orales de 5 mg/kg en pollos sanos, el $C_{\text{máx}}$ reportado osciló entre 0.47 (Knoll et al., 1999) y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (el-Gendi et al., 2001, Zhong et al., 2001; Zeng et al., 2011) y logró el $C_{\text{máx}}$ a las 2.4 horas (El-Gendi et al., 2001; Zeng et al. 2011). La curva de disposición plasmática generó áreas bajo la curva (ABC) de 3.05 (Zhong et al., 2001), 3.5 (Knoll et al., 1999), 5.1 (Lynch et al., 1994) y $7.7 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$ (Zeng et al., 2011).

En pollos, este antimicrobiano es escasamente metabolizado (Lynch et al., 1994) y experimentó valores de vida media plasmática de 6.9 a 8.7 horas (Zhong et al., 2001) y 13.05 horas (Zeng et al., 2011), mientras el TMR

comunicado alcanzó las 8.6 horas (Knoll et al., 1999) y el Vd a 2.11 L/kg (El-Gendi et al., 2001).

El clearance (Cl) informado en pollos fue de 20.5 (Lynch et al., 1994) a 23.5 ml/h/kg a (Knoll et al. (1999) y en pavos de 9.77 ml/h/kg (Haritova et al., 2006).

Knoll et al. (1999), encontraron tasas tisulares más elevadas de danofloxacin que las plasmáticas, inclusive desaparece primero en plasma y luego en tejidos (El-Gendi et al., 2001).

La administración diaria de 5 mg/kg de danofloxacin por vía oral produjo altos niveles en los tejidos: en el hígado arrojó cocientes tejido/plasma de 10.7, respectivamente (Knoll et al., 1999) y de 20.6 ± 2.1 (Zeng et al., 2011), mientras en el músculo la relación fue de 2.5 (Knoll et al., 1999) a 4.1 ± 0.36 (Zeng et al., 2011).

Lynch et al. (1994), sostienen que la disposición de danofloxacin en tejidos fue consistente con la biodisponibilidad oral y sus propiedades cinéticas. Tras la aplicación en el agua de bebida los niveles más significativos se reportaron en el hígado a las 6 horas y declinaron a las 48 horas de suspender la administración.

En riñón y músculo, el descenso de los niveles de danofloxacin fue paralelo a los observados en el hígado aunque 2 a 10 veces menos significativos. El mayor residuo encontrado en éstos tejidos fue danofloxacin, mientras que el principal metabolito, N-demetil, es hallado en el hígado pero es inexistente en la piel y en el tejido adiposo (Lynch et al., 1994).

Zeng et al., (2011), informaron un $C_{m\acute{a}x}$ en músculo e hígado de 2.3 ± 0.38 y 12.6 ± 1.2 µg/gr, respectivamente, conseguidos a las 6 y 3.1 ± 1.6 horas, respectivamente. La vida media de eliminación comunicada fue de 9.7 ± 1.4 horas en el músculo y las 8.7 ± 0.44 horas en el hígado (Zeng et al., (2011).

En patos Muscovy, la administración por vía oral de 5 mg/kg determinó un $C_{m\acute{a}x}$ de 0.81 µg/ml informado a 1.2 horas, los niveles conseguidos decrecen en el siguiente orden hígado-riñón, plasma y músculo (Goudah & Mounair, 2009).

En pavos, luego de la aplicación oral de 6 mg/kg generó un $C_{m\acute{a}x}$ plasmático de 1.1 ± 0.95 µg/ml obtenido a las 2.1 ± 2.5 horas. En este estudio

el ABC fue de 7.7 ± 1.7 $\mu\text{g-h/ml}$ y la biodisponibilidad reportada del 78.7 ± 17.3 %. En esta especie, danofloxacina exhibió moderada permanencia en el organismo, según reflejan el $t_{1/2\beta}$ de 9.7 ± 2.9 horas y el TMR de 15.1 ± 4.3 horas, respectivamente (Haritova et al., 2006).

IV.2.5. Residuos en alimentos de origen animal

Un residuo medicamentoso ó químico es el resultado del empleo de medicamentos ó productos químicos con diferentes propósitos que puede depositarse o almacenarse en células, tejidos u órganos, ya sea como tales ó como sus metabolitos, con impacto negativo en salud pública, en la industrialización del alimento y/o la comercialización internacional (Rao & Malik, 2006; Márquez Lara, 2008; Reeves, 2010).

Los residuos presentes en alimentos de origen animal generan productos de escasa calidad e implican algún riesgo para la salud de los consumidores, pudiendo causar toxicidad aguda ó crónica, efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal ó reacciones alérgicas, etc (Rao & Malik, 2006; Reig & Toldrá; 2009; Reeves, 2010).

En el pasado, el control de los alimentos consistía sólo en el examen de los productos finales y a la inspección de los establecimientos elaboradores. En la actualidad, las modernas tecnologías incorporadas en la producción de alimentos, demanda involucrar de modo integral y multidisciplinario a toda la cadena productiva, desde donde se producen hasta su consumo, debido que muchos de los problemas de inocuidad de los alimentos se originan en la producción primaria (Lozano & Trujillo, 2012), lo que significa que la responsabilidad de proveer alimentos inocuos debe ser compartida desde el proveedor de insumos hasta el consumidor. En este contexto, los medicamentos veterinarios sólo se autorizan en especies de abasto tras la evaluación de residuos (Paige & Tolleftson, 2003; Márquez Lara, 2008).

Diversos organismos oficiales como la Federal Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, la European Medicine Evaluation Agency (EMA) a través del Comité for Veterinary Medicine Products, (CVMP) en el continente europeo y el Joint Expert Comité on Food Additives (JECFA) de la Comisión

Codex Alimentarius de la Food and Agriculture Organization (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), regulan la aprobación de medicamentos y consideran los problemas de residuos en alimentos de origen animal, en los diferentes mercados (Anadón & Martínez-Larrañaga, 1999; Márquez Lara, 2008; Lozano & Trujillo, 2012).

Respecto a las fluoroquinolonas, los efectos adversos descritos refieren a respuestas agudas, como resultado de la exposición a altas dosis. Los efectos crónicos, asociados con la exposición prolongada a dosis bajas que en estos antimicrobianos se asocian con la expresión de resistencia bacteriana, efectos sobre el sistema inmune y efectos genotóxicos como los mutagénicos, carcinogénicos y tóxico-reproductivos, relacionados con la problemática de residuos en productos y subproductos destinados al consumo, y a la exposición humana a éstos residuos.

La resistencia a las fluoroquinolonas estimuló un fuerte debate político concerniente a su aplicación en animales en producción cuyos productos y subproductos ingresan en la cadena alimentaria humana.

El debate comenzó tras la manifestación de cepas *Campylobacter jejuni* ciprofloxacina resistentes, poco tiempo después de aprobarse la enrofloxacin para uso en pollos en Holanda y la menor susceptibilidad de *Salmonella thiphymurium* frente a ciprofloxacina, inmediatamente después de aprobarse la enrofloxacin para uso en ganado en el Reino Unido (Smith & Fratamico, 2010; de Jong et al., 2012).

El tracto intestinal de las aves suele albergar niveles elevados de microorganismos patógenos como *Campylobacter* o *Salmonella* y patógenos oportunistas como *Escherichia coli* o *Enterococcus*, sin consecuencias aparentes para el animal portador. *Campylobacter jejuni* es la bacteria enteropatógena más frecuente en humanos en los países desarrollados (Avrain et al., 2003; Desmonts et al., 2004).

Diversos estudios identificaron a la carne de pollo como fuente de infección habitual en humanos, con enorme relevancia clínica debido a la creciente resistencia a ciertos antimicrobianos como las fluoroquinolonas (Luber et al., 2003; Smith & Fratamico, 2010).

Las bacterias portadoras de resistencia a fluoroquinolonas presentes en el tracto intestinal de los animales pueden contaminar las canales, y provocar enfermedades transmitidas por los alimentos en humanos que no responden al tratamiento con antibióticos ó la transferencia de resistencia a la microbiota presente en el consumidor, por reemplazo de su microbiota habitual ó mediante la transferencia de determinantes genéticos portadores de resistencia a antimicrobianos (Lee & Ryu, 2000; Greenlees, 2003; de Jong A et al., 2012).

Las bacterias resistentes también pueden ser transferidas mediante el contacto directo con los animales, caso típico de granjeros y matarifes (Cornican et al., 2001; Van den Boogard et al., 2001).

La Food and Drug Administration, FDA, de EE.UU. propuso retirar esta aprobación como resultado de las preocupaciones sobre la resistencia a las fluoroquinolonas en *Campylobacter* (Nelson et al., 2007; Jensen et al., 2008; Reyes Herrera et al., 2011). Actualmente, en muchos países no se autorizan nuevas fluoroquinolonas para su empleo en los animales domésticos en producción, se intenta restringir la aplicación oral y se recomienda sólo el uso terapéutico parenteral.

Con el propósito de atenuar el problema, la Unión Europea, a través del comité para productos médicos y veterinarios, ha determinado un límite máximo de residuos (LMR) para la mayoría de los fármacos autorizados en los diferentes tejidos diana (Tabla N° 1).

Estos límites han sido establecidos en función de estudios de toxicidad crónica a partir de los llamados “límite sin efecto observable” y “límite sin efecto microbiológico”.

El LMR es “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 ó se reconoce como aceptable dentro de un alimento ó en la superficie del mismo”.

La determinación del LMR demanda establecer para cada fármaco y en cada tejido comestible, las más bajas concentraciones que no provocan efectos en los animales de laboratorio y en el segundo caso, consiste en determinar las concentraciones sin ningún efecto sobre las bacterias más sensibles, en particular las del tracto gastrointestinal. Con esta información, se determina el

“nivel de ingesta diaria admisible”, mediante la aplicación de factores de seguridad de 100 a 1000 veces, respectivamente (Lee & Ryu, 2000; Arboix & Martín-Jiménez, 2002; Palermo Neto, 2006; Reeves, 2010).

Para un determinado fármaco las exigencias regulatorias establecidas suelen diferir significativamente según el país, resultado de la diversidad de criterios adoptados respecto al uso de fármacos; en algunas jurisdicciones son más flexibles en sus regulaciones que otras, por lo tanto el problema de los residuos adquiere dimensiones diferentes según la modalidad productiva y los métodos analíticos utilizados (Miller & Flynn, 2002, Lister, 2011).

Tabla N° 1: LMR establecidos para fluoroquinolonas en pollos, expresados en µg/kg.

Agente	Hígado	Riñón	Músculo
Danofloxacin	400 ^a	400 ^a	200 ^a
Difloxacin	1 900 ^c	600 ^c	300 ^c
Enrofloxacin ^d	200 ^a	300 ^a	100 ^a
Flumequine	800 ^c /1 000 ^b	1 000 ^c /3 000 ^b	400 ^c /500 ^b
Ofloxacin	150 ^c	150 ^c	100 ^c
Sarafloxacin	80 ^b /100 ^c	80 ^b	10 ^b

Referencias: ^aEU, JECFA, ^bJECFA, ^cEU, ^dSuma de enrofloxacin más ciprofloxacina.

Con la finalidad de reducir el impacto de los residuos, cuando finaliza el empleo de un agente antimicrobiano en un animal productor de alimentos para consumo humano, es necesario que se espere un tiempo antes de su sacrificio. Este es denominado “período de supresión, resguardo ó retirada”, es necesario para poder obtener alimentos con concentraciones de residuos, procedentes del uso de medicamentos, inferiores a los límites máximos residuales (LMR) establecidos en la legislación (Lee & Ryu, 2000; Riviere & Sundlof, 2003).

Los niveles de residuos tienen directa relación con las etapas que influyen en la disposición de los fármacos (Koritz, 1988), de modo que el Pr puede determinarse en función de parámetros farmacocinéticos obtenidos en el tejido diana (Arboix & Martín-Jiménez, 2002; Riviere & Sundlof, 2003) ó

mediante estudios de depleción de residuos, con el propósito de determinar cuánto y durante que tiempo permanecen los niveles de fármacos en los tejidos comestibles de un animal y en qué momento se encuentran bajo el límite de tolerancia.

Los procedimientos empleados para la colecta de muestras para cuantificar fluoroquinolonas en tejidos ó fluidos biológicos comprenden diversas metodologías entre las cuales se incluye el homogeneizado de tejidos con muestras obtenidas mediante biopsias durante actos quirúrgicos ó luego del sacrificio de los animales, práctica adoptada en pollos para establecer niveles residuales en tejidos comestibles con enrofloxacin y su metabolito, ciprofloxacina (Anadón et al., 1995; Knoll et al., 1999; Anadón et al., 2001; García Ovando et al., 2006), marbofloxacina (Anadón et al., 2002), levofloxacina (Errecalde, 2010), norfloxacina (Anadón et al., 1992), danofloxacina (Knoll et al., 1999) y flumequine (Martínez et al., 2006 a).

Las técnicas utilizadas para determinar residuos de fármacos activos en los tejidos diana -aquellos destinados al consumo y en los que es factible el acúmulo del fármaco-, deben reunir una serie de requisitos para aceptarse como métodos de análisis válidos para cuantificar un fármaco en una matriz determinada, de acuerdo con los procedimientos descritos en la Directiva y Guía de la EMEA/CVMP/573/00.

En el proceso de validación se deben evaluar parámetros como recuperabilidad, reproducibilidad, linealidad y especificidad, estableciendo el límite de cuantificación y el límite de detección. Sólo cuando se ajustan a determinados valores ofrecen garantías necesarias para asegurar que los niveles del fármaco detectado son reales (Chang, 2000).

El método de análisis utilizado, además de sensible -el factor más crítico, sobre todo cuando se emplea para detección de residuos- debe ser específico y preciso (Aerts et al., 1995; Chang, 2000). La precisión se expresa en la desviación estándar relativa (CV, coeficiente de variación), valorada entre ensayos realizados el mismo día ó en días diferentes (Chang, 2000).

La cromatografía ó High Performance Liquid Chromatography (HPLC), es el método más empleado para la determinación de fluoroquinolonas en matrices biológicas, asociado a detección por fluorescencia y eventualmente, a

espectrometría de masas (Aerts et al., 1995; Botsoglou & Fletouris, 2001; Hernández-Arteseros et al., 2002; Reig & Toldrá, 2009; Lozano & Trujillo, 2012).

Este método presenta sensibilidad analítica y ofrece la ventaja de que pueden determinarse separadamente el compuesto original inalterado y sus metabolitos (Carlucchi, 1998), superando otros métodos poco específicos, como el microbiológico (Carlucchi, 1998; Marzo & Dal Bo, 1998; Bottcher et al., 2001).

Cada fluoroquinolona posee propiedades físico-químicas específicas, que definen exactamente el procedimiento de análisis necesario para su detección y cuantificación y permiten que la sustancia progresivamente sea separada y aislada de otros compuestos mediante diferentes etapas en su extracción y análisis (Andreu et al., 2007).

El inconveniente que se advierte en el análisis de estas moléculas es la naturaleza de la matriz, que contienen proteínas, grasas, enzimas y otras macromoléculas que le otorgan características complejas, que interactúan con la sustancia a determinar y dificultan la extracción del analito (Aerts et al., 1995; Posyniak et al., 2001; Reig & Toldrá, 2009).

El tratamiento de la muestra problema, comprende los procedimientos tendientes a remover macromoléculas u otras sustancias incorporadas en la matriz que puedan influir adversamente la detección, procedimiento llamado *clean up* que contempla diferentes alternativas: homogeneización, digestión enzimática, purificación y/o enriquecimiento, filtración, centrifugación y derivatización (Aerts et al., 1995).

Cada etapa necesaria para lograr la separación del fármaco reduce la recuperación de la molécula respecto a la concentración inicial esperable en la muestra, y comporta que el procedimiento que se sigue sea cada vez más específico para la molécula en sí.

Esto implica que un método de análisis que incorpore varias etapas de extracción, en general, exhibe baja recuperación y por lo tanto demanda una detección mucho más sensible. En cambio, cuando se reducen las etapas para extraer la molécula del tejido, la técnica de detección no necesita ser tan sensible, pero en cambio debe ser mucho más específica y selectiva.

También de forma general, cuando el fármaco presenta alguna propiedad específica, como por ejemplo fluorescencia o una longitud de onda de absorción característica, se facilita de forma notable su detección.

Algunos procedimientos utilizados para la extracción son complejos, debido a la naturaleza polar de las fluoroquinolonas (Andreu et al., 2007), mientras otros demandan gran cantidad de solventes orgánicos, tales como diclorometano (Bailac, et al., 2004), acetonitrilo (Posyniak et al., 2001; Bailac et al., 2004; Idowu & Peggins, 2004), metanol (Böttcher et al., 2001) ó ácido tricloroacético (Posyniak et al., 2001; Verdon et al., 2005), seguido de extracción líquida ó en fase sólida y mediante la desnaturalización con ácido perclórico (Marzo & Dal Bo, 1998; Bailac et al., 2004).

El proceso de extracción constituye el mayor desafío con las fluoroquinolonas, que por su naturaleza anfótera, resultado del grupo piperazinil y el ácido carboxílico (Marzo & Dal Bo, 1998, Hernández-Arteseros et al., 2002), generan posibles residuos químicos que interactúan con componentes de la matriz dificultando la extracción; el efecto es pH dependiente, y puede diferir según la matriz (Marzo & Dal Bo, 1998; Maraschiello et al., 2001).

Debido que las fluoroquinolonas fluorescen por la incorporación del grupo piperacinil, es habitual la determinación mediante fluorómetro (Carlucchi, 1998; Marzo & Dal Bo, 1998; Hernández- Arteseros et al, 2002). La fluorescencia depende del pH del medio; la mejor respuesta se logra entre rangos de pH de 2.5 a 4.5 (Carlucchi, 1998; Ramos et al., 2003).

La dificultad del análisis puede afectar la estabilidad del analito en estudio ó provocar que la molécula no se separe del resto de componentes de la matriz. En este caso puede quedar retenida en la misma ó bien que no se aisle de otros compuestos inherentes a la muestra, interfiriendo en la detección del analito (Aerts et al., 2005).

Según Strelevitz & Linhares (1996), Carlucchi (1998), Bailac et al. (2004) y Verdón et al. (2005), la separación de compuestos es apropiada con HPLC empleando columna de sílica C18 ó C8 y fase móvil que incorpore acetonitrilo ó metanol.

En músculo de pollo, se lograron buenos resultados en la determinación de varias fluoroquinolonas utilizando cartuchos para la extracción y separación

con fase móvil integrada por acetonitrilo-agua 88:12 v/v ajustado a pH 4.5 (Bailac et al., 2004).

En idéntica matriz, Christodoulou et al. (2007), revelaron excelente recuperación de distintas fluoroquinolonas mediante SPP y fase móvil compuesta por ácido trifluoroacético al 0.1%, acetonitrilo y metanol, utilizando para la elusión un programa de gradiente, completando la detección con arreglo de diodos.

Maraschiello et al. (2001), emplearon el ácido clorhídrico y la extracción en fase sólida (SPP) en la extracción de ofloxacina en tejidos de pollos.

Enrofloxacin y ciprofloxacina se determinaron en forma simultánea en músculo de pollos naturalmente infectados con *Mycoplasma spp.* Fragmentos del músculo pectoral fueron homogeneizados en buffer fosfato, luego desproteinizados con diclorometano, evaporados y eluidos por HPLC con detección por fluorescencia establecido a 295 nm de excitación y 500 nm de emisión (García Ovando et al., 2006).

La incorporación de acetonitrilo en la fase móvil favorece la selectividad mientras que trietilamina y el pH ácido modulan la retención y evitan interferencias de la fase móvil en el cromatograma (Maraschiello et al., 2001).

En hígado y músculo de pollo, se realizó la extracción con metanol-acido fosfórico- perclórico. La separación se realizó con columna C8 y fase móvil constituida con buffer fosfato 0.05 M-acetonitrilo 88:12, pH 3.5, ex 280, em 440. La precisión intra ensayo fue 99-101%, e interensayo la precisión fue 99-102 %. La recuperación superó el 90 % en ambos tejidos (Strelevitz & Linhares, 1996)

La concentración de residuos de enrofloxacin fue máxima a las 24 horas de finalizado el tratamiento (0.073 ± 0.006 mg/g), inferior al límite máximo de residuos establecido por los entes reguladores internacionales (0.3 mg/g). Los niveles máximos (0.027 ± 0.015 mg/g) se detectaron para ciprofloxacina a las 72 horas (García Ovando et al., 2006).

IV.3. Aspectos regulatorios

A nivel internacional existen los siguientes organismos (Anadón & Martínez-Larrañaga, 1999): EMEA (European Medicines Evaluation Agency), las resoluciones que emite, se originan de la interacción de tres organismos oficiales y regulan la aprobación de medicamentos y los problemas de residuos en alimentos de origen animal en los diferentes mercados, y FDA (Federal Drug Administration), agencia que se encuentra en Estados Unidos, 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, entre otros. Actualmente la norma básica que recoge y regula los LMRs es el Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos (LMR) de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) N° 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo.

La Argentina tiene en cuenta las normativas internacionales sobre límites máximos de residuos en productos de origen animal. Mediante el Plan Creha, el Senasa realiza el control de residuos e higiene de los alimentos para proteger la salud del consumidor y lograr, de esta manera, un estándar sanitario que asegure la inocuidad de los alimentos que importa y exporta el país. El país toma en cuenta para establecer los límites máximos de residuos (LMR) en los agroalimentos las recomendaciones/directrices del Codex Alimentarius, de la Organización Mundial de la Salud (OMS), y de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), según indicó el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa). A partir de 2011 se promulgó la Resolución 559/2011 en los Anexos I y II, donde se autorizan los LMR para medicamentos veterinarios.

V. MATERIALES Y METODOS

V.1. Reactivos:

- Acido fosfórico
- Metanol
- Acetonitrilo
- Trietilamina
- Acido perclórico
- Acido clorhídrico

V.2. Soluciones:

- Solución stock de danofloxacin, 1.000 µg/ml. Se pesaron exactamente 100,1 mg de danofloxacin, equivalentes a 100 mg de danofloxacin base, en vaso de precipitado de 100 ml, tarado y se disolvieron con 3 ml de HCL 0.1 N, luego se adicionó agua deionizada y aforó en matraz a 100 ml y sonicó durante 20 minutos.

La solución se mantuvo a temperatura ambiente, al abrigo de la luz. A partir de la solución stock de danofloxacin se confeccionaron diariamente diluciones de trabajo en agua deionizada, utilizadas para los estándares de calibración y recuperabilidad.

- Solución stock de marbofloxacin, 1.000 µg/ml. Se pesaron exactamente 100 mg de marbofloxacin base, en vaso de precipitado de 100 ml, tarado y se disolvieron con 3 ml de HCL 0.1 N, luego se adicionó agua deionizada y se aforó en matraz a 100 ml y se sonicó por 20 minutos.

Esta solución se conservó a temperatura ambiente, al abrigo de la luz. A partir de la solución stock de marbofloxacin mediante diluciones en agua deionizada se confeccionaron diariamente soluciones de trabajo, empleadas como estándar interno.

- Fase móvil compuesta por agua deionizada, acetonitrilo y trietilamina (790:200:10 v/v/v) ajustada a pH 3.0 con ácido ortofosfórico, filtrada con bomba de vacío y filtro de nylon de 0.22 µ.

- Solución de homogenización constituida por agua deionizada, metanol, ácido perclórico al 70 % y ácido fosfórico 500:500:10:1 v/v/v/v.

V.3. Equipos

- Homogeneizador de tejidos
- Balanzas
- Vortex
- Centrifuga 2800 rpm
- Centrifuga refrigerada
- Bomba de vacío
- Equipo de filtrado
- Equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), corresponde a la serie 1050 de Hewlett-Packard, dotado de bomba cuaternaria, desgasificador de fase móvil en línea, inyector manual tipo Rheodyne, detector de fluorescencia Hewlett-Packard serie 1046-A de longitud de onda regulable y computadora personal con placa y programa para el control del equipo, adquisición y procesamiento de los datos e impresión de los cromatogramas.

V.4. Software

- Programa farmacocinético Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis PK Solution versión 2.0, Summit Research Services, USA (Farrier, 1999).
- Programa WT 1.4 EMEA (European Medicine Agency, 1998). Note for guidance for the determination of withdrawal periods for meat. Committee for Veterinary Medicinal Products EMEA/CVMP/473/98-Final.

V.5. Antimicrobianos

- Danofloxacina 99.99 % pureza,
- Marbofloxacina base, polvo liofilizado 99.98 % de pureza, Laboratorios
- Advocin 180 ®, Laboratorios Pfizer, Argentina, solución inyectable de danofloxacina, 180 mg/ml, vial x 100 ml.

V.6. Animales

Como sujetos experimentales se utilizaron pollos parrilleros (n= 42) línea Ross, mixtos clínicamente sanos, vacunados contra Marek, Newcastle,

Gumboro y Bronquitis Infecciosa, alimentados con un balanceado comercial (El Granjero ®) que incluye robenidina como coccidiostático y virginiamicina como promotor de crecimiento, ambos fármacos incorporados en el alimento durante la etapa inicial de crianza de las aves y excluidos en el alimento de retiro, suministrado a partir de los 30 días de edad.

Las aves se seleccionaron al azar de una población de 750 pollos de 55 días de edad al inicio de la experiencia, clínicamente sanos, sujetos a idénticas condiciones de manejo y alimentación, pertenecientes a un establecimiento avícola comercial ubicado próximo a la ciudad de Río Cuarto. Los animales fueron alojados en dependencias del mismo establecimiento en condiciones de ambiente controladas, adecuadas para la edad de los animales: ventilación forzada, plan de luz de 18 horas totales, temperatura ambiente acondicionada entre 19 a 21 °C y humedad ambiente promedio 65 %. Las aves recibieron ad libitum agua de bebida y alimento balanceado para aves (El Granjero ®), libre de promotores de crecimiento y coccidiostáticos, mientras se desarrolló la experiencia.

V.7. Toma de muestras

Luego de una semana de adaptación, las aves fueron pesadas individualmente y conformadas al azar en 14 lotes de 3 individuos cada uno. Cada lote fue identificado y previo ayuno de 24 horas y de 3 horas post aplicación, cada animal recibió una dosis única de 5 mg/kg de la solución comercial de danofloxacina aplicada directamente en forma de bolo en la cavidad bucal. Luego de la administración del antimicrobiano cada lote se sacrificó por exanguinación adoptando un procedimiento similar al utilizado en establecimientos autorizados para la faena de aves, en uno de los siguientes tiempos post aplicación: 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, obteniéndose 5 ml de sangre en tubos heparinizados que fueron centrifugados de inmediato durante 10 minutos a 2500 rpm, 3 gramos de hígado y 3 gramos de músculo. El plasma resultante y las muestras de tejido obtenidas de cada animal se identificaron y conservaron en viales por separado hasta su análisis a -20°C.

V.8. Tratamiento de las muestras

En el plasma el ensayo preparativo consistió en la extracción líquido-líquido del analito utilizando 200 μL de plasma, 200 μL de agua deionizada, 800 μL de metanol y 30 μL de una solución de marbofloxacina de 10 $\mu\text{g/ml}$ como estándar interno. El conjunto fue sometido a agitación por vortex durante 30 segundos y luego de 25 minutos de reposo a temperatura ambiente, fue centrifugado a 13500 rpm a 4°C durante 25 minutos, según Böttcher et al. (2001). El sobrenadante fue filtrado con filtro de nylon de 0.22 μ y 50 μl del mismo se emplearon como volumen de inyección de la muestra para su separación y cuantificación por HPLC.

En cada tejido, el ensayo preparativo consistió en la extracción líquido-líquido del analito empleando 150 mg de tejido al que se adicionó 100 μL de una solución de 20 $\mu\text{g/ml}$ de marbofloxacina como estándar interno y 0.750 ml de la solución de homogeneización.

El conjunto fue homogeneizado mecánicamente durante 1 minuto, luego se agregó 0.750 ml de la solución de homogeneización, el contenido fue sometido a un minuto de vortex, 25 minutos de reposo a temperatura ambiente, estacionado durante 12 horas en heladera a 4 °C y luego centrifugado durante 30 minutos a 13500 rpm a 4°C, según Böttcher et al., (2001). El sobrenadante fue filtrado con filtros de nylon de 0.22 μ y 50 μL fueron utilizados como volumen de inyección de la muestra para su separación y cuantificación por HPLC.

V.9. Separación y cuantificación

La separación y cuantificación se realizó a temperatura ambiente por HPLC mediante una elusión isocrática en fase reversa con flujo de 0.8 ml/minuto utilizando columna octadecilsilano C-18, 5 μ , 25 cm, Hewlett Packard, precolumna Phenomenex, jeringa de inyección Hamilton de 100 μL y lectura en detector de fluorescencia establecido a 295 nm de excitación y 490 nm de emisión, según Böttcher et al. (2001). La elusión generó picos en cromatograma correspondientes a marbofloxacina, estándar interno y al analito en estudio, danofloxacina.

V.10. Cálculo de concentraciones

De los cromatogramas correspondientes a las corridas de las muestras del ensayo cinético y los patrones de concentración conocidos, se tomaron los valores del área de pico provistos por danofloxacin y el estándar interno, marbofloxacin. De ambos se obtuvo un cociente utilizado para la confección de la curva de calibración y establecer las concentraciones plasmáticas y tisulares de danofloxacin por regresión lineal simple, según Nouws & Ziv (1976).

V.11. Análisis farmacocinético

De los tres pollos sacrificados por tiempo se consiguió un valor promedio para el cálculo de la concentración final de la curva en el plasma ó tejido de danofloxacin, según corresponda, en función del tiempo.

El programa farmacocinético no compartimental PK Solution 2.0 (Farrier, 1999), se aplicó para el análisis cinético individual en el plasma y en cada tejido estudiado, incorporando los promedios de concentraciones de danofloxacin establecidas en cada tiempo, la dosis utilizada y el peso promedio de las aves incluidas en la experiencia (3.076 kgs).

Con los promedios de concentraciones de danofloxacin en el plasma el programa PK Solution 2.0, utilizando las fórmulas farmacocinéticas clásicas, se estimaron los valores de parámetros cinéticos robustos. A partir de la curva de concentraciones promedio de danofloxacin generada en músculo e hígado luego de la aplicación oral hasta las 24 horas siguientes, se determinaron valores de parámetros cinéticos propios de cada tejido.

V.12. Cálculo del período de resguardo:

El periodo de retiro se estimó con el programa WT 1.4 de la EMEA (Hekman, 1998) según los LMR establecidos en músculo e hígado de pollo considerando 200 y 400 µg/kg, respectivamente e incluyendo en la determinación de cada tejido los valores residuales obtenidos.

V.13. Validación del método cromatográfico

Previo al análisis de las muestra problemas se validó la metodología cromatográfica, efectuando ensayos de linealidad, recuperabilidad, límite de detección, límite de cuantificación, reproducibilidad y repetibilidad. Estos ensayos y la determinación de la concentración del analito en las muestras problemas, se efectuaron sobre el índice de área, resultante de la división de las áreas de las señales cromatográficas de danofloxacina y el estándar interno, marbofloxacina.

El ensayo de linealidad consistió en determinar 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 ambas variables. Con este propósito se utilizaron los valores de intercepto y pendiente de la curva de calibración, y la siguiente función lineal:

$$y = a + b x$$

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

La recuperación “relativa”, consistió en determinar la variación que experimentó la concentración del analito en estudio, cuando la muestra que lo contiene se somete a extracción. Se eluyeron por triplicado tres estándares de calibración y tres de recuperabilidad en concentraciones diferentes de danofloxacina y se calculó el porcentaje de recuperabilidad (% R) para cada concentración según:

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

El ensayo de límite de detección (LD), se realizó utilizando la fórmula recomendada por la EMEA, que contempla la superficie de área en el cromatograma originadas tras la elusión de las concentraciones más pequeñas

de danofloxacin, mediante las cuales se estableció una curva de calibración y se obtuvo el valor de β

$$LD = \frac{\text{promedio de la SD} \cdot 3.3}{\beta}$$

El límite de cuantificación (LC) se calculó con la misma fórmula y valores, sólo que se multiplica el promedio de áreas obtenidos por 10:

$$LC = \frac{\text{promedio de la SD} \cdot 10}{\beta}$$

El ensayo de repetibilidad consistió en la elusión de los estándares de calibración por sextuplicado. Se consideró aceptable cuando el coeficiente de variación (CV) entre eluciones, en cuanto el índice de áreas de los cromatogramas fue $\leq 1.5\%$.

El ensayo de reproducibilidad consistió en eluir los estándares de calibración en ensayos efectuados en 6 días diferentes. Se consideró aceptable cuando el CV de los índices de áreas de los cromatogramas fue $\leq 3\%$.

VI. RESULTADOS

V.1. Validación del método cromatográfico

Los resultados obtenidos en los ensayos de validación se indican: linealidad (Tabla N° 2), recuperabilidad (tabla N° 3), repetibilidad y reproducibilidad obtenidos con danofloxacin en tejidos de pollo (tabla N° 4). La tabla N° 5 indica los límites de detección y de cuantificación obtenidos.

Tabla N° 2: Ensayo de linealidad de danofloxacin en plasma y tejidos de pollos.

Matriz	Rango concentración (µg/ml ó µg/gr)	A	B	r ²
Músculo	0.0 975- 1.25	0.005584	0.5427	0.9999
Hígado	0.078-10	0.005975	0.5508	0.9999

Tabla N° 3: Ensayo de recuperabilidad de danofloxacin en plasma y tejidos de pollos.

	Concentraciones ensayadas (µg/ml ó gr)	% recuperabilidad
Músculo	0.155, 1.25, 2.5	80.54 ± 4.45
Hígado	0.31, 1.25, 10	75.68 ± 13.68

Tabla N° 4: Ensayo de repetibilidad y reproducibilidad de danofloxacin en plasma y tejidos de pollo.

Matriz	Concentraciones ensayadas (µg/ml ó gr)	%CV	
		Repetibilidad	Reproducibilidad
Músculo	0.156, 0.31, 1.25, 2.5	1.223 ± 0.603	2.374 ± 1.084
Hígado	0.31, 1.25, 5,10	0.966 ± 0.149	1.712 ± 1.298

Tabla N° 5: Ensayos de límite de detección (LD) y cuantificación (LC).

Matriz	LD (*)	LC (*)
Músculo	0.02625	0.07875
Hígado	0.01895	0.05685

VI.2. Ensayo farmacocinético y de disposición tisular

Las concentraciones plasmáticas promedio de danofloxacin obtenidas por tiempo de sacrificio se detallan en la tabla N° 6. La tabla N° 7 indica los promedios (\pm DE) de concentraciones tisulares. La figura N° 3 representa las concentraciones plasmáticas, hepáticas y musculares de danofloxacin luego de la aplicación oral de 5 mg/kg.

Tabla N° 6: Concentraciones plasmáticas de danofloxacin (\pm DE) versus tiempo

Tiempo (horas)	Plasma oral (μ g/ml)
0.25	0.280 \pm 0.046
0.5	0.425 \pm 0.084
0.75	0.641 \pm 0.194
1	1.052 \pm 0.367
2	0.996 \pm 0.126
4	0.963 \pm 0.075
6	0.469 \pm 0.114
8	0.351 \pm 0.041
12	0.273 \pm 0.103
24	0.085 \pm 0.138
48	0.028 \pm 0.005
72	0.018 \pm 0.001

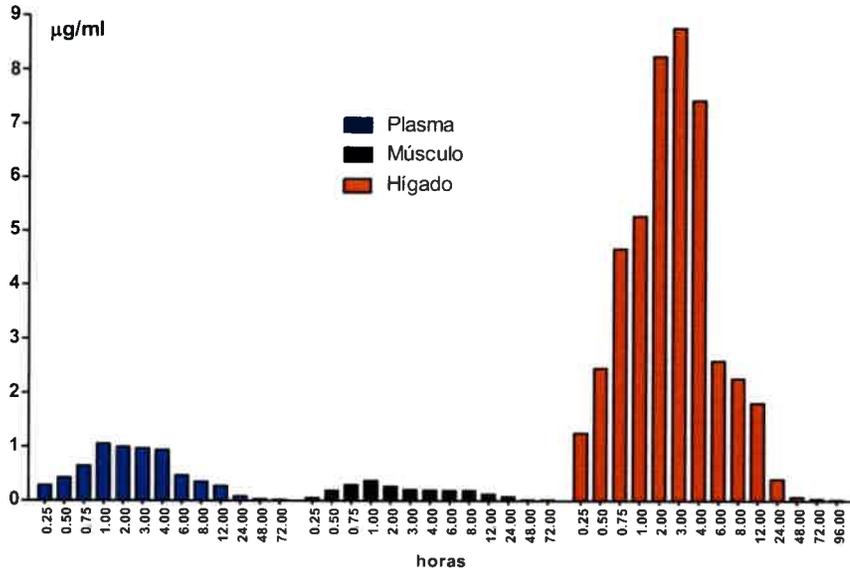


Figura N°3: Representación de las concentraciones plasmáticas, hepáticas y musculares de danofloxacin tras la administración oral de 5 mg/kg

Tabla N° 7: Concentraciones tisulares (X ± DE) de danofloxacin en pollos luego de la administración oral de 5 mg/kg.

Tiempo	Músculo	Hígado
0.25	0.051 ± 0.019	1.258 ± 0.546
0.50	0.191 ± 0.109	2.456 ± 0.698
0.75	0.294 ± 0.116	4.672 ± 0.908
1	0.370 ± 0.200	5.280 ± 2.354
2	0.266 ± 0.183	8.590 ± 1.258
3	0.207 ± 0.161	8.780 ± 0.734
4	0.196 ± 0.133	7.446 ± 1.248
6	0.192 ± 0.107	2.594 ± 0.458
8	0.189 ± 0.132	2.267 ± 0.184
12	0.125 ± 0.014	1.813 ± 0.951
24	0.075 ± 0.024	0.400 ± 0.193
48	0.020 ± 0.005	0.070 ± 0.022
72	0.019 ± 0.002	0.035 ± 0.011

Los resultados en los parámetros farmacocinéticos conseguidos al analizar las curvas de disposición plasmática generadas por aplicación oral, contemplando el peso promedio de todos los animales involucrados en la experiencia, se señalan en la tabla N° 8.

Tabla N° 8: Parámetros cinéticos plasmáticos obtenidos con danofloxacin en pollos por vía oral.

Parámetro	Plasma
C _{máx} (µg/gr)	1.1
T _{max} (h)	1
t _{1/2} α (h)	1.11
t _{1/2} abs (h)	0.48
t _{1/2} β (h)	7.64
ABCárea (µg-h/ml)	10.0
MRT (h)	9.6
Vd (Lt/kg)	5.51
Cl (ml/h/kg)	8.33

Referencias: C_{máx}= concentración máxima alcanzada; T_{máx}= momento en que se logra la C_{máx}; t_{1/2} abs; vida media de absorción, t_{1/2}β= vida media de eliminación; t_{1/2}α= vida media de distribución; ABCárea= área bajo la curva; Vd área= volumen de distribución; TMR= tiempo medio de residencia; Cl= clearance.

Los resultados en los distintos parámetros farmacocinéticos, derivados del análisis de los promedios de concentraciones de cada tejido en diferentes tiempos desde los 15 minutos hasta las 24 horas siguientes a la aplicación de danofloxacin con el programa farmacocinético no compartimental PK Solution 2.0, se representan en la tabla N° 9.

Tabla N° 9: Parámetros farmacocinéticos tisulares obtenidos con 5 mg/kg de danofloxacin por vía oral en pollos.

Parámetro	Músculo	hígado
C _{máx} (µg/gr)	0.4	8.8
T _{max} (h)	1	3
t _{½ β} (h)	12.77	6.16
ABCárea (µg-h/ml)	4.9	66.1
MRT (h)	18.5	8

Referencias: C_{máx}: concentración máxima alcanzada; T_{máx}: momento en que se logra la C_{máx}; ABCárea: área bajo la curva; t_{½β}: vida media de eliminación; TMR: tiempo medio de residencia.

VI.3. Período de resguardo.

El análisis de las concentraciones residuales versus tiempo con el programa WT 1.4 de la EMEA (Hekman, 1998), permitió estimar un período de resguardo a la faena de 1.4 y 3.34 días, para músculo e hígado, respectivamente.

VII. DISCUSIÓN

En los animales tratados con danofloxacin no se observaron reacciones adversas de ninguna naturaleza, en concordancia con el perfil de seguridad que caracteriza al conjunto de fluoroquinolonas en humanos (Paige & Tollefson, 2003; Cué Brugueras et al., 2005) y en los animales domésticos, cuando se utilizan según las condiciones recomendadas (Brown, 1996; Walker & Dowling, 2007; Gupta et al., 2012).

El programa farmacocinético no compartimental PK Solution 2.0 (Farrier, 1999) es adecuado para interpretar las curvas de disposición de danofloxacin en plasma, músculo e hígado en pollos, que en todos los casos ajustaron una ecuación triexponencial en el análisis de las concentraciones promedio por tiempo.

A través de la aplicación de las fórmulas clásicas, el programa PK Solution 2.0 estimó parámetros cinéticos robustos que permiten describir la disposición de danofloxacin en plasma, músculo e hígado.

Los resultados obtenidos en el estudio farmacocinético en el plasma de pollos parrilleros adultos revelan que la administración oral de 5 mg/kg de danofloxacin en condiciones de ayuno previo de 12 horas, con el propósito de evitar la interacción del antimicrobiano con los iones divalentes de origen alimentario (Lees & Shojaee AliAbadi, 2002a; Hofacre, 2007; Gupta et al., 2012).

Danofloxacin experimenta pronta absorción, el fármaco es determinado en el plasma a los 15 minutos post aplicación y consigue el $C_{m\acute{a}x}$ plasmático a la hora, más pronto que lo comunicado en humanos (Cué Brugueras et al., 2005; Bhavsar & Thaker, 2012) y en el conjunto de animales domésticos (Brown, 1996; Gupta et al., 2012).

Con la dosis aplicada, la $C_{m\acute{a}x}$ plasmática obtenida es de 1.1 $\mu\text{g/ml}$. Este valor es idéntico al obtenido con levofloxacin con la misma posología (Errecaldé, 2010), pero excede largamente a los comunicados en otros ensayos realizados con danofloxacin empleando dosis similares por vía oral en pollos parrilleros (Knoll et al., 1999; el-Gendi et al., 2001; Zhong et al., 2001; Zeng et al., 2011) y en patos Muscovy (Goudah & Mouneir, 2009).

La $C_{m\acute{a}x}$ plasmático es similar al encontrado utilizando 2 mg/kg de marbofloxacin (Anadón et al., 2002) e inferior a los informados tras la aplicación de ciprofloxacina (Anadón et al., 2001), enrofloxacin (Anadón et al., 1995), ofloxacin (Kalaiselvi et al., 2006) y flumequine (Martínez et al., 2006 a).

El $t_{1/2\beta}$ hallado de 7.6 horas, es inferior al reportado en pollos parrilleros con marbofloxacin (Anadón et al., 2002), difloxacin (Ding et al., 2008), norfloxacina (Laczay et al., 1998), flumequine (Martínez et al., 2006 a) y ciprofloxacina (Anadón et al., 2001); y supera al de sarafloxacin (Ding et al., 2001), enrofloxacin (Knoll et al., 1999), ofloxacin (Kalaiselvi et al., 2006) y levofloxacin (Errecalde, 2010).

Comparado con ensayos realizados con danofloxacin en pollos, el valor obtenido de $t_{1/2\beta}$ plasmático en este ensayo es similar a los hallados por Zhong et al. (2001), pero significativamente menor al que informan (Zeng et al. (2011) y en pavos (Haritova et al., 2006).

El TMR encontrado en esta experiencia de 9.6 h, respecto experiencias realizadas en pollos, es mayor al informado con enrofloxacin (Knoll et al. 1999), similar a los obtenidos con norfloxacina (Laczay et al., 1998), fluquequine (Martínez et al., 2006 a) y levofloxacin (Errecalde, 2010) e inferior al obtenido con ciprofloxacina (Anadón et al., 2001) y danofloxacin en pollos (Knoll et al., 1999) y en pavos con danofloxacin (Haritova et al., 2006).

Los valores obtenidos concuerdan que la permanencia plasmática de fluoroquinolonas en pollos es moderada (Anadón et al., 1993), similar a lo que sucede con danofloxacin en mamíferos domésticos (Friis, 1993; Mc Kellar et al., 1998).

En este ensayo, la curva de disposición plasmática generó áreas bajo la curva (ABC) de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, significativamente mayores a los valores informados en esta especie utilizando idéntica dosis de danofloxacin (Lynch et al., 1994; Knoll et al., 1999; Zhong et al., 2001; Zeng et al., 2011) y en pavos, tras la aplicación de 6 mg/kg (Haritova et al., 2006).

La rápida declinación plasmática verificada en este estudio, a partir de las 12 horas, no resulta sólo de los procesos de eliminación sino de la distribución a los tejidos, semejante a lo observado en experiencias realizadas en pollos con danofloxacin (Knoll et al., 1999), enrofloxacin (Knoll et al.,

1999; García Ovando et al., 2006) y levofloxacin (Errecalde, 2010). Sin embargo el clearance hallado en esta experiencia, comparado con otros agentes del grupo en pollos es menor al reportado con norfloxacin (Laczay et al., 1998) y con danofloxacin (Lynch et al., 1994; Knoll et al., 1999), pero supera los informados con sarafloxacin (Ding et al., 2001), marbofloxacin (Anadón et al., 2002), (Bugyei et al., 1999); ofloxacin (Kalaiselvi et al., 2006), levofloxacin (Errecalde, 2010) y ciprofloxacin (Anadón et al., 2001), insinuando eliminación más pronta respecto a estas sustancias.

En pollos parrilleros danofloxacin exhibe marcada disposición tisular, según el elevado Vd obtenido de 5.51 L/Kg, estimación que acuerda con los antecedentes disponibles para el conjunto de las fluoroquinolonas (McKellar et al., 2004; San Andrés Larrea & Boggio, 2007; Lees et al., 2008).

El valor hallado excede al informado en experiencias realizadas con este antimicrobiano en pollos (el-Gendi et al., 2001) y en mamíferos domésticos (Friis, 1993; McKellar et al., 1998; Atef et al., 2001) y con otros integrantes del grupo quinolonas en aves de corral (Bugyei et al., 1999; Ding et al., 2001; el-Gendi et al., 2001; Errecalde, 2010).

La comparación de las ABC en este estudio arroja cocientes tejido/plasma de 0.48 y 6.61 en músculo e hígado, respectivamente, valores menos significativos a los reportados por otros autores en pollos parrilleros con este antimicrobiano (Lynch et al., 1994; Knoll et al., 1999; Zeng et al., 2011).

La confrontación de las ABC obtenidas en plasma, músculo e hígado con la CIM reportada frente microorganismos sensibles (Knoll et al., 1999), determina cocientes predictores de eficacia que respaldan el uso terapéutico de danofloxacin por vía oral en pollos parrilleros.

Los reveladores valores de danofloxacin determinados en el tejido hepático son consistentes con sus propiedades cinéticas (Lynch et al., 1994), en correspondencia con sus características físico-químicas tales como liposolubilidad (el-Gendi et al., 2001; Lees & Shojaee AliAbadi, 2002 a; Gupta et al., 2012) y reducida afinidad por proteínas plasmáticas (Anadón & Martínez Larrañaga, 1999; Papich & Riviere, 2003; Haritova & Lashev, 2009).

Similar a lo reportado en pollos parrilleros por Lynch et al., (1994) los niveles hepáticos decrecen en forma paralela a los plasmáticos. Son poco

significativos desde las 24 horas y son determinados hasta las 72 horas post aplicación. El $C_{m\acute{a}x}$ conseguido en este tejido excede significativamente al plasmático, pero es menor al comunicado por Zeng et al., (2011) utilizando una dosis similar.

En el hígado el $T_{m\acute{a}x}$ se alcanza a las 3 horas y se comprueba moderada permanencia de danofloxacin en este tejido, según los valores de $t_{1/2\beta}$ y TMR encontrados, menos trascendentes respecto a los informados en otro ensayo realizado en pollos con danofloxacin (Zeng et al., 2011).

En el músculo, los niveles determinados en ésta experiencia son inferiores a los comunicados en pollos parrilleros (Zeng et al., 2011) y en patos Muscovy (Goudah & Mouneir, 2009). En este tejido el $C_{m\acute{a}x}$ se consigue a la hora post aplicación y es menor al establecido en el plasma en ésta experiencia, y otras realizadas con este antimicrobiano en pollos (Zeng et al., (2011), aunque el fármaco exhibe más permanencia respecto al plasma y al hígado.

Las inferiores concentraciones tisulares pueden ser consecuencia del modo de aplicación: en forma de bolo en este estudio, en otros el fármaco es suministrado en el agua de bebida, esta aplicación genera niveles continuos, similar a la aplicación intravenosa continua, a la modalidad del ensayo, metodología analítica, etc.; no obstante se observa marcadas variaciones en la información disponible respecto a la disposición tisular de danofloxacin y otras quinolonas en animales domésticos.

Los resultados conseguidos en este estudio cinético se corresponden con los antecedentes disponibles para el conjunto de fluoroquinolonas en ésta especie animal cuando se suministran por vía oral (Anadón et al., 1993; Anjum & Rizvi, 1998; Zhong et al., 2001; Gupta et al., 2012) y en el hombre (Cué Bruguera et al., 2005; Bhavsar & Thaker, 2012).

A pesar de las diferencias expresadas en este estudio en el ABC plasmático versus los tisulares, particularmente el hígado, el período de resguardo a la fauna de danofloxacin en pollos parrilleros, estimado a partir de datos surgidos del análisis farmacocinético en los tejidos comestibles (Koritz, 1988; Arboix & Martín-Jiménez, 2002; Riviere & Sundlof, 2003), utilizando el

programa WT 1.4 de la EMEA, se estableció en 1.4 y 3.34 días, para músculo e hígado, respectivamente.

La sustitución del diseño farmacocinético tradicional, que contempla la toma de muestras seriadas en pocos animales -usualmente seis individuos- (Lees & Shojaee AliAbadi, 2002; Martín-Jiménez, 2002), por el modelo poblacional implementado en este estudio, resulta ventajoso por cuanto implica la colecta de muestras temporales de plasma y/o tejidos de diferentes individuos, lo que permite atenuar las variaciones atribuidas a la edad, sexo, tamaño corporal, ó provocadas por causas patológicas ó nutricionales, etc., advertidas en los estudios cinéticos convencionales (Martín-Giménez & Riviere, 1998; McKellar et al., 2004; Lees et al., 2008).

Cuando se realizan estudios farmacocinéticos con el único propósito de establecer curvas de disposición plasmáticas, luego de la administración por una vía determinada, los resultados generados constituyen sólo una aproximación referente al destino del fármaco en el organismo.

El diseño poblacional permite describir el comportamiento farmacocinético de danofloxacin aportando información más próxima a situaciones reales y, según la magnitud de los niveles tisulares alcanzados y su persistencia, permite la integración PK-PD a partir de datos procedentes de los tejidos, valorar la utilidad terapéutica del antimicrobiano y establecer un periodo de resguardo a la faena (Martín-Giménez & Riviere, 1998; McKellar et al., 2004; Lees et al., 2008).

En el ensayo de linealidad, los elevados coeficientes de correlación obtenidos ($r^2 > 0,99$) avalan la confiabilidad de las curvas de calibración utilizadas en los cálculos de concentración del analito en las muestras problema.

El método de HPLC implementado, adaptado de Böttcher et al., (2001), modificando la composición sugerida de la fase móvil: agua deionizada: metanol: trietilamina 75:25:4 v/v/v, sugerida Bottcher et al., (2001), reemplazada por agua deionizada: acetonitrilo: trietilamina 79:20:1 v/v/v, ajustada a pH 3.0 (Carlucchi, 1998; Ramos et al., 2003). Fue preciso, según revelan los resultados obtenidos en los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad realizados en hígado y músculo. Los CV en los tejidos

ensayados fueron ≤ 1.5 y ≤ 3.0 %, respectivamente, valores considerados aceptables (Aerts et al., 1995; Chang, 2000).

La recuperabilidad conseguida en los tejidos estudiados, es próxima a la informada con danofloxacin y otras fluoroquinolonas en tejidos de pollo (Maraschiello et al., 2001; Bailac et al., 2004; Christodoulou et al., 2007; Errecalde, 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio respaldan la suficiencia de los procedimientos destinados a extraer el analito del plasma, utilizando metanol como solvente polar seguido de extracción líquida y centrifugación (Posyniak et al., 1990; Marzo & Dal Bo, 1998; Bailac et al., 2004; Errecalde, 2010) y en los tejidos, empleando metanol en medio ácido, continuado por homogeneización mecánica y centrifugación (Aerts et al., 1995; Böttcher et al., 2001; Errecalde, 2010), contemplando la elevada complejidad de las matrices motivo de análisis (Aerts et al., 1995; Reig & Toldrá, 2009).

El método de HPLC adoptado, utilizando columna C18 y detector de fluorescencia (Aerts et al., 1995; Hernández-Artaseros et al., 2002), fase móvil ajustada a pH ácido (Posyniak et al., 1990; Carlucchi, 1998; Ramos, 2003) incorpora acetonitrilo (Carlucchi, 1998; Bailac et al., 2004; Verdón et al., 2005) y trietanolamina que impiden interferencias en el cromatograma que dificultan la determinación (Marzo & Dal Bo, 1998; Maraschiello et al., 2001).

El método aplicado es simple porque requiere pocas etapas en su desarrollo, con escasa demanda de solventes, y económico porque la extracción líquido-líquido no requiere insumos de alto costo como son los cartuchos de extracción en fase sólida, es suficientemente sensible para estudios cinéticos, de disposición tisular ó para establecer niveles residuales, dada la sencillez en el procesamiento de las muestras, y versatilidad, pues se adopta a diferentes matrices, constituye una opción en los planes de monitoreo de residuos (Strelevitz & Linhares, 1996; Böttcher et al., 2001).

VIII. CONCLUSIONES

- El perfil cinético exhibido por danofloxacin en pollos concuerda con sus propiedades físico-químicas
- Las curvas de disposición generadas en plasma y en los tejidos estudiados, luego de la aplicación vía oral, importantes hasta las 12-24 horas, permiten considerar la aplicación de una sola dosis diaria.
- Los resultados obtenidos respaldan el empleo de danofloxacin por vía oral en pollos.
- El diseño poblacional implementado es adecuado para realizar estudios farmacocinéticos, de disposición tisular y para establecer el periodo de resguardo.
- El método de extracción aplicado y la técnica de HPLC implementada resultaron confiables, accesibles y sensibles para cuantificar concentraciones de danofloxacin en el plasma ó tejidos de pollos, útil para estudios cinéticos ó para establecer niveles residuales.
- La administración de danofloxacin en pollos debe ser prudente, en las dosis indicada, durante periodos breves de tiempo y respetando el periodo de resguardo, establecido en función de niveles residuales, es de 1.4 y 3.34 días, para músculo e hígado, respectivamente, compatibles con la brevedad de los ciclos productivos de pollos parrilleros

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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.

ANADÓN, A. & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. (1999). Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livest Prod Sci* 59: 183-198.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. & CASTELLANO, V. (2009). Antimicrobials (including coccidiostats) in poultry. *J vet Pharmacol Therap.* 32 (Suppl.1): 11-46.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. & FERNÁNDEZ-CRUZ, M. (1993). Considérations physiologiques et pharmacologiques en thérapeutique aviaire. *Rev Méd Vét* 144 (10): 745-757.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.; DÍAZ, M.; BRINGAS, P.; MARTÍNEZ, M.; FERNÁNDEZ CRUZ, M.; FERNÁNDEZ, M. & FERNÁNDEZ, R. (1995). Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. *Am J Vet Res* 56 (4): 501-506.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.; DÍAZ, M.; MARTÍNEZ, M.; FREJO, M.; MARTÍNEZ M.; TAFUR, M. & CASTELLANO, V. (2002) Pharmacokinetic characteristics and tissue residues for marbofloxacin and its metabolite desmethyl-marbofloxacin in broiler chickens. *Am J Vet Res* 63 (7): 927-933.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.; ITURBE, J.; MARTÍNEZ, M.; DÍAZ, M.; FREJO, M., & MARTÍNEZ, M. (2001). Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. *Res Vet Sci* 71: 101-109.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.; VÉLEZ, C.; DÍAZ, M. & BRINGAS, P. (1992). Pharmacokinetics of norfloxacin in chickens after single intravenous and oral administration of the drug. *Am J Vet Res* 53 (11): 2084-2089.

ANDREU, V.; BLASCO, C. & PICO, Y. (2007). Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *Trends Anal Chem* 26 (6): 534-556.

ANJUM, A. & RIZVI, F. (1998). Use of second generation of quinolones in poultry. *Pakistan J Biol Sci* 1 (4): 392-395.

ARBOIX, M. & MARTÍN-JIMENEZ, 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. (ed) Madrid, España McGraw-Hill-Interamericana: 681-689.

ATEF, M.; EL-GENDI, A.; AMER, M. & ABB EL-ATY, A. (2001). Some pharmacokinetic data for danofloxacin in healthy goats. *Vet Res Comm* 25 (5): 367-377.

AVRAIN, L.; HUMBERT, F.; L'HOSPITALIER, R.; SANDERS, P.; VERNOZY-ROZAND, C. & KEMPF, I. (2003). Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: association with production type and antimicrobial use. *Vet Microbiol* 96: 267-276.

BAGGOT, J. (2007). Principles of antimicrobial drug bioavailability and disposition. En *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Giguere, S.; Baggot, D; Walker, R. & Dowling, P. (Eds) Ames, Iowa, USA: 45-80.

BAILAC, S.; BALLESTEROS, O.; JIMENEZ-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.

BELTRÁN, C. (2004). Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: utilidad práctica. *Rev Chil Infect* 21 (Supl 1): 39-44.

BERGOGNE-BEREZIN, E. (1996). Pharmacocinétique tissulaire des antibiotiques. Bases théoriques et nouvelles approches pharmacologiques. *Presse Med* 25 (8): 399-406.

BHANOT, S.; SINGH, M. & CHATTERJEE, N. (2001). The chemical and biological aspects of fluoroquinolones: reality and dreams. *Curr Pharm Design* 7: 313-337.

BHAVSAR, S. & THAKER, A. (2012). Pharmacokinetics of Antimicrobials in Food Producing Animals. En Noreddin, A. (ed), *Readings in Advanced Pharmacokinetics-Theory, Methods and Applications*. InTech Rijeka, Croatia: 157-178.

BOTSOGLOU, N. & FLETOURIS, D. (2001). *Drug Residues in Foods. Pharmacology, food safety, and analysis*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 1154p.

BOTTCHER, S.; BAUM, H.; HOPPE-TYCHY, T.; BENZ, C. & 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.

BROWN, S. (1996). Fluoroquinolones in animal health. *J vet Pharmacol Therap* 19: 1-14.

BROWN, S. (2003). Farmacocinética: distribución y destino de los fármacos en el organismo. En *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* por Adams, R. (Ed), 2e. Acribia S.A., Zaragoza, España: 13-56.

BUGYEI, K.; BLACK, W. & MC EWEN, S. (1999) Pharmacokinetic of enrofloxacin given the oral, intravenous and intramuscular routes in broiler chickens. *Can J Vet Res* 63: 193-200.

BURCH, D. & VALKS, M. (2002). Comparison of Minimal Inhibitory Concentrations (Mic) against chicken Mycoplasma of tiamulin and other antimicrobials and their concentrations in the blood. *Proceeding World Veterinary Poultry Association, Cairo, Egypt*: 322.

CANNAVAN, A. (2004) Capacity building for veterinary drug residue monitoring programmes in developing countries. *Joint FAO/WHO Technical Workshop on Residues of Veterinary Drugs without ADI/MRL. 24-26 August, Bangkok, Thailand*.

CARBAJAL, A. (2005). Hábitos de consumo de carne de pollo y huevos. Calidad nutricional y relación con la salud. *XLII Symposium Científico de Avicultura. Cáceres, España*: 50-72.

CARBAJAL, A. (1987). Hábitos alimentarios de la población española. Influencia de algunos factores socioeconómicos. Tesis doctoral. Departamento de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

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

CHANG, B. (2000). Regulatory analytical methods for veterinary drug residues. *2000 APEC China Seminar. Beijing, China*: 106-111.

CHARLESTON, B.; GATE, J.; AITKEN, I.; STEPHAN, B. & FROYMAN, R. (1998). Comparison of the efficacies of three fluoroquinolone antimicrobial agents, given as continuous or pulsed-water medication, against *Escherichia coli* infection in chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 83-87.

CHEN, Z.; FANG, K-F.; FANG, B. & SONG, Y. (1994). Antimicrobial and pharmacokinetic studies of fluoroquinolones in chickens. 6th Congress EAVPT, Edinburgh, Scotland: 209-210.

CHIZZOLINI, R.; ZANARDI, E.; DORIGONI, V. & GHIDINI, S. (1999). Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products. Trends Food Sci Technol 10: 119-128.

CHRISTODOULOU, E.A.; SAMANIDOU, V. & PAPADOYANNIS, I. (2007) Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. J Chromatogr B, 859: 246-255.

COOPER, A.; FULLER, J.; FULLER, M.; WHITTLESTONE, P. & WISE, D. (1993). *In vitro* activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against mycoplasmas of veterinary importance. Res Vet Sci 54: 329-334.

CORNICAN, M.; BUCKLEY, V.; CORBETT-FEENEY, G. & SHERIDAN, F. (2001). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from turkeys and hens in Ireland. J Antimicrob Chemother 48: 587-595.

CUÉ BRUGUERAS, M.; MOREJÓN GARCÍA, M. & SALUP DÍAZ, R. (2005). Actualidad de las quinolonas. Rev Cubana Farm 39 (1).

DAPCICH, V.; SALVADOR CASTELL, G.; RIBAS BARBA, L.; PEREZ, C.; ARANCETA BARTRINA, J. & SERRA MAJEM, L. (2004). Guía de la alimentación saludable. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (ed.). Madrid.

DE BACKER P. (2006). Comparative pharmacokinetics in avian species. J vet Pharmacol Therap 29 (Suppl. 1): 239-301.

DE JONG, A., STEPHAN, B. & SILLEY, P. (2012). Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* from healthy livestock and poultry in the EU. *J Appl Microbiol* 112 (2): 239-245

DESMONTS, M.; DUFOUR-GESBERT, F.; AVRRAIN, L. & KEMPF, I. (2004). Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains from French broilers before and after antimicrobial growth promoter bans. *J Antimicrob Chemother* 54: 1024-1030.

DING, H.; YANG, G.; HUANG, X. & ZENG, Z. (2008). Pharmacokinetics of difloxacin in pigs and broilers following intravenous, intramuscular, and oral single-dose applications. *J vet Pharmacol Therap* 31: 200-204.

DING, H.; ZENG, Z.; FUNG, K., CHEN, Z. & QIAO, G. (2001). Pharmacokinetic of sarafloxacin in pigs and broilers following intravenous, intramuscular, and oral single-dose applications. *J vet Pharmacol Therap* (24) 5: 303-308.

EL-GENDI, A.; EL-BANNA, H.; ABO NORAG, M. & GABER, M. (2001). Disposition kinetics of danofloxacin and ciprofloxacin in broiler chickens. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 108 (10): 429-434.

EMA (European Medicine Agency) (1998 a) Guidelines on validation of analytical procedures: methodology. VICH Topic GL2. CVM/VICH/591/98-Final.

ERRECALDE, C. (2010). Estudio farmacológico de levofloxacina en aves parrilleras. Tesis doctoral. Universidad Católica de Córdoba, Argentina: 119p.

FABREGA, A.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J.; SOTO, S. & VILA, J (2008). Quinolone resistance in the food chain. *Int J Antimicrob Agents* 31: 307-315.

FARRIER, D. (1999). PK Solution 2.0 Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis. Summit Research Svices, Ashland, USA.

FERNÁNDEZ, M. & MARSÓ, M. (2003). Estudio de la carne de pollo en tres dimensiones: valor nutricional, representación social y formas de preparación. Trabajo final Carrera Licenciatura en Nutrición. Instituto Universitario Cs. de la Salud, Fundación Barceló. Buenos Aires: 74p.

FRIIS, C. (1993). Penetration of danofloxacin into the respiratory tract tissues and secretions in calves. *AJVR* 54 (7): 1122-1127.

GARCÍA, H.; MAGNOLI, A.; WEYERS, A.; UGNIA, L.; LÜDERS, C.; PRIETO, G.; ERRECALDE, C. & GORLA, N. (2006). Residuos de enrofloxacin y ciprofloxacina en músculo de pollos parrilleros. *Rev Col Cienc Pec* 19, 1: 61-65.

GILES, C.; MAGONIGLE, R; GRIMSHAW, W; TANNER, C.; RISK C, LYNCH, M RICE, J. (1991). Clinical pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin in cattle. *J vet Pharmacol Therap* 14: 400-410.

GLISSON, J.: HOFACRE, C. & MATHIS, G. (2004). Comparative efficacy of enrofloxacin, oxytetracycline, and sulfadimethoxine for the control of morbidity and mortality caused by *Escherichia coli* in broiler chickens. *Avian Dis* 48 (3): 658-662.

GONZÁLEZ GÓMEZ, F. & NIETO MARTÍNEZ, J. (2007). Quinolonas y fluoroquinolonas. En *Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria* por San Andrés Larrea, M. & Boggio, J. (Ed). Intermédica, Buenos Aires: 249-281.

GOUDAH, A. & MOUNEIR, S. (2009). Disposition kinetics and tissue residues of danofloxacin in Muscovy ducks. *Br Poult Sci* 50 (5): 613-619.

GREENLEES, K. (2003). Animal drug human food safety toxicology and antimicrobial resistance-the square peg. *Int J Toxicol* 22 (2): 131-134.

GUPTA, R.; SHARMA, K.; SHARMA, R.; GUPTA, D.; SACHIN, T. & YADAV B. (2012). A review: pharmacokinetics application of fluoroquinolons. IJPPR 3 (2): 650-660.

HARITOVA, A. & LASHEV, L. (2009). Comparison of the pharmacokinetics of seven fluoroquinolones in mammalian and bird species using allometric analysis. Bulg J Vet Med 12 (1): 3-24.

HARITOVA, A.; RUSENOVA, N.; PARVANOV, P.; LASHEV, L. & FINK-GREMMELS, J. (2006). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of danofloxacin in turkeys. Vet Res Comm 30 (7): 75-89.

HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J.; BARBOSA, J.; COMPAÑÓ, R. & PRAT, M. (2002). Analysis of quinolone residues in edible animal products. J Chromatogr A, 945: 1-24.

HEKMAN, P. (1998). Withdrawal-time calculation program WT 1.4

HIGGS, J. & PRATT, J. (1988). Meat, poultry and meat products. En: Sadler M, Strain, J. & Caballero, B. (eds). Encyclopaedia of Human Nutrition. Academic Press.

HOFACRE, C. (2007). Antimicrobial drug use in poultry. En Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine por Guigere, S.; Prescott, J.; Baggot, D.; Walker, R. & Dowling P., 4 ed, Ames, Iowa, USA, Blackwell Publ.: 545-553.

HUANG, T-Z.; LIN, T. & WU, C. (2009). Antimicrobial susceptibility and resistance of chicken *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Pasteurella multocida* isolates. Avian Dis 53 (1): 89-93.

IDOWU, O. & PEGGINS, J. (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.

JENKINS, W. & FRIEDLANDER, L. (1988). The pharmacology of the quinolone antibacterial agents. *West Vet Conf Las Vegas*. Shawne, KS, Mobay Corporation, Animal Health Div: 5-15.

JENSEN, L.; ANGULO, F.; MØLBAK, K. & WEGENER, H (2008). Human health risks associated with antimicrobial use in animals. *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. Guardabassi, L.; Jensen, L. & Kruse, H. (ed). Garsington Road, Oxford, UK, Blackwell Publ: 13-26.

JERZSELE, A. (2012). Comparative Veterinary Pharmacokinetics. En Noreddin A (ed) *Readings in Advanced Pharmacokinetics - Theory, Methods and Applications*. InTech, Rijeka, Croatia: 179-198.

KALAISELVI, L.; SRIRANJANI, D.; RAMESH, S.; SRIMAM, P. & MATHURAM, L. (2006). Pharmacokinetics of ofloxacin in broiler chicken. *J vet Pharmacol Therap* 29: 185-189.

KINABO, L. & MCKELLAR, Q. (1989). Current models in pharmacokinetic: applications in veterinary pharmacology. *Vet Res Comm* 13: 14-157.

KNOLL, U.; GLÜNDER, G. & KIETZMANN, M. (1999) Comparative study of the plasma pharmacokinetics and tissue concentrations of danofloxacin and enrofloxacin in broilers chickens. *J vet Pharmacol Therap* 22: 239-246.

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

LACZAY, P.; SEMJÉN, G.; NAGY, G. & LEHEL, J. (1998). Comparative studies on the pharmacokinetics of norfloxacin in chickens, turkeys and geese after a single oral administration. *J vet Pharmacol Therap* 21: 161-164.

LASHEV, L.; DIMITROVA, D.; HARITOVA, A.; KANELOV, I.; MOUTAFCHIEVA, R. & DINEV, T. (2009). Gender related differences in the pharmacokinetics of antibacterials in poultry. Abstracts 11th European AVPT, Leipzig, Germany. *J vet Pharmacol Therap* 32 Suppl. 1: 12-16.

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

LEES, P. & SHOJAEI ALIABADI, F. (2002 a). Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus human. *Intern J Antimicrob Agents* 19: 269-284.

LEES, P. & SHOJAEI ALIABADI, F. (2002 b). Antimicrobianos que inhiben la función de los ácidos nucleicos. En *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* por Botana, L.; Landoni, F. & Martín-Jiménez, T. (ed) Madrid, España, McGraw-Hill-Interamericana: 484-492.

LEES, P.; SVENDSEN, O. & WIUFF, C. (2008). Strategies to minimise the impact of antimicrobial treatment on the selection of resistant bacteria. *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. Guardabassi, L.; Jensen, L. & Kruse, H. (ed). Garsington Road, Oxford, UK, Blackwell Publishing: 77-101

LISTER, S. (2011). Antibiotic use in the UK poultry industry-past, present and future. *Proceeding International Conference "Responsible use of antibiotics in animals"*. 14-16 November, the Netherlands: 60-61.

LÖHREN, U.; RICCI, A. & CUMMINGS, T. (2008). Guidelines for antimicrobial use in poultry. *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. Guardabassi, L.; Jensen, L. & Kruse, H. (ed). Garsington Road, Oxford, UK, Blackwell Publishing: 126-142.

LOZANO, M. & TRUJILLO, M. (2012). Chemical residues in animal food products: an issue of public health. En Public Health-Methodology, Environmental and Systems Issues. Maddock, J. (ed). Intech, 163.

LUBER, P.; WAGNER, J.; HAHN, H. & BARTELT, E. (2003). Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2001-2002 from poultry and humans in Berlin, Germany. Antimicrob Agents Chemother 47: 3825-3830.

LYNCH, M.; RICE, J.; ERICSON, J.; MOSHER, F.; MILLAS, W.; HARRAN, L.; FRAME, G.; ILLYES, E.; MCGUIRK, P. & JEFSON, M. (1994). Residue depletion studies on danofloxacin in the chicken. J Agric Food Chem 42: 289-294.

MC KELLAR, Q.; GIBSON, I. & MC CORMACK, R. (1998). Pharmacokinetics and tissue disposition of danofloxacin in sheep. Biopharm Drug Dispos 19 (2): 123-129.

MARASCHIELLO, C.; CUSIDÓ, E.; ABELLÁN, M. & VILAGELIU, J. (2001). Validation of an analytical procedure for the determination of the fluoroquinolone ofloxacin in chicken tissues. J Chromatogr B 754: 311-318.

MÁRQUEZ LARA, D. (2008). Residuos químicos en alimentos de origen animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia. Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria 9 (1): 124-135.

MARTÍNEZ, M.; DE LA CRUZ, C.; MARTÍNEZ, M.; CABALLERO, V.; ARES, I.; CASTELLANO, V.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. & ANADÓN, A. (2006 a). Oral bioavailability of flumequine in chickens. J vet Pharmacol Therap 29 (Suppl. 1): 239-301.

MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P. & WALKER, R. (2006 b). Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. Vet J 172: 10-28.

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.

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.

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.

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

NELSON, J.; CHILLER, T.; POWERS, J. & ANGULO, F. (2007). Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story. *Clin Infect Dis* 44: 977-980.

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.

PAGE, S. & GAUTIER, P. (2012). Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 31 (1): 145-188.

PAIGE, J. & TOLLEFSON, L. (2003). Veterinary products: residues and resistant pathogens. En *Food safety: contaminants and toxins*. D'Mello, J. (ed). Edinburgh, UK. CAB International: 293-313.

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

PAPICH, M. & RIVIERE, J. (2003). Fluoroquinolonas. En Farmacología y Terapéutica Veterinaria por Adams, R. (ed), 2e. Acribia, Zaragoza, España: 961-980.

POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J. & SEMENIUK, S. (2001). Effects of the matrix and sample preparation on the determination of fluoroquinolone residues in animal tissues. J Chromatogr A, 914: 89- 94.

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.

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. Sasidhar, P. (ed). Izatnagar, India: 211-217.

REEVES, P. (2010). Drug Residues. En Comparative and Veterinary Pharmacology, F. Cunningham et al. (eds.), Handbook of Experimental Pharmacology 199, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 265-290.

REIG, M. & TOLDRÁ, F. (2009). Veterinary Drug Residues. En Handbook of processed meats and poultry análisis. Nollet, L. & Toldrá, F. (ed). Boca Raton London- New York, CRC Press: 647-665.

REYES-HERRERA, I.; SCHNEIDER, M.; BLORE, P. & DONOGHUE, D. (2011). The relationship between blood and muscle samples to monitor for residues of the antibiotic enrofloxacin in chickens. *Poultry Sci* 90: 481-485.

RICHEZ, P.; PEDERSEN MORNER, A.; DE JONG, A. & MONLOUIS, J. (1996) Plasma pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin and enrofloxacin in pigs. *J vet Pharmacol Therap* 20 (suppl. 1): 41-42.

RIVIERE, J. & SUNDLOF, S. (2003). Residuos químicos en los tejidos comestibles animales. En *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Adams, R. (Ed), 2e. Acribia S.A., Zaragoza, España: 1249-1258.

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

SCHOLAR, E. (2002). Fluoroquinolones: past, present and future of a novel group of antibacterial agents. *Am J Pharm Educ* 66: 164-172.

SCHWARZ, S. & CHASLUS-DANCLA, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res* 32: 201-225.

SHARMA, R. & COULOMBE, R. (1996). Pharmacokinetic risk assessment. En *Toxicology and risk assessment, principles, methods, and applications*. Fan, A. & Chang, L. (Ed). Marcel Dekker, NY: 81-99.

SHARMA, P.; JAIN, A. & JAIN, J. (2009). Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research* 66, 6: 587-604.

SHOJAEI ALIABADI, F. & LEES, P. (2003). Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of danofloxacin in the calf. *Res Vet Sci* 74 (3): 247-259.

SMITH, J. & FRATAMICO, P. (2010). Fluoroquinolone resistance in campylobacter. *J Food Prot* 73 (6): 1141-1152.

STRELEVITZ, T. & LINHARES, M. (1996). Simultaneous determination of danofloxacin and N-desmethyl-danofloxacin in cattle and chicken edible tissues by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatography B*, 675: 243-250.

SUMANO LOPEZ, H. & GUTIERREZ OLVERA, L. (2010). *Farmacología clínica en aves comerciales*, 4ta ed., Mc Graw Hill Interamericana, México: 703p.

TOUTAIN, P. & BOUSQUET-MÉLOU, A. (2004 a). Clearance. *J vet Pharmacol Therap* 27: 415-425.

TOUTAIN, P. & BOUSQUET-MELOU, A. (2004 b) Volumes of distribution. *J vet Pharmacol Therap* 27: 441-453.

TOUTAIN, P. & BOUSQUET-MELOU, A. (2004 c) Bioavailability and its assessment. *J Vet Pharmacol Therap* 27: 455-466.

TOUTAIN, P.; FERRAN, A. & BOUSQUET-MELOU, A. (2010). Species Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Comparative and Veterinary Pharmacology, Handbook of Experimental Pharmacology* 199. Cunningham, F. et al. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 19-48.

VAN DEN BOGAARD, A.; LONDON, N.; DRIESSEN, C. & STOBBERINGH, E. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother* 47: 763-771.

VERDON, E.; COUDEDOR, 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. *JAOAC Int* 88: 1179-1192.

VERMEULEN, B.; DE BACKER, P. & REMON, J. (2002). Drug administration to poultry. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 795-803.

WALKER, R. & DOWLING, P. (2007). Fluoroquinolones. En *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Giguere, S.; Baggot, D.; Walker, R. & Dowling, P. (Eds). Blackwell Publ., 4ta ed., Ames, Iowa, USA: 263- 284.

WALKER, R. & GIGUÈRE, S. (2007). Principles of antimicrobial drug selection and use. En *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Giguere, S.; Baggot, D.; Walker, R. & Dowling, P. (Eds). Blackwell Publ., 4ta ed., Ames, Iowa, USA: 107-117.

YAGÜE, A. (2005). Característica de la demanda de pollo en España y otros países. *Jornadas profesionales de avicultura de carne*. Valladolid, España. 25-27 Abril.

ZENG, Z.; DENG, G.; SHEN, X.; RIZWAN-UI-HAQ, M.; ZENG, D. & DING, H. (2011). Plasma and tissue pharmacokinetics of danofloxacin in healthy and in experimentally infected chickens with *Pasteurella multocida*. *J vet Pharmacol Therap* 34 (1): 101-104.

ZHONG X, H TONG, X CONG, L FENG (2001). Studies in the pharmacokinetic and bioavailability of danofloxacin in chickens. *Heilongjinag J Anim Sci* 9.

73213

U.N.R.C
Biblioteca Central



73213