

73985

**TICLE, MATIAS N.**

cuantificacion de ma

2015

**73985**

100  
100

100

100  
100



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

**CUANTIFICACION DE MARBOFLOXACINA Y DETERMINACION DEL  
PERIODO DE RETIRO EN LECHE CAPRINA**

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

**MÉDICO VETERINARIO MATIAS N. TICLE**

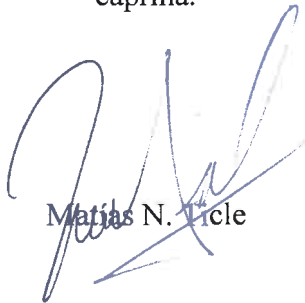
**DIRECTOR: DR. CARLOS ERRECALDE**

**RÍO CUARTO 2015**

7-285

<b>MFN:</b>
<b>Clasif:</b> T. 952

Cuantificación de Marbofloxacin y determinación del periodo de retiro en leche caprina.




Matias N. Ticle



Dr. Carlos Errecalde.  
Director

Tribunal Evaluador:



Prof. M.Sc. Laura Ugnia



Prof. M.Sc. Pascual Dauria

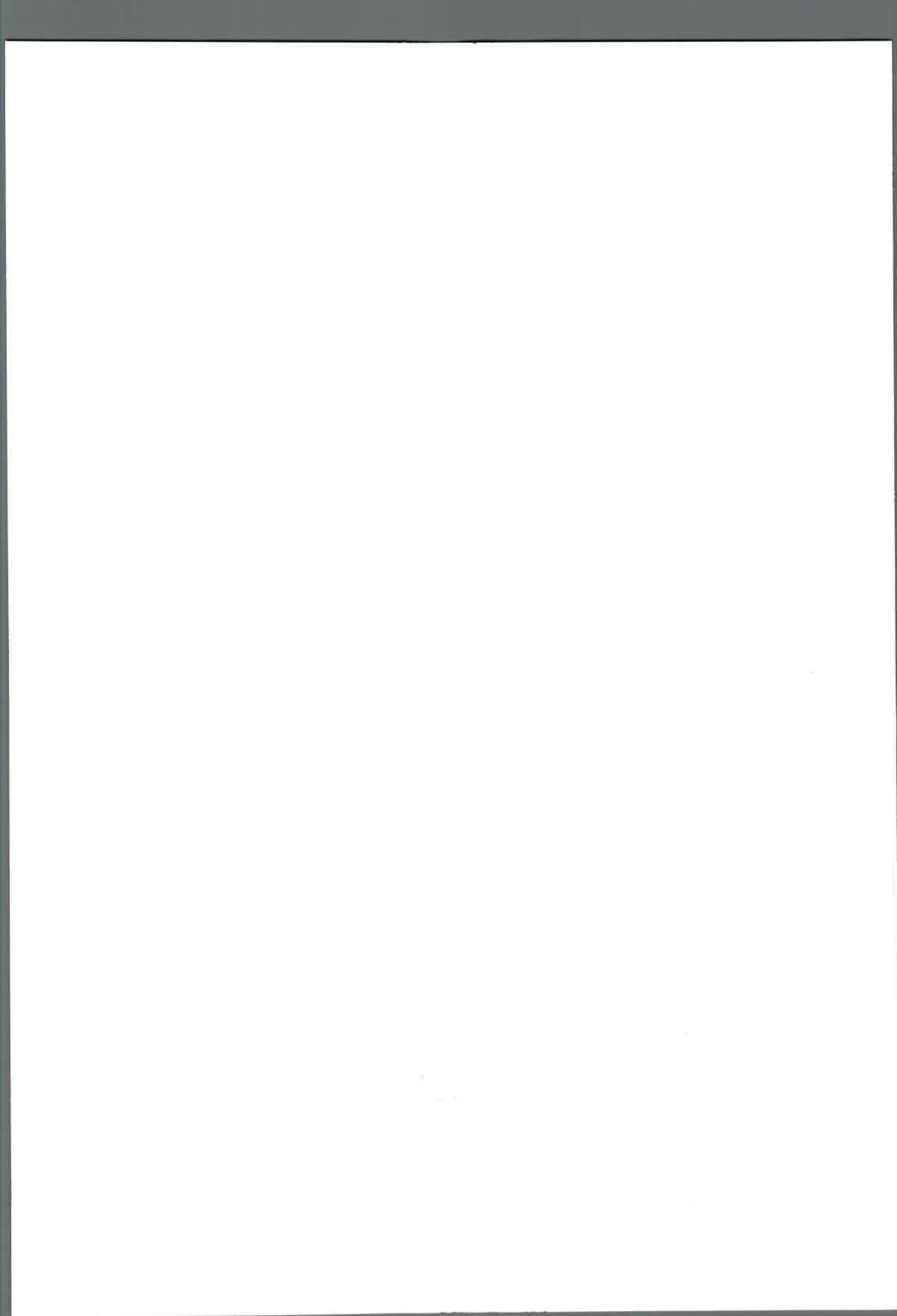


M.Sc. Eduardo Riveros Morcillo



Prof. M.Sc. Rubén Davicino

Director Maestría en Inocuidad y Calidad de Alimentos



**DEDICATORIA.**

A mi esposa e hijo, quienes me ayudaron y me dieron el amor para lograr esta carrera.

**AGRADECIMIENTOS.**

A mi familia, que sin su apoyo permanente no podría haber realizado esta hermosa carrera.

Al Dr. Carlos Errecalde, profesor y Director de tesis, por su incommensurable ayuda en cada etapa del trabajo, haciendo posible finalizar el trabajo residiendo en otra provincia.

Al M.Sc. Guillermo Prieto, por su tiempo, dedicación y amistad a la par de Carlos como un Co- Director.

Para M.Sc. Rosendo Liboa, quien me llevo a ser parte de este gran y reconocido equipo de trabajo de la Cátedra de Farmacología.

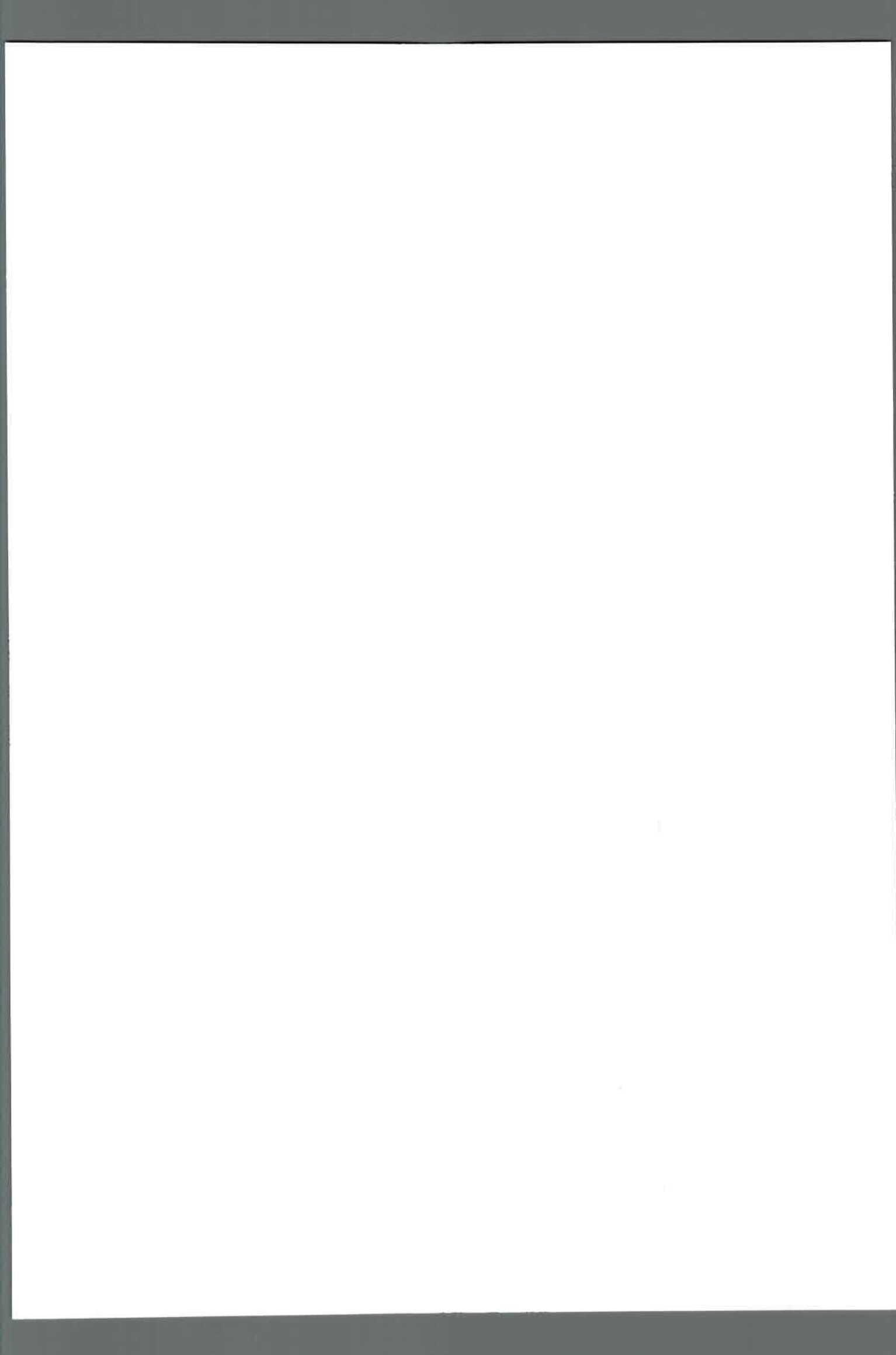
Al M.Sc. Rubén Davicino, profesor y Director de Maestría y al equipo docente de la Cátedra de Bromatología, por abocar su tiempo de manera exitosa en la gestión administrativa y educativa de la Maestría.

A mi compañera Ludy Rodríguez Triana y Bárbara Bourel por su colaboración en las tareas de laboratorio.

A mi tía Lic. Susana Benítez por su dedicación en el trabajo de foniatría para la defensa de tesis.

A mis compañeros de cursado, quienes me hicieron pasar 2 años de carrera inolvidables, compartiendo horas de clases, trabajos finales y charlas que llevare en mis recuerdos.

A la Facultada de Agronomía y Veterinaria (U.N.R.C.) por permitirme ser parte como alumno, obteniendo mis dos títulos de grado y posgrado, logrando competencias y habilidades que forjan mi futuro profesional.

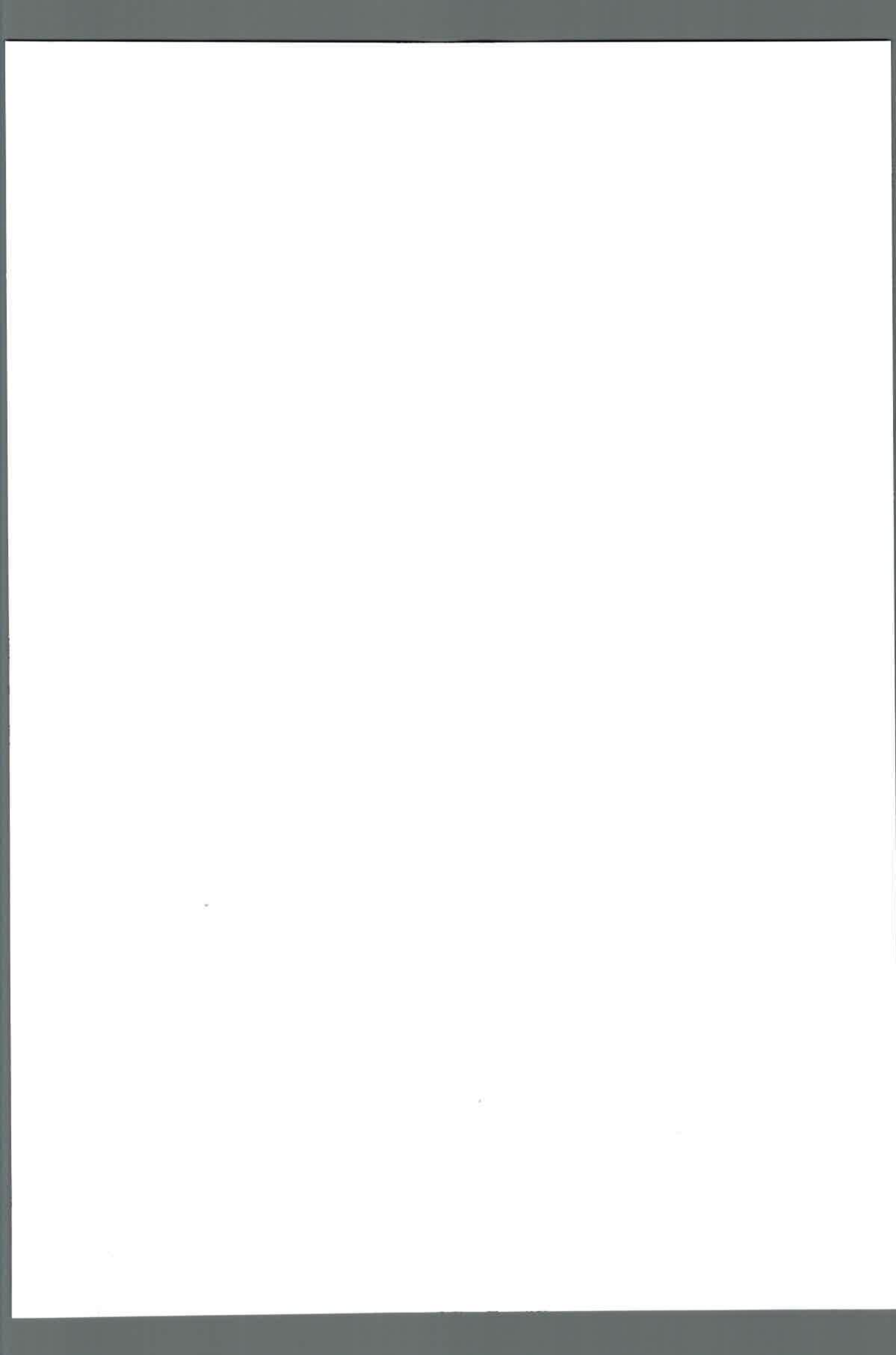




<b>Indice de contenidos</b>	<b>Pág.</b>
Dedicatoria	3
Agradecimientos	3
Resumen	6
Summary	8
Introducción	10
Marco Teórico	12
Producción de leche caprina	12
Leche caprina, calidad y residuos	17
Las Fluoroquinolonas	18
Generalidades	18
Relación estructura-actividad	19
Farmacodinamia	21
Resistencia bacteriana	21
Aspectos Toxicológicos	22
Farmacocinética	23
Antecedentes cinéticos de fluoroquinolonas en cabras lactantes	25
Marbofloxacin	29
Estructura química	29
Propiedades microbiológicas	31
Antecedentes cinéticos de marbofloxacin en los animales domésticos	31
Efectos adversos de la marbofloxacin	35
Usos clínicos de la marbofloxacin	35
Residuos.	38
Problemática de los residuos farmacológicos	38
Límites máximos de residuo y periodo de supresión	40
Estudios de residuos.	43
Métodos analíticos para la determinación de fluoroquinolonas	44
Hipótesis	48
Objetivos	48

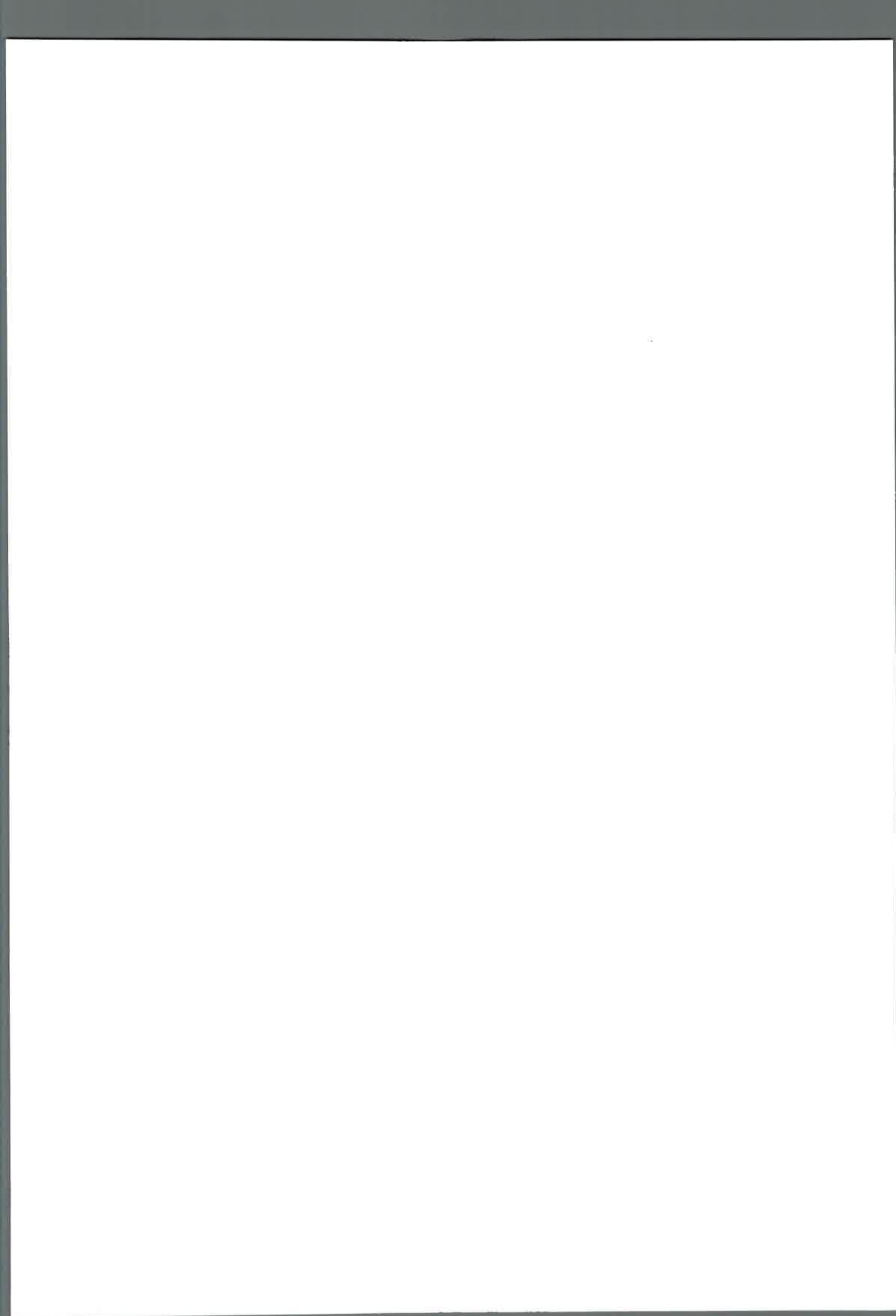


Materiales y métodos	48
Equipos y material de laboratorio	48
Material farmacológico y reactivos	49
Animales	49
Lugar de realización y material biológico.	50
Soluciones	51
Separación y cuantificación	51
Software	52
Tratamiento de las muestras	52
Procedimiento de separación y cuantificación	53
Cálculo de concentraciones de marbofloxacina	53
Análisis farmacocinético	54
Cálculo del período de retiro en leche (Pr)	54
Validación del método analítico	55
Resultados	57
Discusión	62
Conclusiones	69
Bibliografía	70

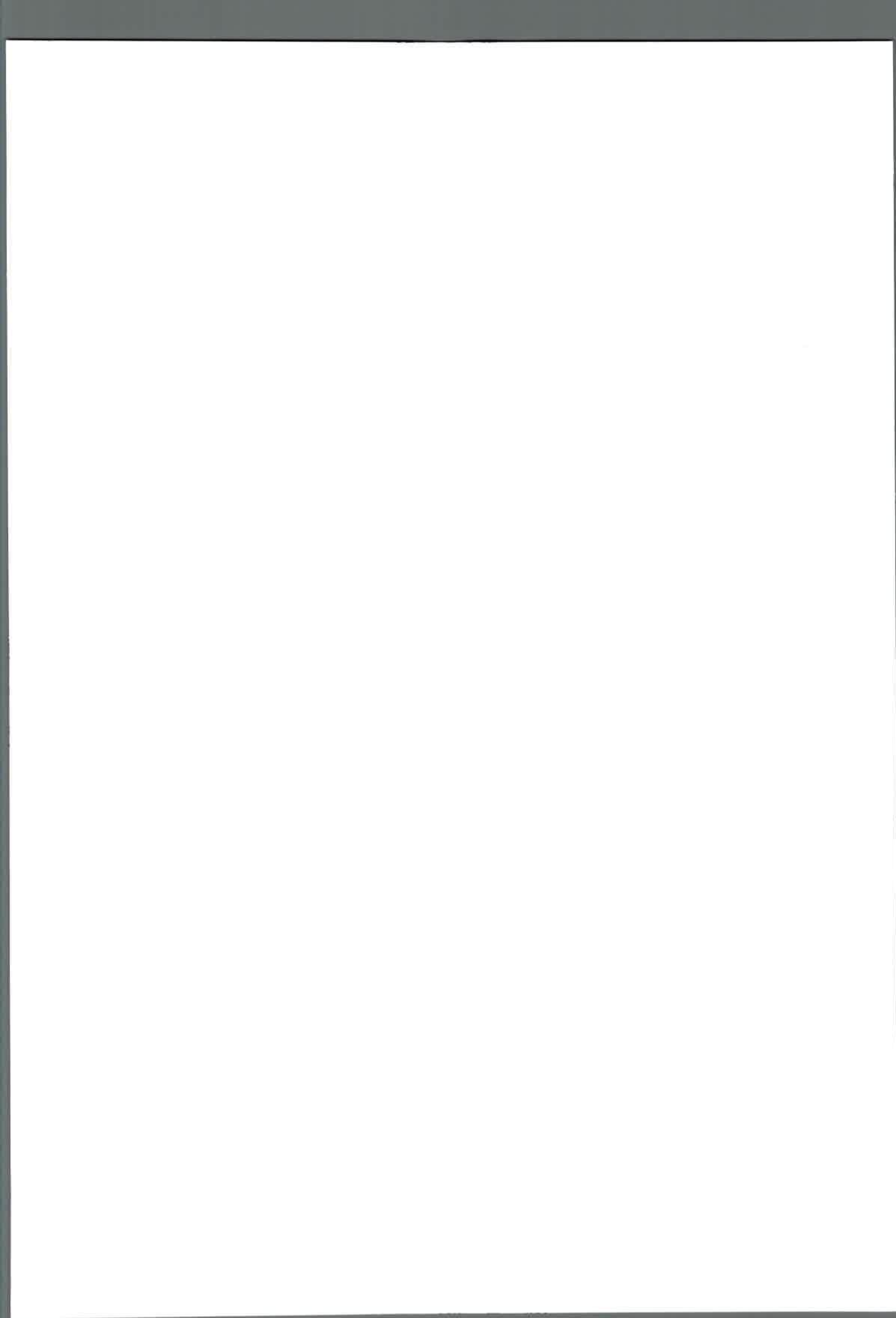


## RESUMEN

Marbofloxacin es una fluoroquinolona sintética aplicada solamente en animales domésticos con apreciables propiedades farmacocinéticas y microbiológicas. Este estudio se realizó para determinar parámetros cinéticos de marbofloxacin en cabras lactantes, establecer su disposición láctea y sugerir un periodo de retiro. En un diseño cruzado de tratamiento se utilizaron 6 hembras caprinas criollas en lactación de  $40 \pm 3.1$  Kg. de peso corporal, clínicamente sanas agrupadas en lote A (N=3) y lote B (N=3). El lote A recibió 2 mg/Kg. de marbofloxacin (Marbocyl 10%, Vetoquinol, España) por vía intravenosa mientras el lote B idéntica dosis por vía subcutánea. Dos semanas después se intercambiaron los tratamientos. En distintos tiempos hasta las 24 horas siguientes post aplicación se tomaron muestras de sangre y, en la aplicación subcutánea, de leche hasta las 120 horas. El ensayo preparativo consistió en la extracción líquido-líquido del analito utilizando 200 mL de muestra, 200 mL de agua, 800 mL de metanol y enrofloxacin como estándar interno. El conjunto se sometió a agitación por vortex durante 30" y luego a centrifugado a 13500 rpm a 4°C durante 25'. La separación y cuantificación se realizó por HPLC mediante elusión isocrática en fase reversa utilizando columna C-18 y lectura en detector de fluorescencia establecido a 295 nm de excitación y 490 nm de emisión, fase móvil compuesta por agua, acetonitrilo y trietilamina (79:19:1 v/v) ajustada a pH 3. El método de HPLC permitió determinar niveles del antimicrobiano en plasma y leche hasta 48 y 96 horas, respectivamente. Los datos de concentraciones plasmáticas versus tiempo se analizaron por el software no compartimental PK Solution 2.0 con el propósito de calcular parámetros cinéticos robustos. La biodisponibilidad de marbofloxacin por aplicación subcutánea alcanza el  $77.16 \pm 16.33$  %. La información obtenida indica pronta absorción, amplia distribución a tejidos y extensa permanencia en el organismo. Los datos de concentraciones lácteas versus tiempo se aplicaron al programa PK Solution 2.0 con el propósito de estimar parámetros cinéticos en la leche. Los resultados obtenidos revelan que la disposición en leche por aplicación subcutánea arroja cocientes ABC leche/plasma de  $3.3 \pm 2.3$ ; el  $C_{m\acute{a}x}$  lácteo es similar al plasmático pero más tardío y el antimicrobiano exhibe mayor permanencia en leche que en plasma. Las concentraciones residuales de marbofloxacin en la leche versus tiempo se aplicaron al programa WTM 1.4, considerando un LMR establecido en leche caprina en 75 µg/Kg. para marbofloxacin, con el objetivo de establecer un periodo de resguardo, estimado 61.8 horas, compatible con las



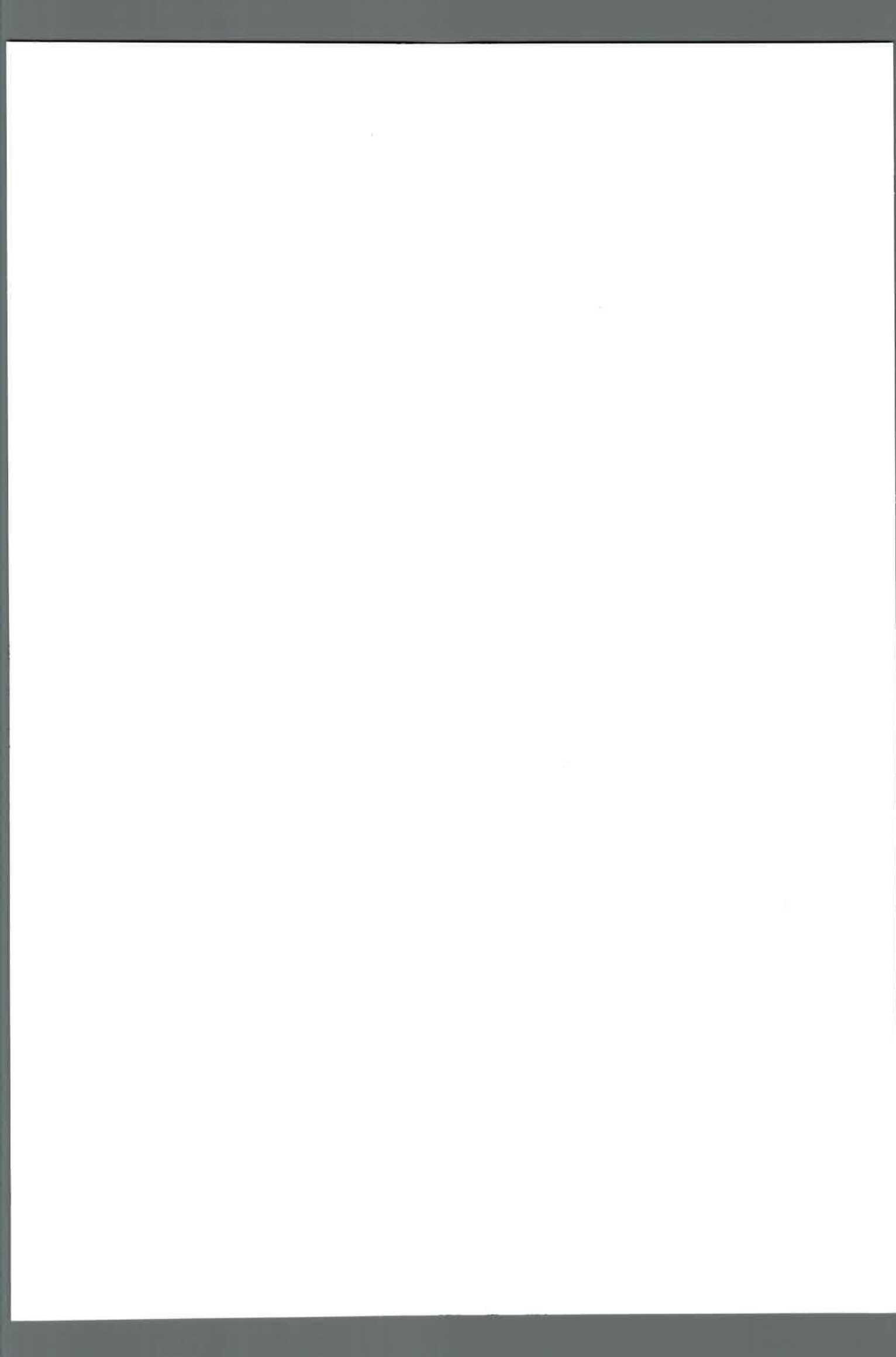
condiciones de explotación y las recomendaciones de la industria farmacéutica veterinaria.



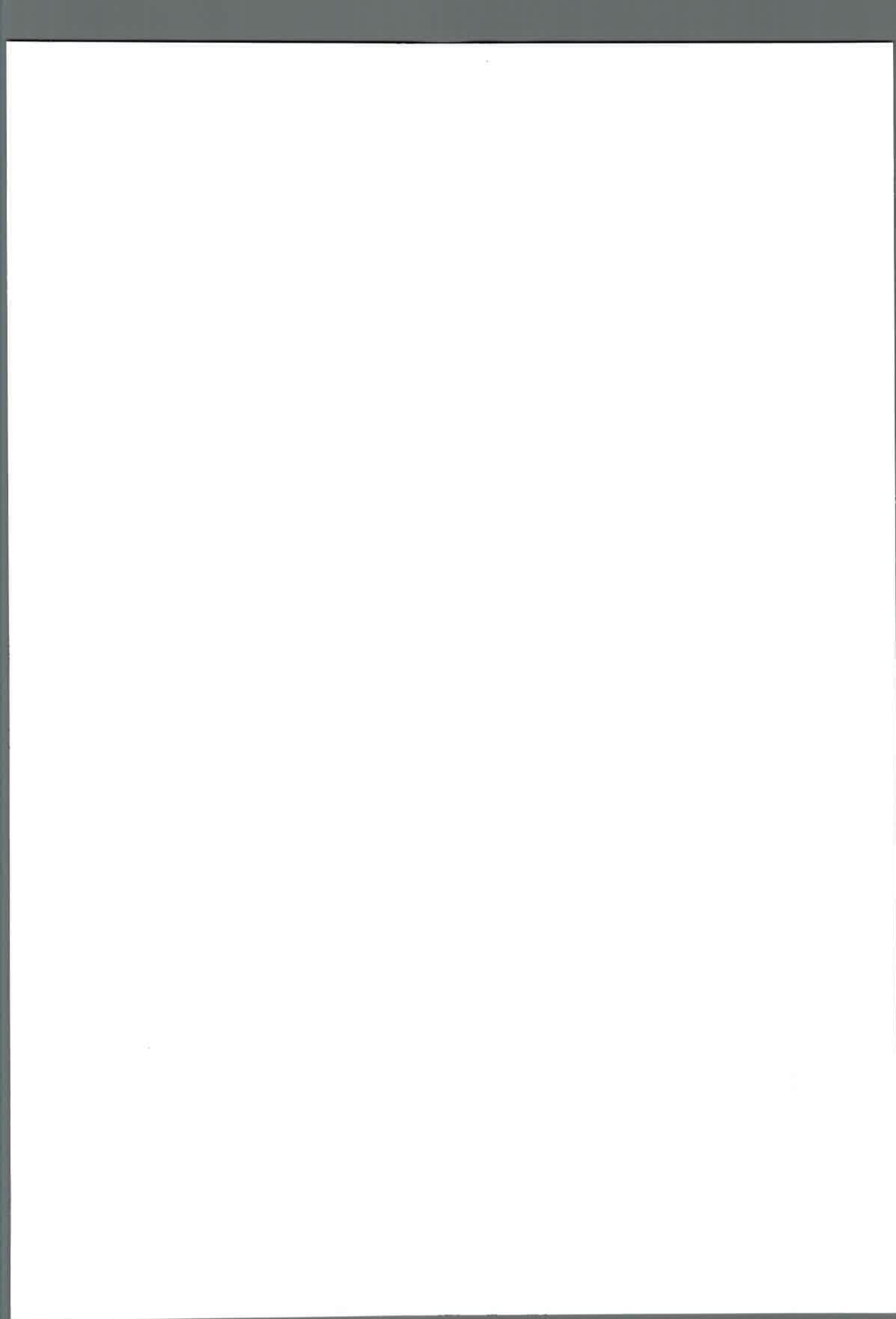


## SUMMARY

Marbofloxacin is a synthetic fluoroquinolone applied only to domestic animals with considerable pharmacokinetic and microbiological properties. This study has been carried out to determine kinetic Marbofloxacin parameters in lactating goats, to establish its milky disposition and to suggest a withdrawal period for milk. In a crossover design treatment 6 (six) female Creole goats in lactation periods of 40+3.1kg of body weight were used, clinically healthy ones were grouped in lot A (N=3) and Lot B (N=3). The lot received 2 mg/kg of Marbofloxacin (Marbocyl 10%, vetoquinol, España) by an intravenous procedure whereas lot B received the same dose subcutaneously. Two weeks later, the treatments were exchanged. Blood samples were taken at different moments until 24 hours post application and in the subcutaneous application of milk up to 120 hours. The preliminary assay consisted of a liquid-liquid extraction of analyte using 200ml of sample, 200 ml of water, 800 ml of methanol and enrofloxacin as inter standard. The group was submitted to an agitation via vortex for 30 second and then to a spin of 13500 rpm to 4° C for about 25 minutes. The separation and quantification has been done by HPLC through isocratic elution in reverse phase using C-18 column and interpretation in detector of fluorescence established to 295nm of agitation and 490nm of emission, mobile phase composed of water, acetonitrile and triethylamine (79:19:1 v/v) adjusted to a ph3. The HPLC method allows to determine antimicrobial levels in plasma and milk until 48 and 96 hours respectively. Plasma concentration data versus time were analyzed by the non –compartmental software PK solution 2.0 with the purpose of calculating kinetic robust parameters. The bio-availability of Marbofloxacin per subcutaneous application reaches the 77.13 + 16.33%. The received information indicates rapid absorption, wide distribution to tissues and an extended stay in the organism. The lactating concentration data versus time were applied to the PK solution2.0 program with the purpose of estimating kinetic parameters in milk. The results obtained reveal that the disposition in milk per subcutaneous application sheds ratios ABC milk/plasma of 3.3+2.3; the milky c-max is similar to plasma but later and the antimicrobial exhibits greater stay in milk than in plasma. The residuals of Marbofloxacin in milk versus time were applied to the WTM 1.4 program, considering a LMR recognized in goat milk in 75ug /kg for Marbofloxacin, with the purpose of setting a guard period estimated in 61.8 hours,



compatible with the exploitation conditions and the recommendations of the pharmaceutical veterinary industry.



## INTRODUCCIÓN

El constante incremento de la población mundial demanda un fuerte compromiso de los diferentes sectores involucrados en la cadena alimentaria, debido que el crecimiento poblacional excede la producción de alimentos frescos y elaborados.

La necesidad creciente de alimentos y el incremento en la manifestación de enfermedades transmitidas por ellos, determina que los consumidores exijan permanentemente mejor calidad y además, inocuidad para proteger la salud humana (Riveros Morcillo, 2008).

Con el propósito de compensar estas demandas, los sectores involucrados modificaron los viejos paradigmas de producción y comercialización, donde explotaciones extensivas y de venta local o regional, paulatinamente se transformaron en sistemas de producción animal intensivos, caracterizadas por mayor número de animales por unidad de superficie y con un mercado de ventas globalizado (Moreno et al., 2000; Lozano & Arias, 2008).

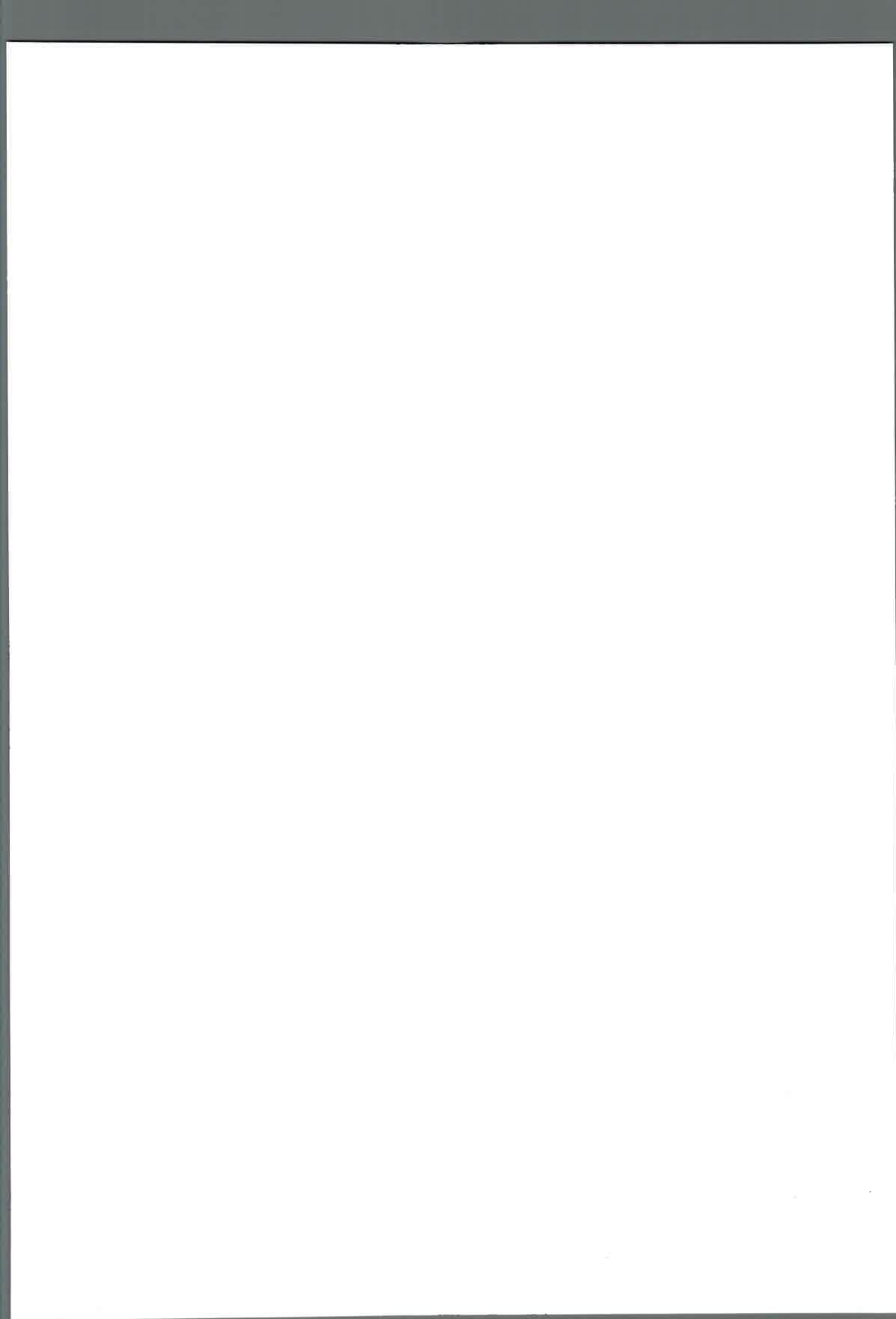
Con frecuencia, estas nuevas condiciones de explotación predisponen para el desarrollo de enfermedades infecciosas (Díez & Calderón, 1997), circunstancia que inevitablemente contempla la aplicación terapéutica de antimicrobianos (Dawson, 2005).

El uso de antimicrobianos ha sido, desde su inicio, una herramienta muy útil en Medicina Veterinaria. Esta situación destaca la relevancia actual de los conocimientos farmacológicos de los agentes aplicados debido a la expresión de resistencia bacteriana.

Asímismo, cada fármaco nuevo o que se implemente en otra especie animal, debe ser evaluado para determinar su comportamiento y su aptitud sobre el animal: son requisitos indispensables establecer parámetros cinéticos para interpretar el destino del fármaco en el organismo y sus antecedentes toxicológicos para establecer los niveles máximos de residuos (LMRs) en los alimentos (Woodward, 1992; Girardi & Odore, 2008).

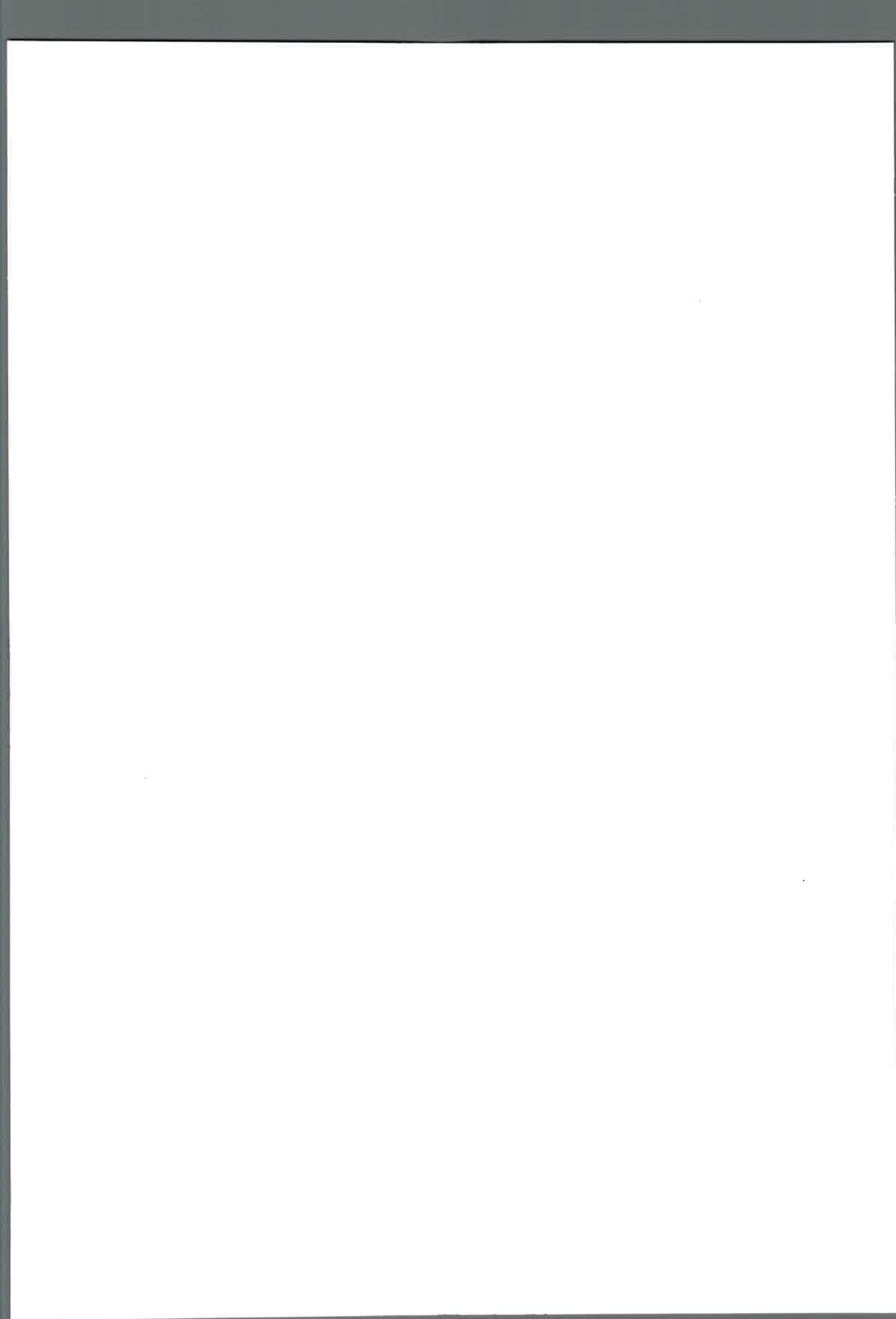
Estas herramientas permiten hacer un uso racional del fármaco, y con la información obtenida, determinar un periodo de espera para resguardar la salud de los consumidores (Woodward, 1992).

Este estudio intenta describir y comparar el comportamiento farmacocinético plasmático de marbofloxacina en cabras productoras de leche luego de la aplicación única por las vías endovenosa y subcutánea, y cuantificar su ingreso a la leche.



La información obtenida permitirá determinar, por su tiempo de eliminación, el periodo de retiro del fármaco antes de ser ordeñado para su consumo.

Asimismo, se procura validar una metodología analítica por HPLC para determinar marbofloxacina en leche caprina, sustentadas en la técnica desarrollada para líquidos biológicos por Bottcher et al., (2001), con modificaciones según sugerencias de Aerts et al. (1995), Schenck & Callery (1998) y Hernández-Arteseros et al., (2002).





## MARCO TEORICO

### Producción de leche caprina

La especie caprina (*Capra hircus*), dotada de extraordinaria adaptación ambiental y geográfica y óptima capacidad para transformar alimentos de baja calidad en carne, leche o cuero, fue una de las primeras especies domesticadas (Haenlein, 2007; Silanikove et al., 2010), en sus comienzos destinada para producir carne y cuero y más tarde, leche (Haenlein, 2007; Smith & Sherman, 2009).

La cría de cabras ha desempeñado un papel cultural muy importante en la historia de las civilizaciones; el vínculo entre los humanos y estos pequeños rumiantes fue un factor determinante en el modo de vida de la mayoría de comunidades alrededor del mundo; el caprino fue la primera especie domesticada por el hombre, ya que existen referencias sobre su cría y manejo desde hace 10 000 años A. C. en la región del Darech, hoy territorio de Irán (Haenlein, 2007).

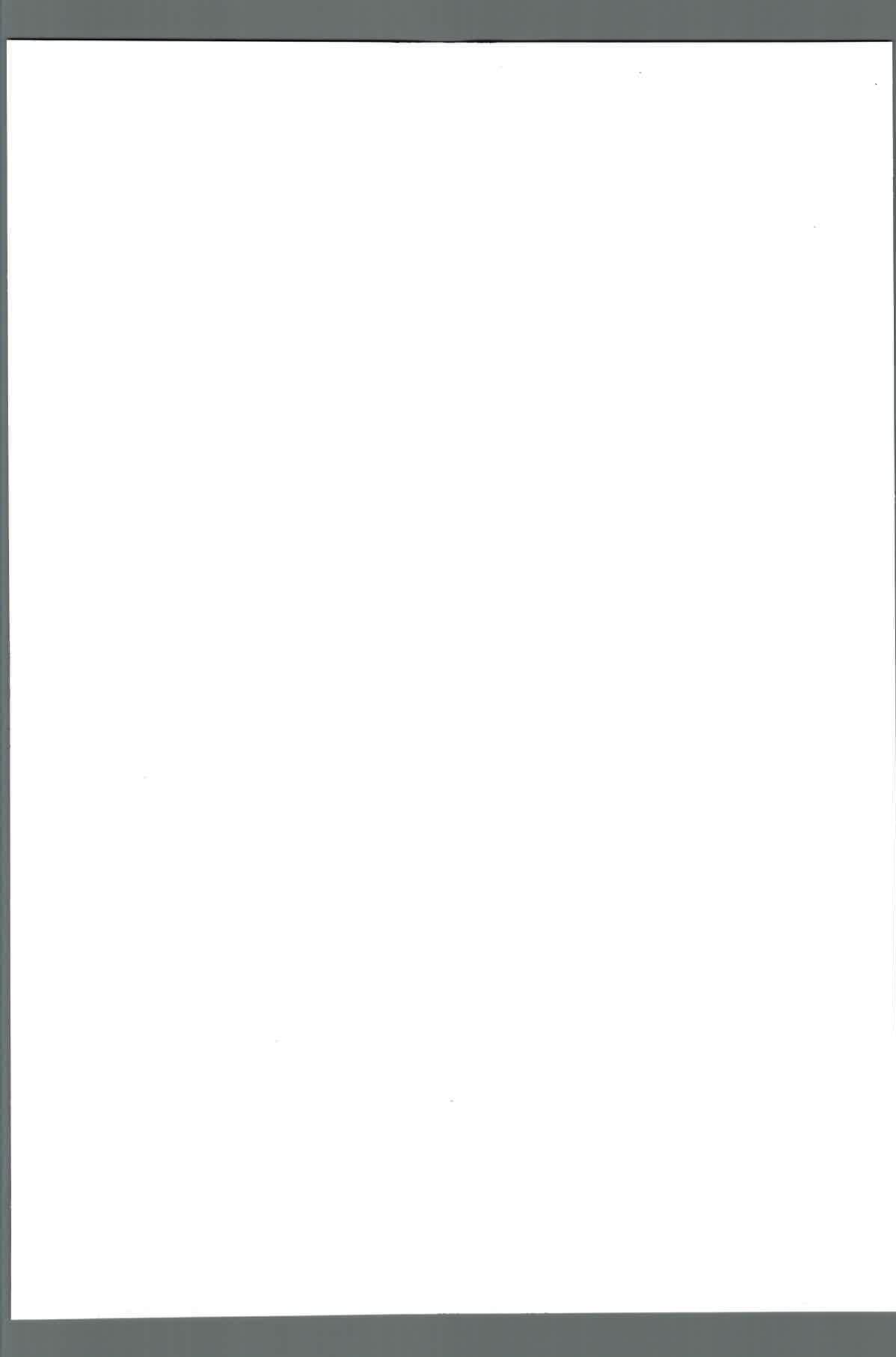
En los últimos años, la cría de caprinos se ha extendido en los países en desarrollo en áreas donde son importantes la producción de subsistencia y en varios países del primer mundo, como Francia, Italia, Grecia, Estados Unidos, Canadá y Alemania y en los países del Oriente Medio, las explotaciones lecheras caprinas son parte vital de la economía nacional (Juárez & Ramos, 1986; Silanikove et al., 2010; García et al., 2014).

La leche caprina continuó desempeñando un papel importante en la nutrición humana hasta la civilización moderna (Hatziminaoglou & Boyazoglu, 2004), de modo tal que en la actualidad comprende el 2 % de la producción mundial de leche (Motarjemi & Lelieveld, 2014).

En dichos, desde hace años se estimula la producción láctea destinada principalmente a la elaboración de quesos de calidad mediante la aplicación de modernos recursos tecnológicos durante el proceso de fabricación (Park & Haenlein, 2006; Park et al., 2007; Silanikove et al., 2010).

En la República Argentina las cabras de raza Blanca Celtibérica fueron introducidas por los españoles, particularmente en las provincias de Córdoba y Tucumán, para constituir la población caprina en el noroeste argentino (De Gea et al., 2005).

Históricamente, este ganado fue subestimado debido que su explotación es concretada por productores minifundistas de escasos recursos socioeconómicos y



culturales, en general dedicados a la producción de cría para carne con el propósito de subsistir (De Gea et al., 2005).

Según Cofecyt, en el año 2008 Argentina registró 4.2 millones de cabras, distribuidas en las provincias de Santiago del Estero (17.4%), Neuquén (16.7%) y Mendoza (16.6%). En la provincia de Córdoba fueron contabilizados 135.400 animales en el año 2011, según el Plan Estratégico Alimentario y Agroindustrial (PEA, 2011), aún la provincia contempla dentro de sus prioridades productivas agropecuarias al sector caprino, con el objetivo de promover el desarrollo económico y socio-regional.

En Argentina, los emprendimientos lecheros son estacionales, desarrollados por pequeños y medianos productores con limitada capacidad de inversión, acotado volumen de producción y limitada industrialización.

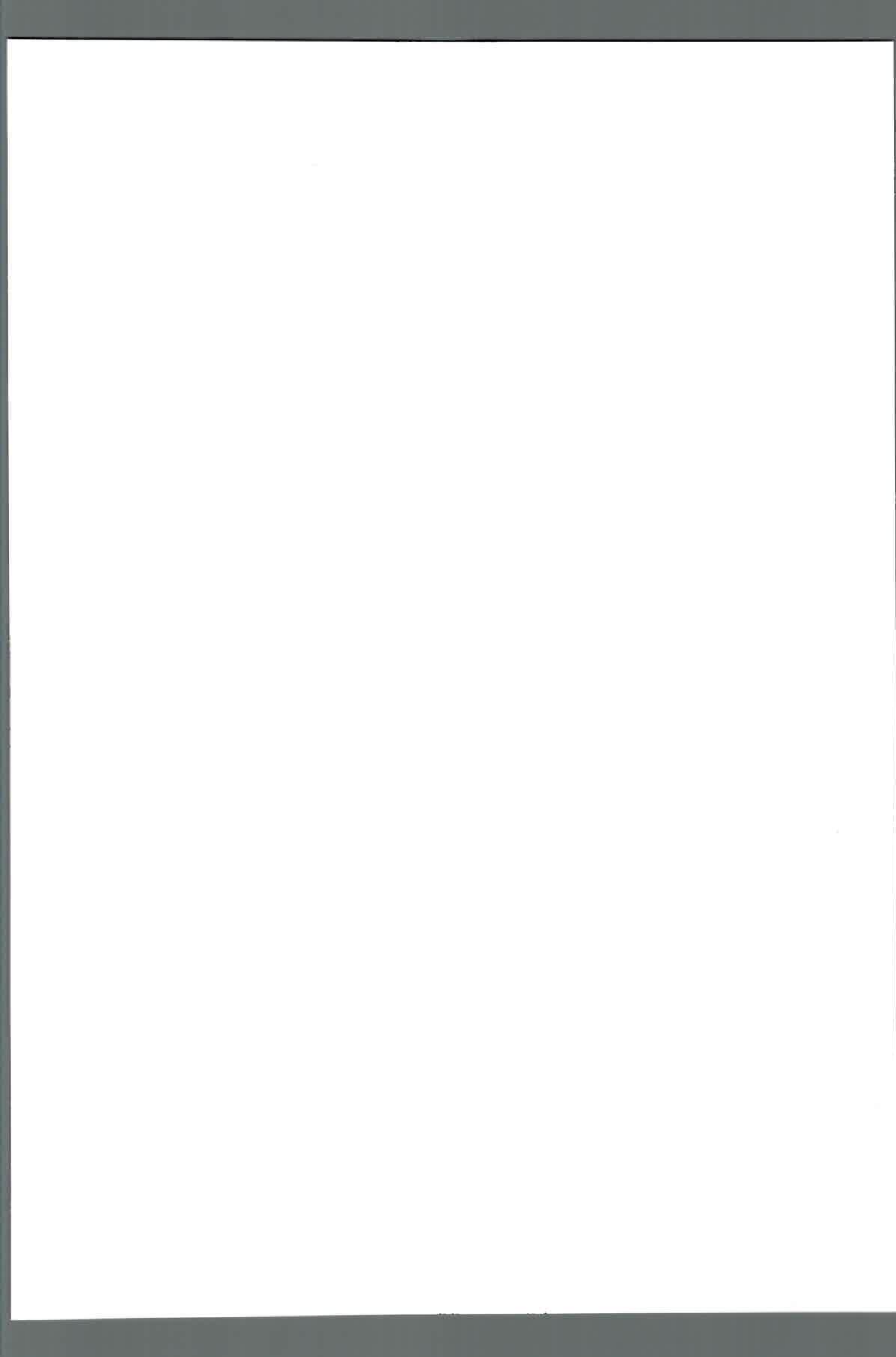
Los antecedentes indican que en nuestro país se procesan alrededor de 1.5 millones de litros de leche anuales destinadas a la producción de 150 toneladas de queso de cabra, pero el consumo se orienta principalmente a la leche como alternativa en individuos que padecen alergias alimentarias (Cofecyt, 2008).

La explotación comercial de leche caprina constituye una actividad nueva, no consolidada y con posibilidades de expansión, sobre todo en el norte cordobés bajo el estímulo del Plan Caprino promovido por el gobierno provincial.

Diversas instituciones públicas como el INTA y algunas universidades nacionales junto con organizaciones no gubernamentales, participan en este sistema productivo tratando de aportar nuevos avances tecnológicos y herramientas de manejo ya sea en infraestructura, alimentación, genética, etc.; con el propósito de transformar una producción de bajos recursos en emprendimientos alternativos de alto nivel como sucede en los países del primer mundo (Haenlein, 2007).

Sobre el aspecto sanitario, las explotaciones lecheras están en manos de pequeños productores con escasos recursos económicos sin implementar mano de obra especializada (De Gea et al., 2005), que aplican medicamentos como antiparasitarios o antibióticos de rutina, por uso y costumbres de los productores de la zona.

La situación descrita genera un deterioro en la calidad de la leche ó carne caprina debido al desconocimiento de la información técnica indispensable en cuanto los fármacos utilizados generan residuos violatorios muchas veces provocados por ignorar el periodo de retiro, lo que impacta negativamente sobre los productos destinados al consumo humano (Dawson, 2005; Motarjemi & Lelieveld, 2014).



Si bien los antimicrobianos de uso veterinario son herramientas imprescindibles en los sistemas productivos, especialmente para el tratamiento de enfermedades infecciosas, es menester establecer pautas que orienten hacia el uso racional de éstos fármacos (Díaz & Anadón, 2000; Domínguez Rodríguez et al., 2010).

En el contexto terapéutico, las fluoroquinolonas constituyen un grupo de antimicrobianos utilizados en la clínica médica indicadas para tratar variados procesos infecciosos de los animales domésticos (Brown, 1996; Martínez et al., 2006; Giguère & Dowling, 2013).

En el ganado caprino, éstos recursos antibacterianos son activos frente a microorganismos asociados a infecciones respiratorias agudas provocadas por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus* (Giguère & Dowling, 2013).

Las fluoroquinolonas también demostraron efectividad en presencia de mastitis (El-Sayed et al., 2011; Mavrogianni et al., 2011) y en infecciones causadas por *Mycoplasma* spp (Balikci et al., 2008).

En Canadá y EEUU, las fluoroquinolonas no fueron aprobadas para uso en caprinos, aunque los aspectos regulatorios y sus exigencias varían notoriamente en los diferentes países (Fajt, 2011; Scott & Menzies, 2011). Sin embargo, es factible la aplicación de fluoroquinolonas en caprinos extrapolando la información cinética disponible de otras especies (Mavrogianni et al., 2011; Clark, 2013). Esta práctica puede generar resultados inciertos de acuerdo a diferencias anatómicas y funcionales, particularmente referidas a los procesos metabólicos y a la eliminación de fármacos, con obvias implicancias farmacocinéticas (Arboix & Martín-Jiménez, 2002; Riviere & Sundlof, 2009).

La problemática esbozada amerita recopilar mayor información sobre los perfiles farmacocinéticos de fluoroquinolonas en caprinos, debido a la escasos conocimientos respecto sobre éstos fármacos en esta especie, con el propósito de establecer pautas que orienten el uso racional de estos recursos y establecer la depleción del fármaco en tejidos y/o fluidos comestibles (Guardabassi & Kruse, 2008; Domínguez Rodríguez et al., 2010; Toutain et al., 2010).

El propósito de la farmacocinética consiste en estudiar la evolución temporal de las concentraciones y cantidades de fármaco y sus metabolitos en fluidos orgánicos y/o tejidos y construir modelos adecuados para interpretar los datos obtenidos (Bhavsar & Thaker, 2012; Jerzsele, 2012; Trepanier, 2013).

1000  
1000  
1000



La información obtenida se procesa mediante modelos matemáticos a los que se ajustan las concentraciones, las dosis aplicadas del fármaco o sus metabolitos en la totalidad del organismo, o en alguna de sus partes (Baggot & Giguere, 2013).

Las ecuaciones así obtenidas permiten formular predicciones acerca de los resultados que se obtendrían con tratamientos medicamentosos, ya que la respuesta farmacológica es determinada por la cantidad de fármaco que accede a los lugares de acción, y este acceso está condicionado por la concentración sanguínea del fármaco (Beltrán, 2004; Baggot & Giguere, 2013; Trepanier, 2013).

El destino del fármaco en el organismo se interpreta mediante parámetros cinéticos robustos, tales como la concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), cuya magnitud depende de la dosis administrada y de la relación entre las constantes de velocidad de absorción ( $K_a$ ) y de eliminación ( $K_{el}$ ), mientras el parámetro  $T_{m\acute{a}x}$  refiere al momento en que se alcanza el  $C_{m\acute{a}x}$  (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004 a; Baggot & Giguere, 2013; Trepanier, 2013).

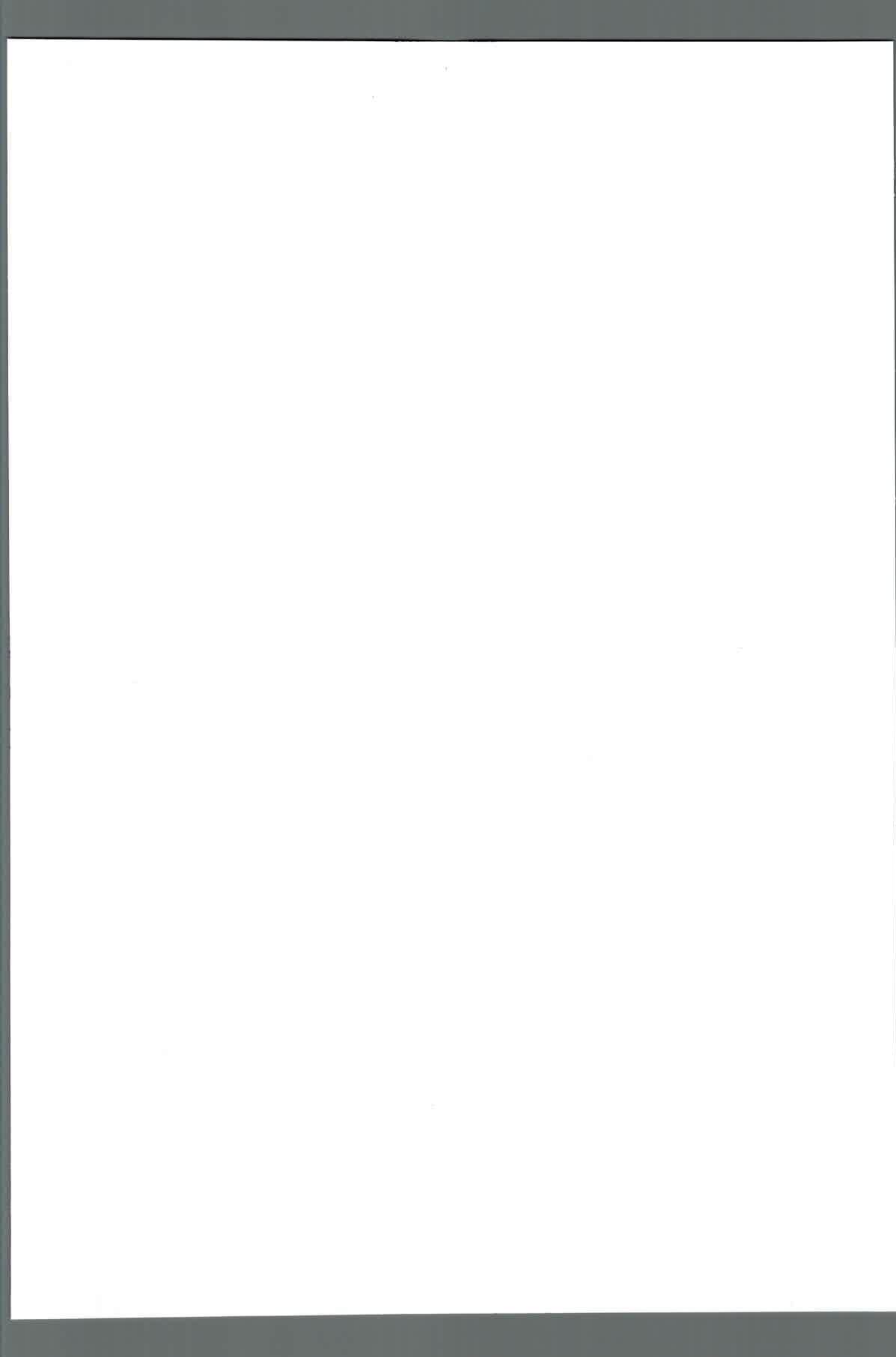
El área bajo la curva (ABC), expresa la exposición acumulativa del antimicrobiano en un determinado período de tiempo, habitualmente entre la aplicación y las 24 horas siguientes (Toutain & Bousquet-Melou, 2004 d; Baggot & Giguère, 2013; Trepanier, 2013).

El ABC permite estimar otros parámetros cinéticos como el clearance total, volumen de distribución y tiempo medio de residencia y realizar cálculos de biodisponibilidad y bioequivalencia (Toutain & Bousquet-Melou, 2004 a; Baggot & Giguère, 2013; Trepanier, 2013).

El concepto de biodisponibilidad, expresa la fracción (F) de la dosis administrada que accede inalterada a la circulación sistémica. La biodisponibilidad no sólo depende de la absorción sino también de eventos que reducen su exposición sistémica, inclusive el metabolismo presistémico (Brown, 2005; Baggot & Giguère, 2013; Trepanier, 2013).

La biodisponibilidad se estima dividiendo el área bajo la curva de administración extravascular por el área bajo la curva de administración intravenosa. Como la biodisponibilidad es completa por la vía intravenosa, el valor de F es 100 %, en tanto para una vía extravascular puede situarse entre 0 y 100 % (Toutain & Bousquet-Melou, 2004 a; Jerzsele, 2012; Baggot & Giguère, 2013).

La distribución de un fármaco implica la transferencia a distintos tejidos, incluyendo el sitio de acción ó biofase, mediante procesos a favor de gradiente condicionado por ciertas propiedades fisicoquímicas del fármaco como el peso





molecular, el coeficiente de partición, el pKa y la afinidad por proteínas plasmáticas y tisulares, puesto que sólo la fracción libre en el plasma difunde a los espacios extravasculares (Beltrán, 2004; Brown, 2005; Lees et al., 2008).

La proporción de droga ionizada/no ionizada, depende de la constante de disociación del fármaco (pKa), en relación al pH del medio que se halla la molécula. El gradiente de pH entre el plasma y los tejidos determina en gran medida las concentraciones tisulares (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004 d; Brown, 2005; Baggot & Giguère, 2013).

Los ácidos débiles, en gran parte ionizados en la sangre (pH= 7.4), difunden poco a los tejidos. En cambio, la relación predecible para las bases débiles supera la unidad, siempre que el fármaco tenga carácter liposoluble; habitualmente los fármacos básicos logran concentraciones tisulares varias veces superiores a las séricas (Brown, 2005; Lees et al., 2008; Baggot & Giguère, 2013).

El volumen aparente de distribución ó Vd, expresa la magnitud de la distribución, sin un significado fisiológico en términos de espacio real puesto que refiere al tamaño de un compartimiento hipotético necesario para contener la cantidad de fármaco existente en el organismo si éste presentara idéntica concentración que en el plasma (Brown, 2005; Bhavsar & Thaker, 2012; Baggot & Giguère, 2013).

El Vd se expresa en L/kg de peso corporal. Este parámetro provee una estimación sobre el grado de distribución, pero no revela el patrón de distribución real que sólo se puede describir midiendo su nivel en distintos órganos y tejidos (Baggot & Giguère, 2013).

La eliminación se expresa mediante el aclaramiento ó clearance total ( $Cl_t$ ), que representa la relación existente entre la velocidad de eliminación ( $K_{el}$ ) y la concentración en plasma (C), ( $Cl_t = K_{el}/C$ ) (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004 b; Bhavsar & Thaker, 2012; Baggot & Giguère, 2013).

El clearance expresa el volumen de sangre o plasma depurado por unidad de tiempo. La relación permanece constante para cada fármaco y expresa el volumen de plasma depurado del fármaco por unidad de tiempo, sin reflejar el tiempo que demora un fármaco en eliminarse del organismo (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004 b; Brown, 2005; Bhavsar & Thaker, 2012; Trepanier, 2013).

Un parámetro derivado del anterior, denominado semi-vida de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ), refiere al tiempo necesario para que cualquier concentración medida en la fase de

eliminación de la curva de disposición decline hasta la mitad (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004 c; Jerzsele, 2012; Baggot & Giguere, 2013).

El  $t_{1/2\beta}$  se establece a partir de concentraciones plasmáticas obtenidas durante la fase de eliminación, ( $\beta$ ) (Bhavsar & Thaker, 2012; Baggot & Giguère, 2013; Trepanier, 2013). Este parámetro permite estimar la permanencia en el organismo y sustenta la selección del intervalo de dosis para un fármaco, mientras que cuando se establece en la declinación gradual de las concentraciones plasmáticas ó tisulares subinhibitorias (fase terminal,  $\gamma$ ), resulta útil para estimar el periodo de resguardo ó retirada (Lee & Ryu, 2000).

El tiempo medio de residencia (TMR), representa el tiempo medio que un fármaco permanece en el organismo luego de la administración de una dosis única. Este parámetro es la analogía del momento estadístico de la vida media y puede ser diferente según la vía de administración (Baggot & Giguère, 2013).

El cálculo del TMR se fundamenta en las áreas totales debajo de las curvas de disposición, estimadas mediante la integración numérica empleando la regla trapezoidal, desde el tiempo cero hasta la última concentración medida, con extrapolación al tiempo infinito (Baggot & Giguère, 2013).

### **Leche caprina, calidad y residuos.**

La leche de cabra es un alimento cada vez más relevante para la dieta humana acorde su elevado valor nutricional (Haenlein, 2004; Raynal-Ljutovac et al, 2008; García et al., 2014). Se trata de un alimento saludable, provisto de excelentes propiedades organolépticas, recomendada en pacientes humanos alérgicos a la leche bovina ó intolerantes a la lactosa (Haenlein, 2004; Park et al., 2007; García et al., 2014).

La composición de la leche de cabras exhibe un buen perfil de lípidos y proteínas, caracterizado por el aumento de los niveles de ácidos grasos insaturados y triglicéridos de cadena media (Haenlein, 2004; Park et al., 2007; Silanikove et al., 2010).

Además, la leche caprina contiene un 12.3% de materia seca distribuida en 4.5% de grasa, 2.9% de proteínas, 4.1% de lactosa y 0.8% de cenizas (Park et al., 2007), posee bajo nivel de  $\alpha$ -s1-caseína, lo que facilita la absorción, la tolerancia y otras

reacciones del aparato digestivo (Park et al., 2007; Raynal-Ljutovac et al., 2008; García et al., 2014).

Este alimento aporta mayor contenido de minerales, especialmente calcio y fósforo, y ofrece mejor biodisponibilidad, sobre todo para el cobre y el hierro, respecto la leche bovina (Silanikove et al., 2010; García et al., 2014).

La leche de cabra contiene niveles reducidos de lactosa comparado con la leche vacuna y humana (Haenlein, 2004; Park et al., 2007; Raynal-Ljutovac et al., 2008), por esta razón es un alimento recomendado en los niños y adultos con problemas de intolerancia a la lactosa ó alérgicos a la proteína de la leche vacuna (Silanikove et al., 2010; García et al., 2014).

En la mayoría de las razas caprinas el producto más importante es la leche, la cual posee características únicas para fabricar quesos, debido que su grasa contiene mayor número de ácidos grasos que intervienen en el sabor del queso, con niveles más elevados de ácido butírico, caproico, caprílico y caprico, respecto la leche bovina (Draksler et al., 2002; Park et al., 2007).

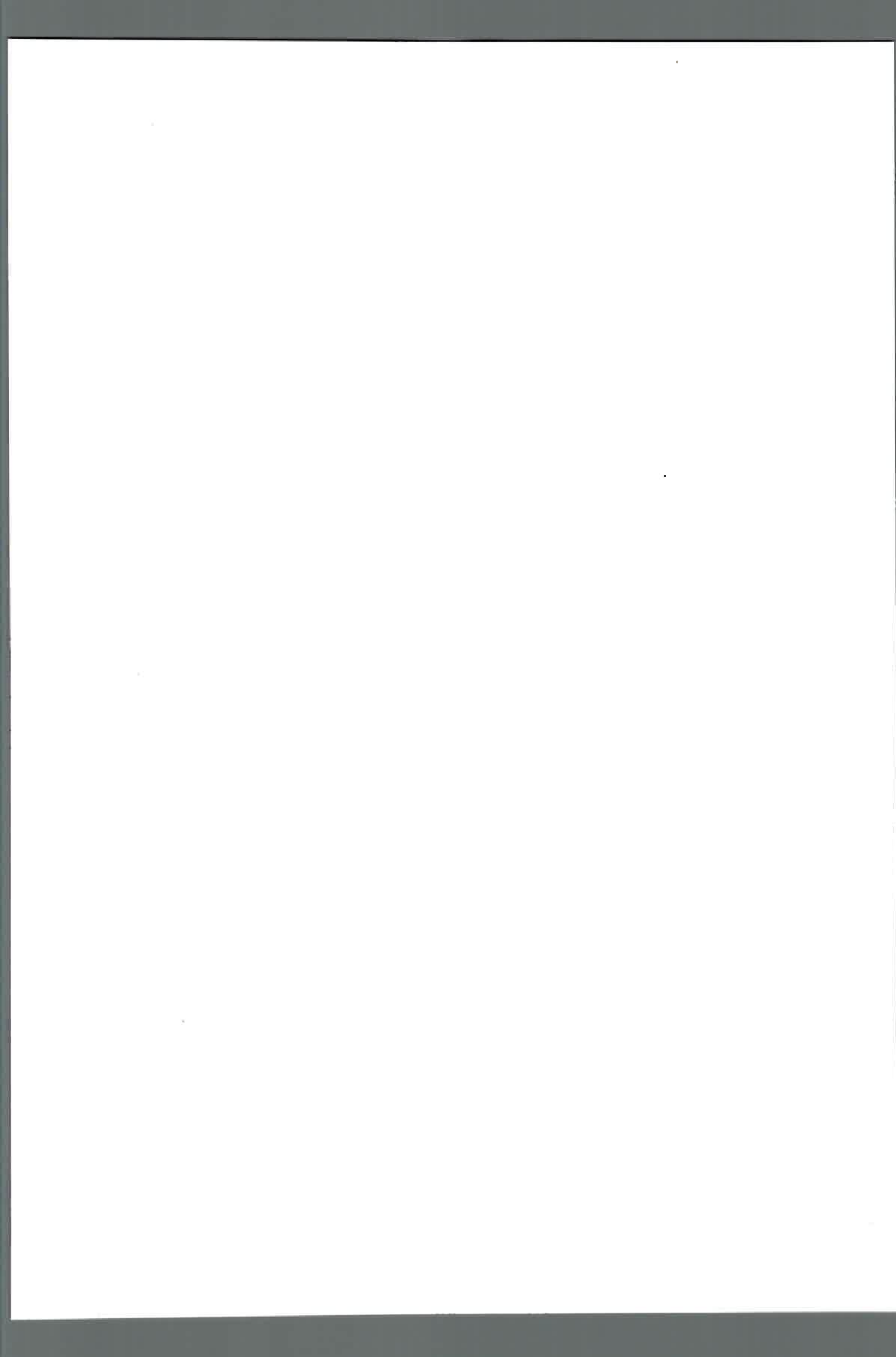
### **Las fluoroquinolonas**

En el año 1960, a partir de cloroquina se desarrolló un grupo de fármacos antimicrobianos sintéticos entonces denominados quinolonas. En 1962, fue introducido el ácido nalidíxico, con el propósito de tratar infecciones urinarias causadas por gram-negativos (Khardori, 2006; Gupta et al., 2012; Giguère & Dowling, 2013).

La aplicación clínica de nalidíxico fue limitada debido a su espectro antibacteriano reducido, la acotada biodisponibilidad oral, su escasa distribución tisular y su gran capacidad para inducir resistencia bacteriana (Sheehan & Chew, 2003; Čonkova et al., 2009; Giguère & Dowling, 2013).

Las primeras 4-quinolonas, derivaron del ácido nalidíxico y con estructuras similares, fueron los ácidos pipemidínico y oxolínico y flumequina, también empleadas para el tratamiento de las infecciones urinarias causadas por gram-negativos (Sheehan & Chew, 2003; Khardori, 2006; Giguère & Dowling, 2013).

En los años 80', resultado de variadas sustituciones químicas producidas en la molécula de 4-quinolonas, surgieron las fluoroquinolonas (Čonkova et al., 2009; Giguère & Dowling, 2013), en principio consideradas como un grupo homogéneo con propiedades semejantes, pero las modificaciones estructurales promovieron el



desarrollo del grupo, originando más de 10.000 agentes provistos de mayor espectro, elevada penetración tisular y con menor manifestación de resistencia microbiana (Scholar, 2002; Andersson & Mac Gowan, 2003; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

En la década del 90' se impuso la clasificación por generaciones: los agentes pertenecientes a cada generación comparten similares características farmacocinéticas, de potencia y espectro antibacteriano (Scholar, 2002; Čonkova et al., 2009; Giguère & Dowling, 2013).

La primera generación abarca sustancias clásicas como los ácidos nalidíxico, oxolínico y pipemidínico, la cinoxacina y también a flumequina, primera quinolona fluorada, con espectro orientado hacia enterobacterias (Sheehan & Chew, 2003; Khardori, 2006; Čonkova et al., 2009).

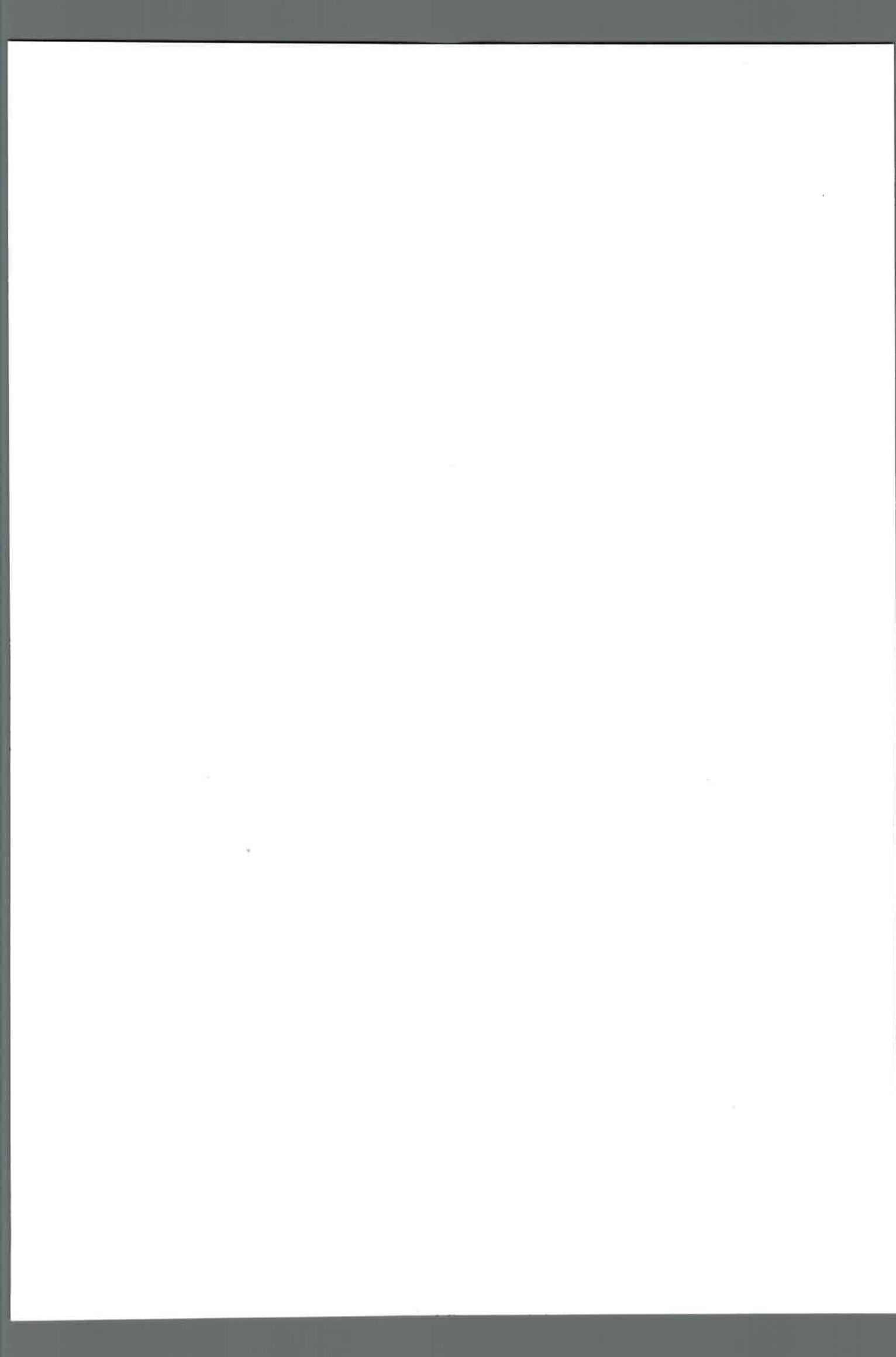
La generación siguiente incluye sustancias monofluoradas como norfloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina, marbofloxacina y sarafloxacina, de aplicación en animales domésticos (Brown, 1996; Papich & Riviere, 2009; Giguère & Dowling, 2013). El espectro del grupo es más amplio e incluye microorganismos aerobios gram-negativos, algunos aerobios gram-positivos e incluso ciertos anaerobios (Sheehan & Chew, 2003; Khardori, 2006; Giguère & Dowling, 2013).

La tercera generación comprende moléculas multifluoradas como fleroxacin, temafloxacina, difloxacina ó tosufloxacina y abarca compuestos con mayor potencia *in vitro* como levofloxacina, grepafloxacina, sitafloxacina y trovafloxacina efectivos sobre gram-negativos, gram-positivos, anaerobios y patógenos intracelulares (Sheehan & Chew, 2003; Khardori, 2006; Giguère & Dowling, 2013).

### **Relación estructura-actividad**

A pesar de estas sustancias poseen un grupo carboxilo, el grado de ionización de estos compuestos es limitado y son muy liposolubles en un intervalo de pH entre 6 y 8 (Brown, 1996). El carácter anfótero obedece a que pueden estar protonadas en el grupo carboxílico ó en la amina terciaria; son bases orgánicas, cuyo pKa se ubica entre 5.2 y 8.5 (Brown, 1996; Papich & Riviere, 2009; Giguère & Dowling, 2013).

La figura 1 representa la organización básica de estos agentes. Conformada por un par de anillos, su estructura presenta un nitrógeno en la posición 1, un grupo carboxilo en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4; las posiciones 2, 3 y 4, son relevantes para la actividad biológica de las quinolonas.



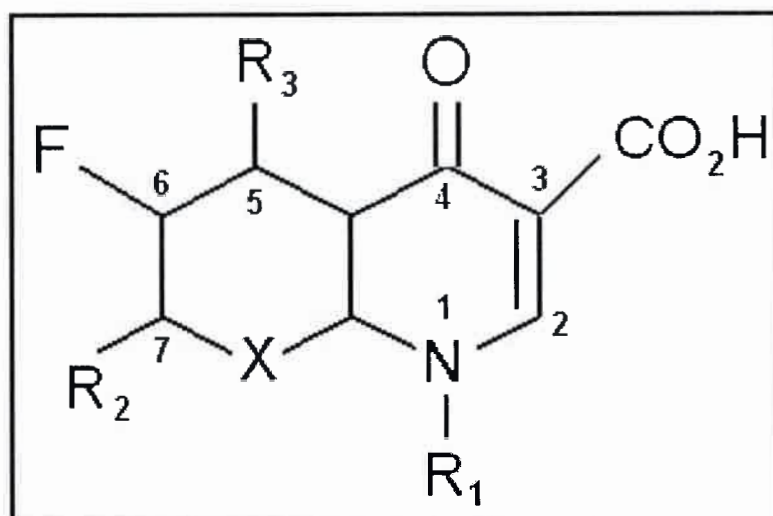


Figura N° 1: Farmacoforo de las fluoroquinolonas

En la estructura primaria de las fluoroquinolonas se efectuaron modificaciones; en particular en la posición  $N_1$  y en las posiciones  $C_6$ ,  $C_7$  y  $C_8$ , que influyen en las características farmacológicas, como la biodisponibilidad oral ó la potencia frente a determinados grupos bacterianos: el agregado de flúor en el  $C_6$  es esencial para inhibir la enzima ADN girasa, acrecienta la actividad hacia bacterias gram-positivas y reduce el valor de la CIM aproximadamente 100 veces en los miembros de la tercera generación (Andersson & Mac Gowan, 2003; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004; Giguère & Dowling, 2013).

La adición de flúor en  $C_8$  brinda estabilidad metabólica, reduce el ritmo de eliminación y extiende la actividad sobre estafilococos, mientras que el segundo átomo de flúor en la misma posición mejora en el perfil cinético, en tanto el nitrógeno en  $N_1$  y el ácido carboxílico en  $C_3$  son indispensables para la actividad antibacteriana (Appelbaum & Hunter, 2000; Giguère & Dowling, 2013).

Los cambios estructurales más relevantes se efectuaron sobre las aminas en posición 7 por la facilidad de incorporar diferentes cadenas laterales. En este sentido, fueron introducidos los grupos piperazina, aminopirrolidina y derivados con distintas sustituciones que permitieron la síntesis de nuevas moléculas provistas de mayor biodisponibilidad respecto a las generaciones anteriores (Brown, 1996; Giguère & Dowling, 2013).

La alquilación del anillo piperazínico incrementa la acción hacia los gérmenes gram-positivos, promueve la absorción intestinal y aumenta la vida media de

100  
100  
100



eliminación, mientras la incorporación de un grupo piperazina en la posición C<sub>7</sub> extiende la actividad sobre *Pseudomonas* (Appelbaum & Hunter, 2000).

Ciertos efectos colaterales están vinculados con algunas sustituciones. Las moléculas con grupos piperazínicos y pirrolidínicos en C<sub>7</sub> pueden interferir la unión del receptor GABA-A con su ligando natural en el sistema nervioso central. La presencia de un reemplazo en posición 8 condiciona fuertemente la fototoxicidad; cuando el sustituto es el flúor, los compuestos son muy inestables a la radiación ultravioleta y se generan productos de degradación tóxicos (Martínez et al., 2006).

### **Farmacodinamia**

Las fluoroquinolonas están provistas de amplio espectro antibacteriano. Desarrollan acciones bactericidas rápidas, concentración dependiente mediante el bloqueo selectivo la enzima ADN girasa (Khardori, 2006; Martínez et al., 2006; Giguère & Dowling, 2013).

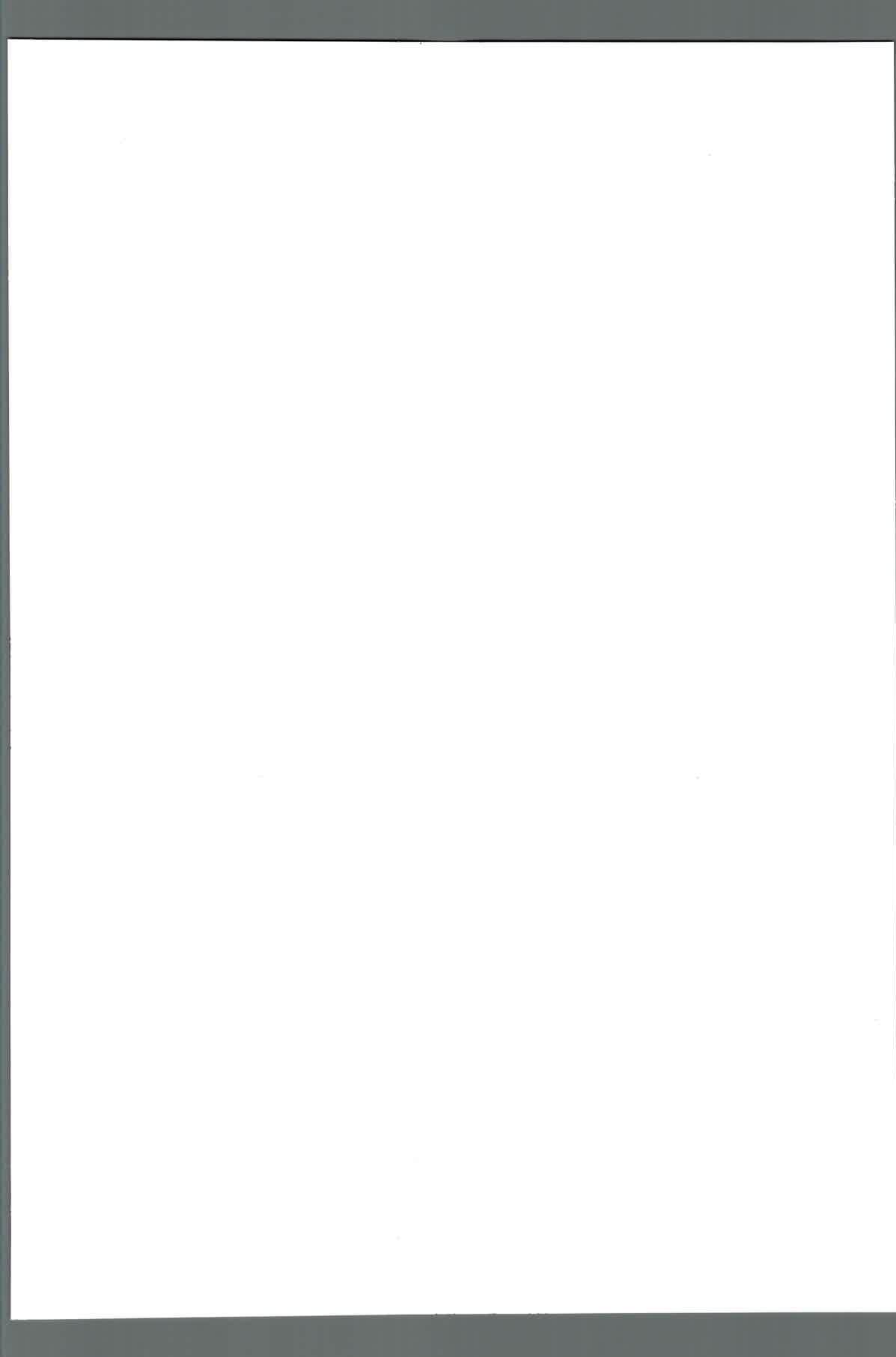
La enzima ADN girasa, conformada por las subunidades *GyrA* y *GyrB*, es responsable del enrollamiento de las bandas, sustenta los cromosomas en un estado de súper espiral y los fija a la superficie interna de la célula (Scholar, 2002; Hawkey, 2003; Čonkova et al., 2009).

En las bacterias gram-positivas también inhiben la topoisomerasa IV, una enzima homóloga de la ADN girasa conformada por dos subunidades A y dos subunidades B, codificada por los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, respectivamente, encargada de separar la parte replicada del ADN (Hawkey, 2003; Khardori, 2006; Čonkova et al., 2009).

### **Resistencia bacteriana**

La resistencia a las fluoroquinolonas se manifiesta a través de tres mecanismos diferentes: menor permeabilidad, activación de una bomba de flujo del fármaco hacia el exterior de la bacteria y mutación de la ADN girasa ó topoisomerasa IV bacteriana (Paige & Tollefson, 2003; Čonkova et al., 2009; Boerlin & White, 2013).

La selección de mutantes resistentes por los dos primeros mecanismos, equivale a un incremento de 2 a 8 veces la CIM (concentración inhibitoria mínima), mientras la alteración del receptor de la ADN girasa induce resistencia de mayor nivel.



Ciertas mutaciones que confieren resistencia por activación en la bomba de flujo, también pueden conferir resistencia a otros grupos antimicrobianos, como cefalosporinas y tetraciclinas.

La resistencia a las fluoroquinolonas mediada por cromosomas, se manifiesta sobre todo en bacterias gramnegativas. Es estable e independiente de la energía, las bacterias resistentes tienen la posibilidad de persistir incluso después que desaparece el fármaco del ambiente. De este modo las cepas resistentes pueden seleccionarse por la exposición repetida a concentraciones subletales del fármaco.

Inicialmente, se afirmó que la resistencia era sólo cromosómica, pero en 1998 se describió en cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* la existencia de un plásmido conjugativo que confiere resistencia a quinolonas, cuyo *locus* responsable se designó *qnr* (Rodríguez-Martínez, 2005).

### Aspectos toxicológicos

Las fluoroquinolonas son fármacos relativamente seguros. En dosis terapéuticas los efectos tóxicos son leves y limitados a trastornos gastrointestinales, como náuseas, vómitos y diarreas (Brown, 1996; Gupta et al., 2012; Giguère & Dowling, 2013).

Los efectos tóxicos más importantes se desarrollan en los cartílagos articulares y tendones (Kato, 2008), comprobados en animales inmaduros con varios integrantes del grupo en ratas, caninos, ovejas y aves, motivo por el cual se desaconseja su aplicación en animales en crecimiento (Martínez et al., 2006; Gupta et al., 2012; Giguère & Dowling, 2013).

En humanos, los principales efectos adversos se asocian con trastornos gastrointestinales, fotosensibilidad, cristaluria y cardiotoxicidad (Van Bambeke et al., 2005).

En animales, la administración de dosis altas provoca convulsiones, micción y vómitos (Brown, 1996; Martínez et al., 2006) y aumento en la frecuencia e intensidad de las crisis en perros epilépticos (Vancutsem et al., 1990).

La bibliografía refiere a aspectos toxicológicos agudos, evidentes luego de la exposición a altas dosis del xenobiótico o agente extraño al organismo, generalmente en las 24 horas siguientes (Paige & Tollefson, 2003).

Los efectos toxicológicos crónicos que se presentan luego de una exposición repetida a bajas dosis de un xenobiótico, son relacionados a la manifestación de

resistencia bacteriana, efectos sobre el sistema inmunológico y otras acciones genotóxicas como las mutagénicas, carcinogénicas y tóxicas reproductivas (Paige & Tollefson, 2003; Girardi & Odore, 2008; Reeves, 2010).

La manifestación de éstos efectos adversos se asocia a la problemática de residuos de medicamentos veterinarios en productos y subproductos destinados al consumo humano, y a la exposición humana a estos residuos.

### Farmacocinética

Las quinolonas presentan comportamientos cinéticos diferentes según su estructura química ó la generación a la que pertenecen. En general, las de primera generación presentan escasa absorción en el tracto gastrointestinal y sufren un rápido aclaramiento, principalmente renal, lo cual limita su uso al tratamiento de infecciones urinarias y entéricas (Čonkova et al., 2009; Bhavsar & Thaker, 2012; Giguère & Dowling, 2013).

El conjunto de las fluoroquinolonas, experimenta moderada a elevada biosponibilidad oral en animales domésticos, excepto en los rumiantes, casi completa absorción parenteral y amplia distribución tisular (Bhavsar & Thaker, 2012; Gupta et al., 2012, Giguère & Dowling, 2013).

El átomo de flúor en C<sub>6</sub> y el anillo piperazínico en el C<sub>7</sub>, acentúan la penetración celular con respecto a las antiguas quinolonas (Mitscher & Zhenkun, 2003; Čonkova et al., 2009) y las cadenas alquiladas en posición “*para*” del anillo piperazínico aumentan la liposolubilidad (Vancutsem et al., 1990; Čonkova et al., 2009).

La reducida unión a proteínas plasmáticas, que generalmente presentan estos compuestos, sumado a la escasa ionización a pH sanguíneo, redundan en elevados valores de volumen de distribución de las fluoroquinolonas con respecto a las quinolonas clásicas (Bhavsar & Thaker, 2012; Gupta et al., 2012; Giguère & Dowling, 2013).

Las quinolonas se eliminan principalmente por metabolismo hepático y excreción renal, ya sea por filtración glomerular o secreción tubular activa. Aunque la excreción de la mayoría de estos fármacos sucede principalmente por vía renal, también se debe considerar la eliminación por vía hepática y gastrointestinal, según el agente (Čonkova et al., 2009; Gupta et al., 2012; Giguère & Dowling, 2013).

Según las características físico-químicas de cada quinolona, varía la reabsorción tubular. Los compuestos menos polares, como pefloxacina ó difloxacina, son ampliamente reabsorbidos y exhiben prolongada semivida de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ).

Los compuestos más polares, como la norfloxacina, ciprofloxacina y enoxacina, presentan valores más altos de aclaramiento renal (Cl), y menor semivida de eliminación (Fitton, 1992). Los derivados  $N_4$  metilados, más lipofílicos, son los más susceptibles de ser reabsorbidos (Sörgel & Kinzig, 1993).

La extensión y tipo de metabolismo dependen de cada compuesto en particular, aunque el metabolismo contribuye poco al aclaramiento de las fluoroquinolonas (Gupta et al., 2012). La mayoría de los metabolitos primarios son activos y, en general poseen una semivida de eliminación más breve que el compuesto original. Las reacciones de biotransformación, que incluyen oxidación, hidroxilación, N-desalquilación y glucoronoconjugación, afectan sobre todo al grupo piperazínico y sus sustituyentes (Gupta et al., 2012).

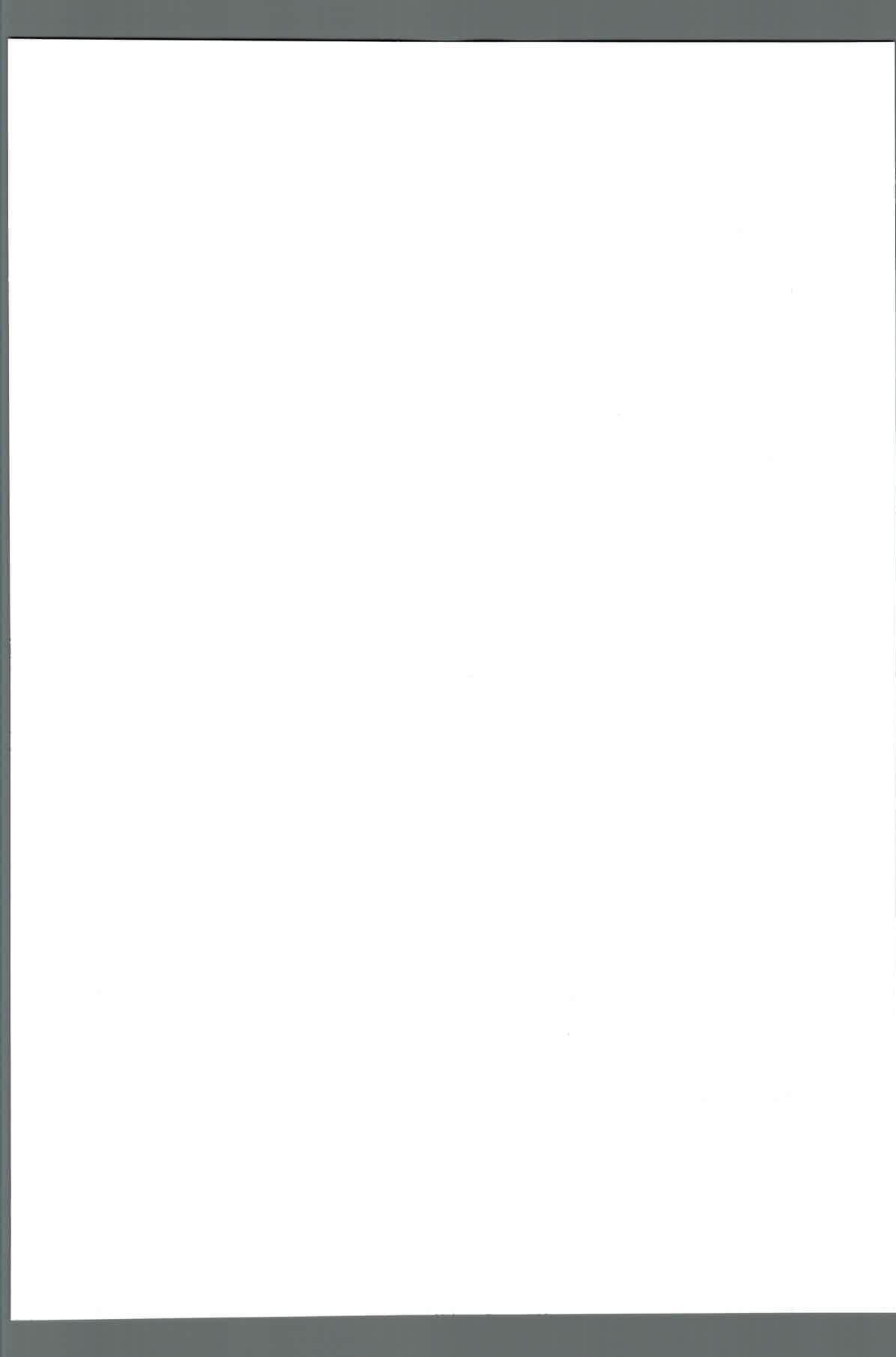
El grado de excreción biliar varia según el compuesto aunque generalmente es bajo (Fitton, 1992). Algunas fluoroquinolonas pueden ser eliminadas vía transintestinal. La acción de las  $\beta$ -glucuronidasas en el tracto intestinal, puede liberar el compuesto primario o metabolitos activos, los cuales por la recirculación enterohepática pueden reabsorberse.

La semivida de eliminación de las fluoroquinolonas depende de cada molécula y la especie considerada. En general, la  $t_{1/2\beta}$  es prolongada permitiendo su dosificación cada 12 ó 24 horas, según los casos.

El aclaramiento plasmático no excede en ninguna de las especies el litro por kilogramo/hora, excepto en cerdos, ratas, ratones y conejos tras la administración de ciprofloxacina y moxifloxacina.

### **Antecedentes cinéticos de fluoroquinolonas en cabras lactantes.**

La aplicación subcutánea de 6 mg/kg de danofloxacina al 18% en hembras caprinas experimentó rápida absorción, según indicó el  $t_{1/2abs}$  de  $0.29 \pm 0.18$  horas informado por Errecalde et al. (2010). Con este antimicrobiano, se comunicó un  $C_{m\acute{a}x}$  entre  $1.05 \pm 0.09$  y  $1.26 \pm 0.15$   $\mu\text{g/ml}$  (Escudero et al., 2007; Errecalde et al., 2010 a), obtenido a las 1.6 horas (Errecalde at al., 2010 a).



Danofloxacin, luego de la administración por vía subcutánea, exhibió excelente biodisponibilidad, del  $97.0 \pm 15.7 \%$  (Escudero et al., 2007), elevada distribución tisular, según expresó el Vd conseguido de  $6.2 \pm 2.4 \text{ L/kg}$  y moderada permanencia plasmática, conforme los parámetros cinéticos  $t_{1/2\beta}$  y TMR establecidos de  $5.90 \pm 1.52$  y de  $6.64 \pm 0.91$  horas, respectivamente (Errecalde et al., 2010 a).

En este estudio, las relaciones  $C_{\text{máx}}$  y ABC plasmáticas respecto la CIM de *P. haemolytica* fueron 31 y 217, respectivamente (Errecalde et al., 2010 a), ambas suficientes para asegurar eficacia clínica-microbiológica (Barger et al., 2003; McKinnon & Davis, 2004).

Danofloxacin exhibió significativa disposición láctea, el  $C_{\text{máx}}$  alcanzó a  $14.08 \pm 10.14 \mu\text{g/ml}$  conseguido a las  $2.60 \pm 1.34$  horas (Errecalde et al., 2010 a). Según los cocientes informados de  $ABC_{\text{leche}}/ABC_{\text{plasma}}$  que difieren entre 10.6 (Errecalde et al., 2010 a) a 13 (Escudero et al., 2007) y la relación  $C_{\text{máx}_{\text{leche}}}/C_{\text{máx}_{\text{plasma}}}$  generada de 11.7 (Errecalde et al., 2010 a). El periodo de resguardo se estimó en 6.85 días con un 99% de confianza (Errecalde et al., 2010 a).

La aplicación intravenosa de 5 mg/kg de difloxacin exhibió pronta distribución desde el compartimiento central, logró amplia disposición en tejidos y moderada permanencia en el organismo, según indicó el  $t_{1/2\alpha}$  comunicado de  $0.62 \pm 0.15$  horas (Errecalde et al., 2010 b).

La administración intravenosa de difloxacin determinó extensa vida media de eliminación plasmática, de  $10.69 \pm 1.48$  horas y provocó un  $C_{\text{máx}}$  lácteo de  $2.96 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$  obtenido a las  $0.55 \pm 0.2$  horas y exhibió menor disposición en la leche respecto al plasma según reflejó la relación  $ABC_{\text{leche}}/ABC_{\text{plasma}}$  de 0.68, provista durante las primeras 24 horas siguientes a la administración (Errecalde et al., 2010 b).

La administración de 5 mg/kg de difloxacin por vía subcutánea brindó biodisponibilidad de  $90.16 \pm 11.99 \%$  y un  $C_{\text{máx}}$  plasmático de  $1.33 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$ , obtenido a las  $3.37 \pm 0.36$  horas, mientras que la administración intravenosa arrojó valores de Vd y Cl, de  $1.16 \pm 0.26 \text{ L/kg}$  y de  $5.33 \pm 0.83 \text{ ml/min.kg}$ , respectivamente (Marín et al., 2007 c).

La penetración de difloxacin en leche resultó pronta y extensa; éste antimicrobiano se determinó hasta las 36 y 72 horas post aplicación subcutánea e intramuscular, respectivamente (Marín et al., 2007 c).

El  $C_{\text{máx}}$  lácteo generado tras la aplicación subcutánea fue de  $1.20 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$  estimado a las 4 horas y las relaciones provistas de  $C_{\text{máx}_{\text{leche}}}/C_{\text{máx}_{\text{plasma}}}$  y





$ABC_{\text{leche}}/ABC_{\text{plasma}}$  entre las 0-24 horas fueron de  $0.90 \pm 0.07$  y de  $0.68 \pm 0.03$ , respectivamente (Marín et al., 2007 c).

Contemplando el LMR establecido en leche bovina para danofloxacin (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), debido que éste no fue determinado para difloxacin y aplicando los valores cinéticos obtenidos a la fórmula sugerida por Riviere & Sundlof (2009), se determinó un periodo de retirada para leche en caprinos de 5 días, estimado con un intervalo de confianza del 99% (Errecalde et al., 2010 b).

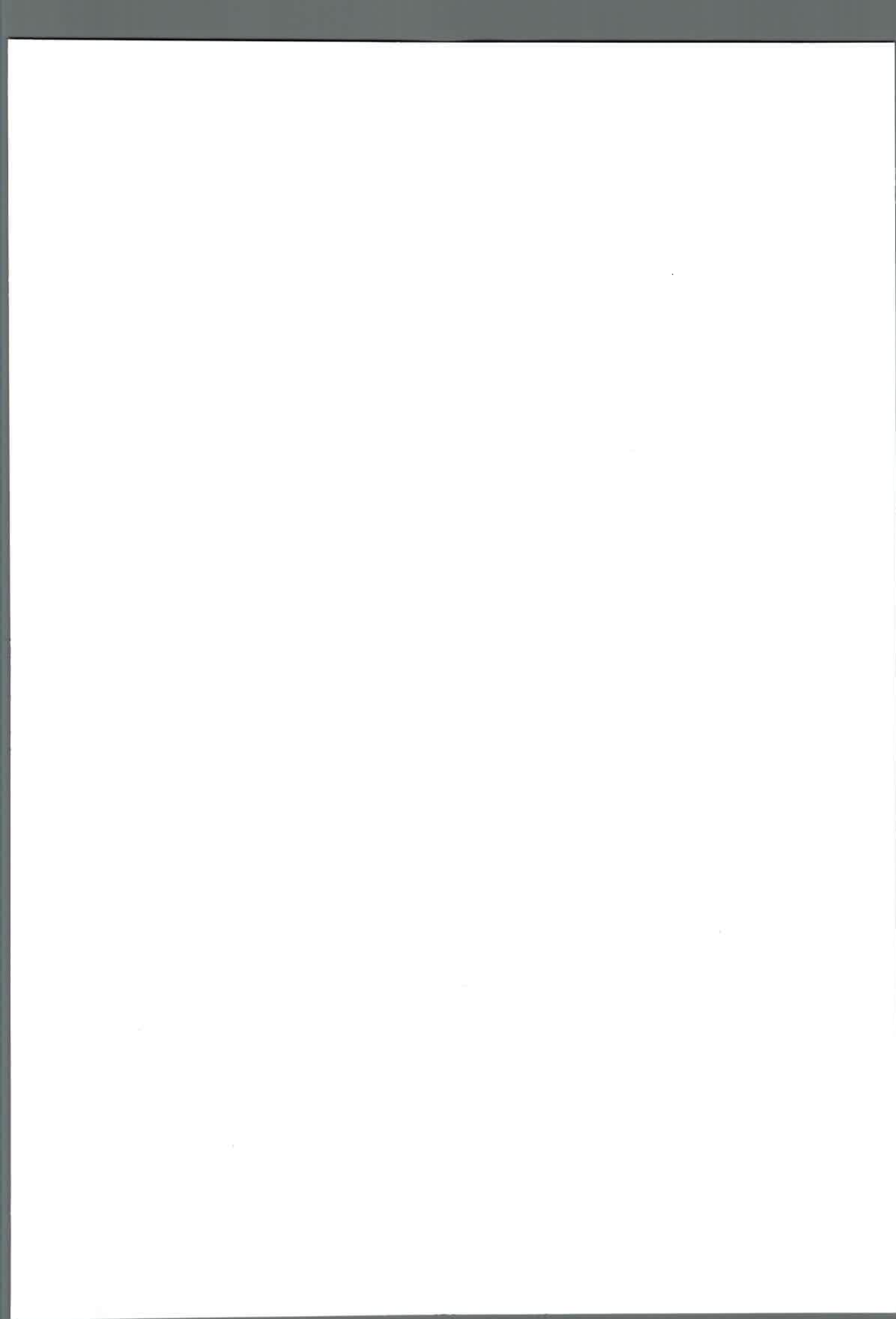
La aplicación intravenosa de 10  $\text{mg}/\text{kg}$  de gatifloxacin determinó inmediata distribución desde el compartimento central, según el  $t_{1/2\alpha}$  de  $0.14 \pm 0.04$  horas, moderada permanencia en el organismo, acorde indican los valores informados de vida media de eliminación y el TMR de  $4.54 \pm 0.75$  y de  $6.84 \pm 1.23$  horas, respectivamente y experimentó amplia distribución tisular conforme refiere el  $V_d$  conseguido de  $3.92 \pm 0.69$   $\text{L}/\text{kg}$  (Singh et al., 2001).

En leche, gatifloxacin generó un  $C_{\text{máx}}$  de  $9.17 \pm 1.41$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , exhibió inferior permanencia respecto al plasma, según el  $t_{1/2\beta}$  y el TMR de  $3.67 \pm 0.22$  y  $5.27 \pm 0.37$  horas, respectivamente y arrojó un cociente  $ABC_{\text{leche}}/ABC_{\text{plasma}}$  de 2.33 (Singh et al., 2001).

La administración subcutánea de 2.5  $\text{mg}/\text{kg}$  de orbifloxacin produjo un  $C_{\text{máx}}$  plasmático de  $1.85 \pm 0.2$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  establecido a las  $1.25 \pm 0.22$  horas. Este antimicrobiano experimentó rápida absorción y distribución luego de la aplicación subcutánea, conforme el  $t_{1/2\text{abs}}$  y el  $t_{1/2\alpha}$  comunicados, de  $0.63 \pm 0.02$  horas y de  $1.10 \pm 0.07$  horas, respectivamente, en tanto según el  $t_{1/2\beta}$  encontrado fue de  $4.99 \pm 0.09$  horas, orbifloxacin registró moderada permanencia en el organismo de los caprino (Marín et al. 2007 c).

El  $C_{\text{máx}}$  lácteo de orbifloxacin se situó en  $1.73 \pm 0.3$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , establecido a las 2 horas, mientras el cociente  $C_{\text{máx}_{\text{leche}}}/C_{\text{máx}_{\text{plasma}}}$  fue de  $0.95 \pm 0.2$ , mientras la relación  $ABC_{\text{leche}}/ABC_{\text{plasma}}$  fue de  $1.15 \pm 0.17$  (Marín et al., 2007 c).

La aplicación por vía intramuscular de 10  $\text{mg}/\text{kg}$  de norfloxacin experimentó biodisponibilidad del 70.04 %, rápida absorción conforme el  $t_{1/2\text{abs}}$  conseguido de  $1.61 \pm 0.07$  horas y generó un  $C_{\text{máx}}$  plasmático de  $11.33 \pm 0.43$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , obtenido a las  $4.01 \pm 0.11$  horas y ofreció moderada permanencia en el plasma, según expresó el  $t_{1/2\beta}$  de  $4.89 \pm 0.27$  horas, mientras el  $Cl$  reportado fue de  $1.29 \pm 0.07$   $\text{ml}/\text{min.kg}$  (El-Sayed et al., 2011).



En hembras caprinas, norfloxacin exhibió reducida disposición en tejidos, según se infiere del Vd comunicado de  $0.48 \pm 0.03$  L/kg, no obstante en leche los niveles conseguidos con la aplicación intramuscular excedieron los plasmáticos (El-Sayed et al., 2011).

Shem Tov et al., (1997), utilizando el método microbiológico para cuantificar a marbofloxacin, determinaron que la penetración de este fármaco en bovinos es rápida y extensa y excede los niveles plasmáticos a las 2 horas post aplicación (Shem Tov, et al., 1997). Administrando 2 a 4 mg/kg los niveles de este antimicrobiano en leche subsisten durante 12 horas y exceden la CIM de los gram -negativos que afectan la mama (Shem Tov et al., 1997).

La aplicación intramuscular de 2 mg/kg de marbofloxacin genera un C<sub>máx</sub> lácteo de 1.074 µg/mL obtenido a las 2.5 horas (T<sub>máx</sub>). En este estudio el ABC en la leche correspondió a 6.51 µg/h/mL (Schneider et al., 2004).

Los antecedentes generados luego de la aplicación de levofloxacin en cabras lactantes expresan que difunde pronto desde el compartimiento central según el t<sub>1/2</sub>α informado de  $0.54 \pm 0.1$  horas, tras la aplicación intramuscular (Goudah & Abo-El-Sooud, 2008).

Levofloxacin experimentó elevada disposición tisular según expresa el volumen de distribución obtenido de  $2.11 \pm 0.13$  L/kg y extensa permanencia en el organismo, según el t<sub>1/2</sub>β informado de  $11.31 \pm 5.24$  horas (Errecalde et al., 2008).

En leche, luego de la aplicación intravenosa de 5 mg/kg, levofloxacin arrojó un C<sub>máx</sub> de  $6.7 \pm 1.3$  µg/ml conseguido a las  $2.4 \pm 0.89$  horas y exhibió mejor disposición respecto al plasma según reflejó la relación de ABC<sub>leche</sub>/ABC<sub>plasma</sub> de 1.34 en las 24 horas siguientes a la administración, acorde a las propiedades lipofílicas exhibidas por este antimicrobiano (Errecalde et al., 2008).

Luego de la aplicación de 4 mg/kg de levofloxacin por vía intramuscular, se reportó un C<sub>máx</sub> lácteo de  $3.26 \pm 0.34$  µg/ml, obtenido a las  $0.75 \pm 0.21$  horas y un cociente C<sub>máx</sub> leche/plasma de  $1.14 \pm 0.12$  (Goudah & Abo-El-Sooud, 2008).

La relación ABC<sub>leche</sub>/ABC<sub>plasma</sub> provista por levofloxacin fue de  $0.81 \pm 0.13$  y de  $1.01 \pm 0.18$ , para las aplicaciones endovenosa e intramuscular, respectivamente (Goudah & Abo-El-Sooud, 2008).

Considerando el LMR establecido en leche bovina para enrofloxacin (100 µg/kg) y los valores cinéticos obtenidos, aplicando la fórmula sugerida por Riviere &

Sundlof (2009), se determinó un periodo de retirada para leche en caprinos de 117.2 horas, estimado con un intervalo de confianza del 99% (Errecalde et al., 2008).

La aplicación subcutánea de 5 mg/kg de moxifloxacina en cabras lactantes determinó pronta absorción, según el  $t_{1/2\text{abs}}$  plasmático reportado de  $1.71 \pm 0.73$  horas y un  $C_{\text{máx}}$  de  $1.80 \pm 0.17$   $\mu\text{g/ml}$  obtenido a las  $2.42 \pm 0.52$  horas (Fernández-Varón et al., 2006).

Moxifloxacina experimentó moderada permanencia en el organismo, como se desprende de los valores obtenidos en los parámetros  $t_{1/2\beta}$  y TMR de  $2.98 \pm 0.48$  horas y de  $6.15 \pm 0.92$  horas, respectivamente. El Vd de moxifloxacina alcanzó los  $1.44 \pm 0.30$  L/kg, el Cl a  $7.16 \pm 0.33$  ml/min.kg y la aplicación subcutánea ofreció biodisponibilidad del  $96.8 \pm 10.2$  % (Fernández-Varón et al., 2006).

En leche, la aplicación subcutánea de este antibacteriano determinó un cociente  $ABC_{\text{leche}}/ABC_{\text{plasma}}$  de  $2.33 \pm 0.16$ . El  $C_{\text{máx}}$  lácteo fue de  $3.21 \pm 0.29$   $\mu\text{g/ml}$  conseguido a las  $3.3 \pm 0.42$  horas. Moxifloxacina exhibió un  $t_{1/2\beta}$  en leche de  $3.66 \pm 0.32$  horas (Fernández-Varón et al., 2006).

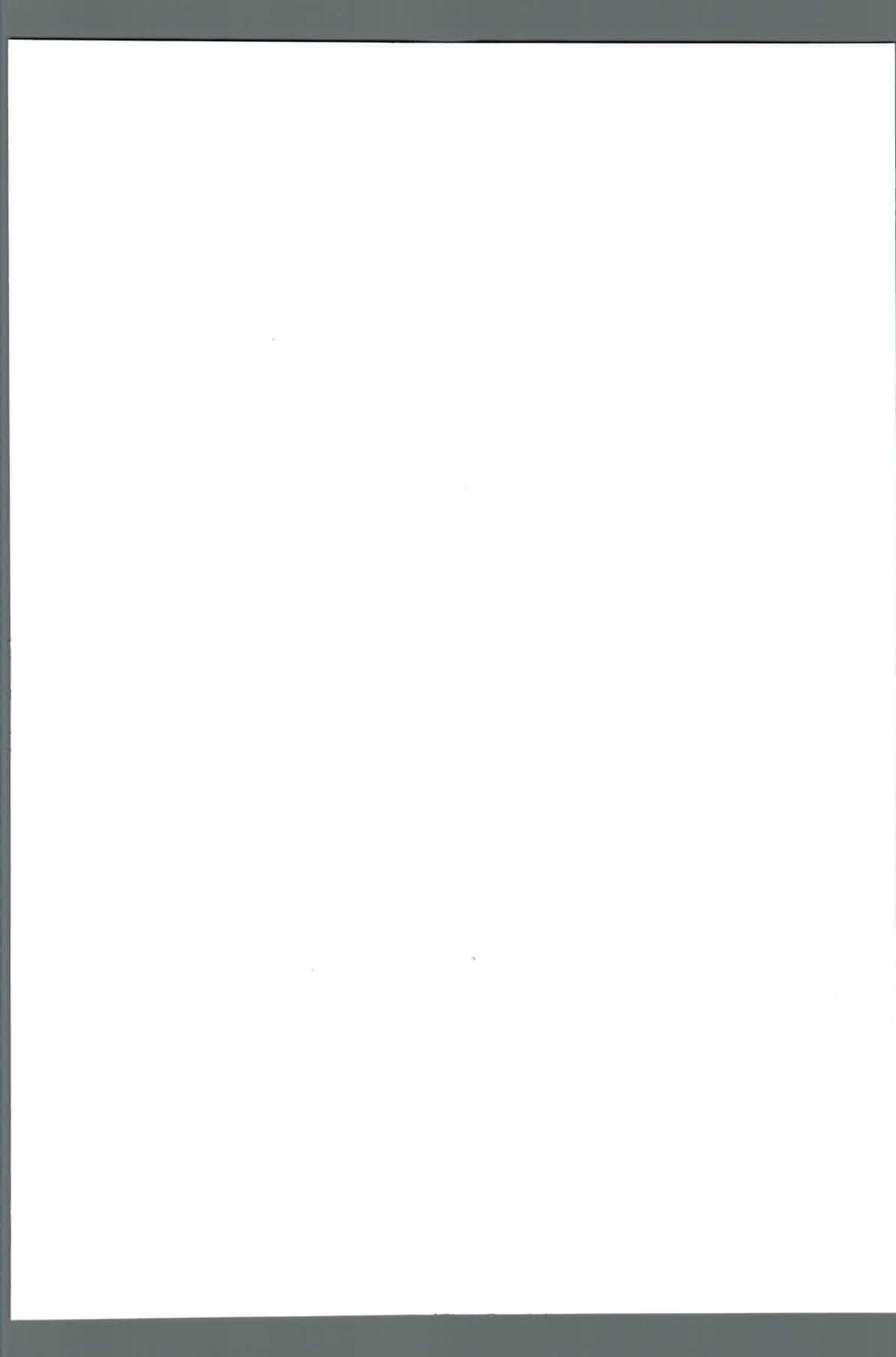
La aplicación subcutánea de 7.5 mg/kg de enrofloxacin al 10% en cabras determinó lenta absorción conforme el  $t_{1/2\text{abs}}$  obtenido de  $1.40 \pm 0.35$  horas, mientras el  $C_{\text{máx}}$  plasmático comunicado alcanzó a  $2.88 \pm 1.64$  y a  $0.23 \pm 0.32$   $\mu\text{g/ml}$ , fueron reportados a las  $5.00 \pm 1.54$  y a las  $6.50 \pm 1.97$  horas para enrofloxacin y su metabolito, ciprofloxacina, respectivamente (Errecalde et al., 2012).

Enrofloxacin y ciprofloxacina difunden ampliamente a los tejidos, según expresan los Vd informados de  $2.02 \pm 1.08$  y de  $4.28 \pm 4.19$  L/kg, respectivamente, en tanto los valores de  $t_{1/2\beta}$  plasmáticos hallados con enrofloxacin y ciprofloxacina de  $4.69 \pm 1.16$  y de  $2.96 \pm 4.65$  horas, respectivamente, indican dispar permanencia en el organismo, acorde los valores de TMR registrados de  $8.55 \pm 1.66$  y de  $16.37 \pm 6.69$  horas para enrofloxacin y ciprofloxacina, respectivamente (Errecalde et al., 2012).

El  $Cl_t$  de enrofloxacin fue establecido en  $5.23 \pm 2.66$  ml/min/kg, mientras para ciprofloxacina se determinó en  $4.28 \pm 5.22$  ml/min/kg (Errecalde et al., 2012).

La conversión a ciprofloxacina fue del  $6.4 \pm 5.9$  %, lo que indicaría reducida capacidad de biotransformación en estos animales. Ciprofloxacina experimentó mayor permanencia que enrofloxacin en el organismo y mayor distribución tisular, acorde los antecedentes disponibles (Errecalde et al., 2012).

La disposición láctea de enrofloxacin fue inmediata a su aplicación y muy duradera según expresan el  $t_{1/2\beta}$  y TMR registrados de  $9.11 \pm 5.30$  horas y de  $12.44 \pm$



5.67 horas y de  $15.76 \pm 8.33$  horas y de  $20.23 \pm 9.00$  horas, con enrofloxacin y ciprofloxacina, respectivamente (Errecalde et al., 2012).

Enrofloxacin logró un  $C_{\max}$  en leche de  $0.50 \pm 0.29$   $\mu\text{g/ml}$  generado a las  $5.66 \pm 1.5$  horas. La comparación de  $ABC_{\text{leche}}/ABC_{\text{plasma}}$  de enrofloxacin arrojó cocientes de  $0.2 \pm 0.1$ . Respecto a enrofloxacin, ciprofloxacina demostró mayor persistencia y provee cocientes de  $1.4 \pm 1.1$ . El período de retiro de leche se estimó en 4.06 días (Errecalde et al., 2012).

La administración intravenosa de 15 mg/kg de ibafloxacin determinó pronta distribución desde el compartimento central, según indicó el  $t_{1/2\alpha}$  informado de 0.35 horas y restringida permanencia en el organismo conforme indican los parámetros  $t_{1/2\beta}$ , TMR y  $Cl_t$  comunicados de 3.76 horas, de  $1.50 \pm 0.22$  horas y de  $17.5 \pm 1.66$  ml/min·kg, respectivamente (Marín et al., 2007 a).

En este estudio, ibafloxacin experimentó un  $V_d$  en estado de equilibrio de  $1.65 \pm 0.42$  L/kg y escasa disposición en la glándula mamaria; el cociente  $ABC_{\text{leche}}/ABC_{\text{plasma}}$  fue de  $0.20 \pm 0.01$  (Marín et al., 2007 a).

## Marbofloxacina

### Estructura química

La fórmula química de la marbofloxacina es (9-fluoro-2,3dihidro-2-metil- 10-(4-metil-1-piperazinil)- 7-oxo-7-H-pirido [3,2,1-ij] [4,1 2] benzosadiacina- 6-ácido carboxílico, su fórmula molecular es  $C_{17}H_{19}FN_4O_4$ .

Consiste en un polvo amarillo pálido, de peso molecular de 362.36 Da. Exhibe ligera inestabilidad a la luz solar y es suficientemente liposoluble, acorde a la incorporación de un grupo alquilo al ciclo piperazina. Es ligeramente soluble en agua y soluble en solventes orgánicos como clorofloro, metanol ó etanol.

El incremento de la potencia por la sustitución con un átomo de flúor en  $C_6$ , se acompaña de la introducción de un anillo piperazínico (N-metil piperacina) en  $C_{10}$  y un átomo de oxígeno en posición 1, que da origen a un ciclo oxadiazínico (Figura 2). El anillo oxadiazínico le confiere a la molécula características farmacocinéticas como prolongada semivida de eliminación y mayor volumen de distribución (Fittón, 1992; Schneider et al., 1996; Rubio Langre, 2011). Asimismo, incrementa el espectro frente a

bacterias gram-positivas y anaerobios. Además, el núcleo tricíclico le confiere mayor estabilidad metabólica al compuesto (Brown, 1996).

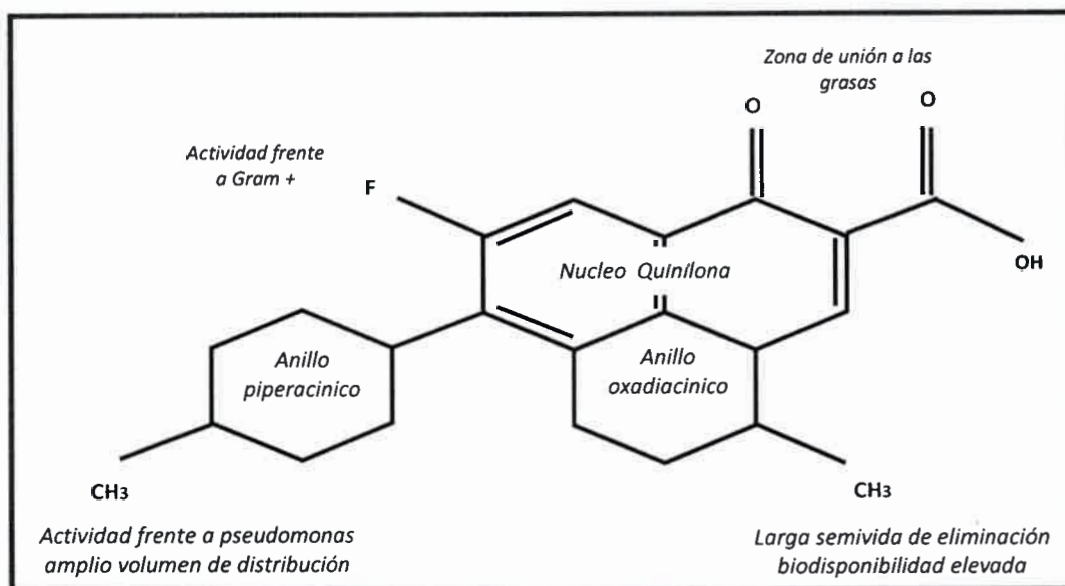


Figura 2: Modificaciones introducidas en la estructura de marbofloxacina

El ciclo piperazínico mejora la formación del complejo ADN-ADN-girasa y el ingreso en la célula bacteriana. La adición del grupo metilo en posición “*para*” del anillo piperazínico incrementa la liposolubilidad del fármaco y promueve mayor distribución tisular.

El núcleo quinolona (pyridon- $\beta$ -carboxílico) le confiere actividad antimicrobiana orientada hacia las bacterias Gram-negativas, mientras el átomo de flúor refuerza las acciones frente los gérmenes Gram-positivos. El ciclo piperazina incluido en el núcleo quinolona extiende la actividad hacia micoplasmas y pseudomonas spp.

Marbofloxacina exhibe propiedades anfóteras, posee un punto isoeléctrico de 6.85 que permite su solubilidad tanto en soluciones ácidas como básicas ( $pK_a = 5.7$ ;  $pK_b = 8$ ). El carácter ácido débil es provisto por el ácido carboxílico en  $C_6$ , mientras el carácter básico débil lo aporta el ciclo piperazina.

El pH isoeléctrico de las fluoroquinolonas es aquel en que las moléculas no se encuentran ionizadas, comprendido entre 6.8 y 7.5. Marbofloxacina experimenta mínima ionización a pH fisiológico de 7.4, atributo que facilita la distribución tisular (Sörgel & Kinzig, 1993).

## Propiedades microbiológicas

Marbofloxacin es un fármaco bactericida que desarrolla su actividad mediante la inhibición de la ADN girasa. Esta provista de amplio espectro antibacteriano, efectivo sobre gram-positivos y gram-negativos (Spreng et al., 1995).

Se comunicaron valores de CIM comprendidos entre 0.015 y 0.25  $\mu\text{g/ml}$  frente cepas de *M. haemolytica* ( $\text{CIM}_{90} = 0.124 \mu\text{g/ml}$ ;  $\text{CIM}_{50} = 0.025 \mu\text{g/ml}$ ), entre 0.004 y 0.12  $\mu\text{g/ml}$  para *P. multocida* ( $\text{CIM}_{90} = 0.022 \mu\text{g/ml}$ ;  $\text{CIM}_{50} = 0.009 \mu\text{g/ml}$ ) y entre 0.015 y 2  $\mu\text{g/ml}$  para *Histophilus somni*. Se consideran sensibles las cepas con una CIM  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$  mientras que son resistentes aquellas cepas que exhiben una CIM  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  (Giguère & Dowling, 2013).

## Antecedentes cinéticos de marbofloxacin en los animales domésticos

Las características farmacocinéticas de marbofloxacin fueron estudiadas en diferentes especies de mamíferos domésticos, entre ellas equinos (Bousquet-Melou et al., 2002; Carretero et al., 2002); porcinos (Petracca et al., 1993; Ding et al., 2010), bovinos (Thomas et al., 1994; Shem Tov et al., 1997; Schneider et al., 2004), ovinos (Shem Tov et al., 1997; Sidhu et al., 2010 b), cabras (Waxman et al., 2001; Sidhu et al., 2010 a), terneros (Ismail & El-Kattan, 2007; Errecalde et al., 2012), caninos (Schneider et al., 1996) y felinos (Albarellos et al., 2005).

En los mamíferos domésticos, la aplicación parenteral de marbofloxacin determinó rápida absorción. Luego de la aplicación intramuscular, se informaron valores de vida media de absorción de  $0.11 \pm 0.03$  horas (Shidu et al., 2010 b) a  $0.30 \pm 0.03$  horas en ovinos (Shem Tov et al., 1997); de  $0.15 \pm 0.08$  horas en porcinos (Ding et al., 2010), entre  $0.17 \pm 0.06$  horas (Schneider et al., 2004) a  $0.25 \pm 0.03$  horas en vacas lecheras (Shem Tov et al., 1997), de  $0.26 \pm 0.12$  horas en terneros (Errecalde et al., 2012) y de  $0.56 \pm 0.23$  horas en equinos (Carretero et al., 2002). La aplicación subcutánea también proporcionó pronta absorción; conforme la vida media de absorción hallada en caninos de  $0.20 \pm 0.07$  horas (Schneider et al., 1996) y de  $0.51 \pm 0.03$  horas en terneros (Ismail & El-Kattan, 2007).

La administración de posologías de 2 mg/kg por vía intramuscular determinó valores de  $C_{\text{máx}}$  plasmáticos de  $0.81 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$  en ovinos (Shidu et al., 2010 b), de  $1.21 \pm 0.108 \mu\text{g/ml}$  en caprinos (Sidhu et al., 2010 a), de  $1.77 \pm 0.24$  en hembras



caprinas (Dova et al., 2007), de  $1.81 \pm 0.39$   $\mu\text{g/ml}$  en porcinos (Ding et al., 2010), de  $1.61 \pm 0.21$   $\mu\text{g/ml}$  (Schneider et al., 2004) hasta  $1.7 \pm 0.3$   $\mu\text{g/ml}$  en vacas lactantes (Shem Tov et al., 1997) y entre  $1.4 \pm 0.1$   $\mu\text{g/ml}$  (Ismail & El-Kattan, 2007) hasta  $1.78 \pm 0.33$   $\mu\text{g/ml}$  en terneros (Errecalde et al., 2012).

En ovinos, la administración intramuscular de 2.5 mg/kg determinó un  $C_{\text{máx}}$  plasmático de 2.7  $\mu\text{g/ml}$  (Shem Tov et al., 1997) y de  $1.81 \pm 0.39$   $\mu\text{g/ml}$  en cerdos (Ding et al., 2010).

En caninos, por aplicación subcutánea de 2 mg/kg, el  $C_{\text{máx}}$  alcanzó a  $1.52 \pm 0.13$   $\mu\text{g/ml}$ , informado a las  $0.9 \pm 0.2$  horas (Schneider et al., 1996), en ovinos el  $C_{\text{máx}}$  fue de 0.57  $\mu\text{g/ml}$  (Sidhu et al., 2010 b). Estos valores de  $C_{\text{máx}}$  fueron conseguidos a las  $0.57 \pm 0.09$  horas en ovinos (Sidhu et al., 2010 b), a las  $0.72 \pm 0.16$  horas en vacas lecheras (Schneider et al., 2004) y a las  $0.71 \pm 0.35$  horas en porcinos (Ding et al., 2010).

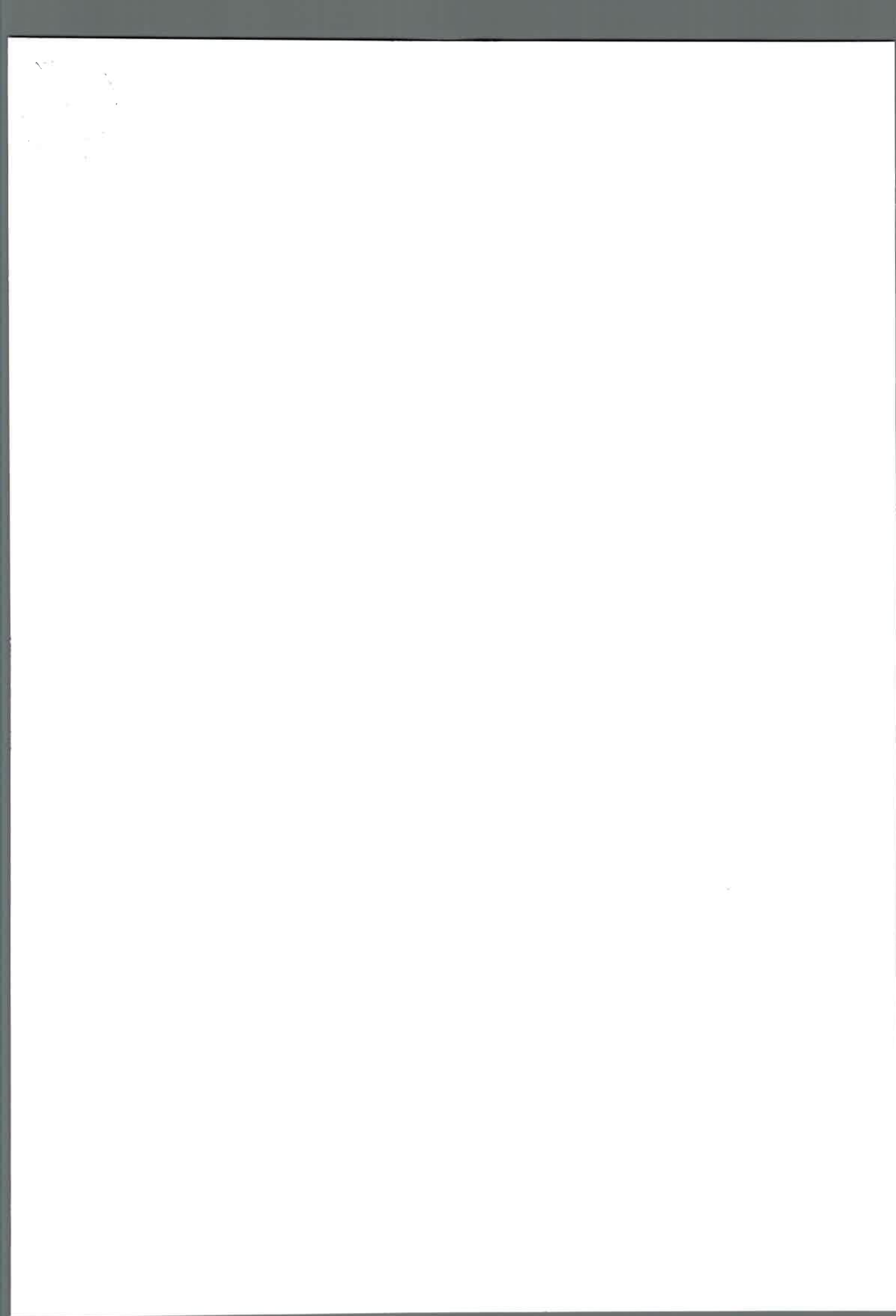
Luego de la aplicación subcutánea se informaron valores de  $T_{\text{máx}}$  de  $1 \pm 0.4$  horas en terneros (Ismail & El-Kattan, 2007),  $1.25 \pm 0.5$  horas en hembras caprinas (Dova et al., 2007), en porcinos a las  $0.71 \pm 0.35$  horas (Ding et al., 2010).

La aplicación subcutánea de marbofloxacina brindó biodisponibilidad (F) en terneros que fluctuó entre  $83.2 \pm 15.07$  % (Errecalde et al., 2012) y  $103 \pm 7$  % (Ismail & El-Kattan, 2007), de  $98 \pm 11$  % en equinos (Bousquet-Melou et al, 2002), mientras en caninos la biodisponibilidad fue del  $98.7 \pm 25.0$  % (Schneider et al., 1996).

En tanto la administración intramuscular arrojó biodisponibilidad de  $87.9 \pm 6.0$  % en equinos (Carretero et al., 2002), de  $110.2 \pm 28.3$  % en porcinos (Ding et al., 2010), de 86 % (Shem Tov, et al., 1997) a 107 % (Sidhu et al., 2010 b) en ovinos y de 107.6 % en bovinos (Shem Tov, et al., 1997). En la cabra, se obtuvo una biodisponibilidad elevada, del 100.74 % (Waxman et al., 2001).

Luego de la administración subcutánea, la distribución de marbofloxacina fue relativamente rápida, según reflejaron los valores de  $t_{1/2\alpha}$  conseguidos en caninos de  $3.8 \pm 0.9$  horas (Schneider et al., 1996) y de  $0.19 \pm 0.07$  horas en bovinos (Shem Tov, et al., 1997).

Este antimicrobiano experimentó variada permanencia plasmática en las distintas especies domésticas, según arrojan los distintos valores de  $t_{1/2\beta}$  conseguidos, que se ubican entre 2 horas (Shem Tov, et al., 1997) a  $2.53 \pm 0.28$  horas en vacas lecheras (Schneider et al., 2004),  $3.65 \pm 0.93$  horas en ovinos (Shidu et al., 2010 b),  $4.6 \pm 0.6$  horas en terneros (Ismail & El-Kattan, 2007), de  $4.74 \pm 0.8$  horas (Carretero et al.,





2002) a  $7.55 \pm 1.99$  horas en equinos (Bousquet-Melou et al, 2002), de  $5.74 \pm 1.20$  horas en hembras caprinas (Dova et al., 2007), de  $13.0 + 3.3$  horas en caninos (Schneider et al., 1996) y de  $17.3 \pm 5.38$  horas reportadas en cerdos tras la aplicación intramuscular (Ding et al., 2010). En ovinos, el TMR informado fue de  $2.82 + 0.45$  horas (Shem Tov, et al., 1997) y en caprinos de  $4.23 \pm 0.24$  horas (Sidhu et al., 2010 a).

Marbofloxacin experimentó amplia distribución tisular, según se desprende de los valores reportados de Vd en las especies domésticas: en terneros de  $1.1 \pm 0.14$  L/kg (Ismail & El-Kattan, 2007), en equinos de  $1.17 \pm 0.18$  L/kg (Carretero et al., 2002) y en caninos de  $2.24 \pm 0.31$  L/kg (Schneider et al., 1996).

En bovinos se informaron valores de Vd que varían entre  $1.03 \pm 0.11$  (Schneider et al., 2004) y  $1.5$  L/kg (Shem Tov, et al., 1997), en porcinos de  $1.3 \pm 0.14$  L/kg (Ding et al., 2010), mientras en ovinos fluctuó entre  $0.6$  L/kg (Shem Tov, et al., 1997) a  $2.77$  L/kg (Sidhu et al., 2010 b) y en caprinos osciló entre  $1.3$  L/kg (Waxman et al., 2001) y  $1.92 \pm 0.25$  L/kg (Sidhu et al., 2010 a).

La unión de marbofloxacin a proteínas plasmáticas en vacas se ubicó entre el 25 al 40 %, en vacas, fue del 15 al 30 % en caninos (Bregante et al., 2000) y del 18.4 % en porcinos (Petracca et al., 1993).

En caninos, se informó un Cl total de  $1.9 \pm 0.55$  ml/min.kg (Schneider et al., 1996), mientras en terneros fue  $3.0 \pm 0.36$  ml/min.kg (Ismail & El-Kattan, 2007), en ovinos de  $8$  ml/min.kg (Sidhu et al., 2010 b), en cerdos se registró  $2 \pm 0.33$  ml/min.kg (Ding et al., 2010) y en equinos de  $3.16 \pm 0.66$  ml/min.kg (Carretero et al., 2002) hasta  $4.16 \pm 0.83$  ml/min.kg (Bousquet-Melou et al, 2002).

Marbofloxacin, se excreta en su mayoría sin metabolizar, aproximadamente dos tercios por vía renal y un tercio por vía biliar (Lecoeur Bitchatchi & Kolf Clauw, 1998). La biotransformación genera dos metabolitos, denominados N-óxido marbofloxacin y desmetil marbofloxacin, en cantidades limitadas (Albarellos et al., 2005; Martínez et al., 2006; Čonkova et al., 2009).

En vacas, marbofloxacin se excreta un 45 % por vía biliar y un 54 % en orina, mientras que, en los terneros pre rumiantes, la eliminación por dichas vías se produce en un 10 % y un 75 %, respectivamente (Thomas et al., 1994).

Los valores de aclaramiento plasmático, semivida de eliminación y tiempo medio de residencia son muy variables, tanto en función de la especie como de la vía de administración y de la dosis administrada.

La eliminación de este antimicrobiano se realiza principalmente por orina (Martínez et al., 2006; Čonkova et al., 2009). Según Schneider et al., (1996), en caninos el 35 % del fármaco se eliminó por orina sin modificación.

En vacas, ovejas y cerdas ha sido estudiado el paso de la marbofloxacina desde el plasma a la leche, especies que se demostró acumulación del fármaco en la glándula mamaria, con cocientes  $ABC_{leche}/ABC_{plasma}$  que se encuentran entre 1.3 y 2.6 (Petracca et al., 1993; Shem-Tov et al., 1997).

Esta acumulación en leche sería consecuencia de las propiedades físico-químicas del compuesto como son su alta liposolubilidad y el punto isoeléctrico, que determinan, junto con el pH de la leche, el grado de disociación de la molécula.

Según Shem Tov et al., (1997), marbofloxacina difunde pronto en leche y de modo extenso; los niveles lácteos exceden a los plasmáticos a las 2 horas post administración.

Aplicando posologías entre 2 a 4 mg/kg de marbofloxacina por vía endovenosa ó intramuscular se consiguen niveles lácteos superiores a la CIM de la mayoría de patógenos gram-negativos al menos hasta las 12 horas post aplicación, sin embargo el antimicrobiano no se determina luego de las 24 horas post aplicación por método microbiológico, cuya sensibilidad se estableció en 0.05 µg/ml (Shem Tov, et al., 1997).

Luego de la administración de 2 mg/kg por vía intramuscular, el  $C_{máx}$  lácteo en bovinos alcanzó a  $0.4 \pm 0.1$  µg/ml (Shem Tov et al., 1997) a  $1.02 \pm 0.25$  µg/ml, generado a las  $2.5 \pm 0.9$  horas (Schneider et al., 2004). Estos autores sostienen que en vacas lecheras el perfil de las concentraciones en leche es similar al plasmático.

En bovinos el  $t_{1/2\beta}$  lácteo osciló entre las  $2.06 \pm 0.65$  horas (Shem Tov et al., 1997) y las  $3.11 \pm 0.42$  horas (Schneider et al., 2004), mientras se comunicaron cocientes  $ABC_{plasma}/ABC_{leche}$  entre  $0.72 \pm 0.13$  (Shem Tov et al., 1997) y 1.19 horas (Schneider et al., 2004).

En ovinos, la aplicación intramuscular de 2.5 mg/kg provocó un  $C_{máx}$  lácteo de  $2.1 \pm 0.2$  µg/ml y un  $t_{1/2\beta}$  de  $6.33 \pm 0.76$  horas que reveló moderada permanencia en este fluido y determinó una relación  $ABC_{leche}/ABC_{plasma}$  de  $2.64 \pm 0.38$  (Shem-Tov et al., 1997).

## Efectos adversos de la marbofloxacina

Con la excepción de las posibles anormalidades en cartílagos cuando se administra en animales jóvenes, el perfil de efectos adversos de marbofloxacina se limita, la mayoría de las veces, a la disfunción gastrointestinal que comprende vómitos, náuseas, deposiciones blandas, hipersalivación, etc. (Fernández Palacios O'Connor, 2013).

En muy raras ocasiones se ha producido midriasis, temblores musculares y reacciones en el punto de inyección. Aunque es poco probable, la base de datos de la Food and Drugs Administration (FDA), acerca de reacciones adversas ha recibido informes de ceguera relacionada con la administración de marbofloxacina, aunque no se comprobó el efecto causal (Plumb, 2010).

Este agente carece de potencial epileptogénico en posologías normales. Sólo luego de la administración de dosis elevadas se comprobó reducción de la actividad, temblores, convulsiones y uropatía obstructiva (Rubio Langre, 2011). Sin embargo, marbofloxacina puede causar estimulación del sistema nervioso central y debe aplicarse con precaución en animales con procesos convulsivos (Fernández Palacios O'Connor, 2013).

La aplicación de posologías muy elevadas, entre 50 y 600 mg/kg durante seis semanas provocó disminución testicular, oligospermia y atrofia tubular testicular. En caninos, se comprobaron artropatías tras la administración de 40 mg/kg durante 13 semanas. No se comprobó teratogenicidad, recién se manifestó con 700 mg/kg apareció toxicidad tanto para el feto como para la gestante (Rubio Langre, 2011).

## Usos clínicos de marbofloxacina

El Médico Veterinario dispone de herramientas antibacterianas eficaces como las fluoroquinolonas para controlar las infecciones más frecuente en las explotaciones ganaderas. Concretamente, marbofloxacina es un antimicrobiano de uso exclusivo veterinario (Schneider et al., 1996), efectivo frente a gérmenes gram-negativos, algunos gram-positivos y micoplasmas (Spreng et al., 1995).

En diferentes países, marbofloxacina fue aprobada para su aplicación en bovinos, porcinos, caninos y felinos, recomendada para el tratamiento de procesos respiratorios, mastitis producidas por *E. coli*, diarreas neonatales en bovinos, síndrome mastitis-

metritis-agalaxia e infecciones respiratorias en los porcinos (Thomas et al., 2001; Grandemange et al., 2002; Valle et al., 2004; Firouzi et al., 2010).

En animales de compañía se recomienda en pacientes que padecen infecciones urinarias, respiratorias y de tejidos blandos, heridas infectadas, y para prevenir infecciones quirúrgicas (Cotard et al., 1995; Gruet et al., 1997; Rougier et al., 2005).

En los últimos años se comprobó su efectividad en el tratamiento de la leishmaniosis visceral canina (Rougier et al., 2008) y en los caprinos, frente a pleuroneumonía contagiosa (Balikci et al., 2008; Nicholas & Churchward, 2012).

No obstante la ausencia de estudios farmacocinéticos obliga al clínico a establecer pautas terapéuticas fuera de prospecto -uso *extra label*-, mediante extrapolación a partir de otras especies domésticas. La infradosificación aumenta la probabilidad de manifestación de resistencias bacterianas, con riesgo de transmisión horizontal y zooantroponosis (Fernández Palacios O'Connor, 2013).

Por su parte la sobredosificación puede provocar incremento de la toxicidad (convulsiones, alteraciones articulares, o pérdida de eficacia por el efecto “eagle”). Si se considera que las fluoroquinolonas presentan un efecto bactericida concentración-dependiente, es posible predecir la eficacia potencial de una terapia con marbofloxacin mediante el estudio de los indicadores de eficacia antibacteriana (Fernández Palacios O'Connor, 2013).

Por otra parte la ausencia de datos cinéticos no permite establecer los tiempos de aclaramiento farmacológico, ni establecer el periodo de supresión previo al sacrificio, lo que aumenta el riesgo de la presencia de residuos en los productos de consumo humano.

La terapia antimicrobiana requiere del uso racional de los fármacos para minimizar los posibles errores en la elección del medicamento o en su dosificación ya que estos pueden ser la causa de un fracaso terapéutico, de la manifestación de efectos secundarios (tóxicos, residuos en alimentos y medioambiente) o de emergencia de resistencias bacterianas.

El empleo racional requiere un amplio conocimiento de las características farmacológicas de cada compuesto y del comportamiento cinético de los antimicrobianos en las distintas especie animales, ya que se demostraron diferencias entre diversos fármacos, y concretamente las fluoroquinolonas, en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción, en las diferentes especies e incluso dentro de la misma especie con diferentes edades ó estados fisio-patológicos.

## RESIDUOS

### Problemática de los residuos farmacológicos.

Los medicamentos veterinarios se aplican para garantizar la salud y el bienestar de los animales. En este contexto, estos fármacos constituyen una solución desde el punto de vista clínico, pero también significan un problema debido que todo producto administrado a un animal es susceptible de originar residuos en sus tejidos que luego se transformarán en alimentos (Motarjemi & Lelieveld, 2014).

Un residuo farmacológico es toda sustancia activa, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación y sus metabolitos que se acumulen en células, tejidos, órganos ó productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les ha administrado un medicamento veterinario determinado (Girardi & Odore, 2008; Riviere & Sundlof, 2009).

Cada vez es mas intensa la presión por parte del sector industrial y de los consumidores por consumir productos con máximas garantías de salubridad (Riviere & Sundlof, 2009), por cuanto pueden afectar negativamente la salud humana al causar afecciones alérgicas, gastrointestinales, intoxicaciones y promover el desarrollo de resistencias a los agentes microbianos (Tollefson & Karp, 2004; Demoly & Romano, 2005; Modi et al., 2013).

El propósito de producir alimentos de origen animal “libre de residuos” es un ideal y en términos absolutos es prácticamente imposible. El cero analítico carece de rigor científico y valor práctico casi nulo, pues depende del desarrollo de los métodos de detección: aquellos extremadamente sensibles podrían detectar cantidades despreciables de residuos, sin impacto negativo para la salud pública (Macri & Mantovani, 1995).

Los residuos de antimicrobianos condicionan problemas a nivel de la industria láctea tales como retraso en la acidificación de productos sometidos a fermentación, demora en la retención de agua, desarrollo de microorganismos indeseados, productos lácteos elaborados que presentan un cuerpo débil, textura blanda o arenosa y sabor alterado. También se producen interferencias en la formación del aroma en la mantequilla (Suhren, 1998; Raynal-Ljutovac et al., 2005; Modi et al., 2013; Motarjemi & Lelieveld, 2014).

Con el objetivo de ofrecer seguridad al consumidor de alimentos y limitar los eventuales riesgos que implican la permanencia de residuos en tejidos ó productos comestibles, todo fármaco debe ser sometido a análisis farmacocinético con el objetivo de determinar parámetros de eliminación y establecer límites de resguardo o retirada (Pr) (Lee & Ryu, 2000; Riviere & Sundlof, 2009) ó en su defecto el Pr se estima al multiplicar diez veces el valor del parámetro vida media biológica de eliminación ó  $t_{1/2\beta}$  (Riviere & Sundlof, 2009; Fajt 2011).

El Pr será establecido en función de la especie animal y del tejido ó fluido destinado a consumo humano (Arboix & Martín-Jiménez, 2002; Riviere & Sundlof, 2009). Corresponde al periodo de tiempo que transcurre desde la última aplicación hasta que los residuos del principio activo alcancen los niveles máximos permitidos ó Limite Máximo de Residuos (LMRs) que significa la concentración máxima de fármaco tolerado en un producto alimenticio (Modi et al., 2013).

La determinación de los LMRs debe contemplar las características farmacológicas, toxicológicas e inmunológicas de los compuestos químicos y los estudios farmacocinéticos en las especies “blanco”, que permitan identificar los metabolitos y los tiempos de disminución de los niveles en los tejidos y productos. Por lo tanto será posible determinar los tiempos de espera pos-tratamiento para tener niveles aceptables de residuos (Macri & Mantovani, 1995).

Asimismo, los LMRs deben ser estimados considerando la ingesta diaria admisible (IDA) y un cálculo conservador del consumo promedio de cada rubro relevante de alimento. Se define IDA a la ingesta diaria admisible que no produce efectos apreciables en la salud del consumidor por un tiempo prolongado, idealmente la mayor parte de su vida. El IDA es expresado como  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{peso corporal}/\text{día}$  ó  $\text{mg}/\text{día}$  en un individuo de 60 kg de peso (Macri & Mantovani, 1995; Paige & Tollefson, 2003).

Respecto a las fluoroquinolonas, si bien se han reportados casos de trastornos hepáticos, renales y alérgicos producidas por fluoroquinolonas, estos fármacos son considerados inhibidores seguros. De igual modo los mayores recaudos recaen sobre niños y mujeres embarazadas.

En humanos se reportaron tras la aplicación de fluoroquinolonas, patologías vinculadas a tendinitis e incluso a rupturas tendinosas (Kato, 2008), aumentando su incidencia si existe administración conjunta con corticoides, agresión posible aun después de varios meses de finalizado el tratamiento (González & Nieto, 2007).



El incremento de la resistencia a las fluoroquinolonas, es planteado como problema importante relacionado al uso excesivo en animales domésticos y a la administración de dosis inadecuadas, pues denota un riesgo en salud pública por cuanto involucra a bacterias zoonóticas como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp y VTEC - verotoxin-producing *E. coli*-, aunque la incidencia varía según la especie animal que las origina, el agente considerado y la nación del mundo (Paige & Tollefson, 2003; Girardi & Odore, 2008; Domínguez Rodríguez et al., 2010).

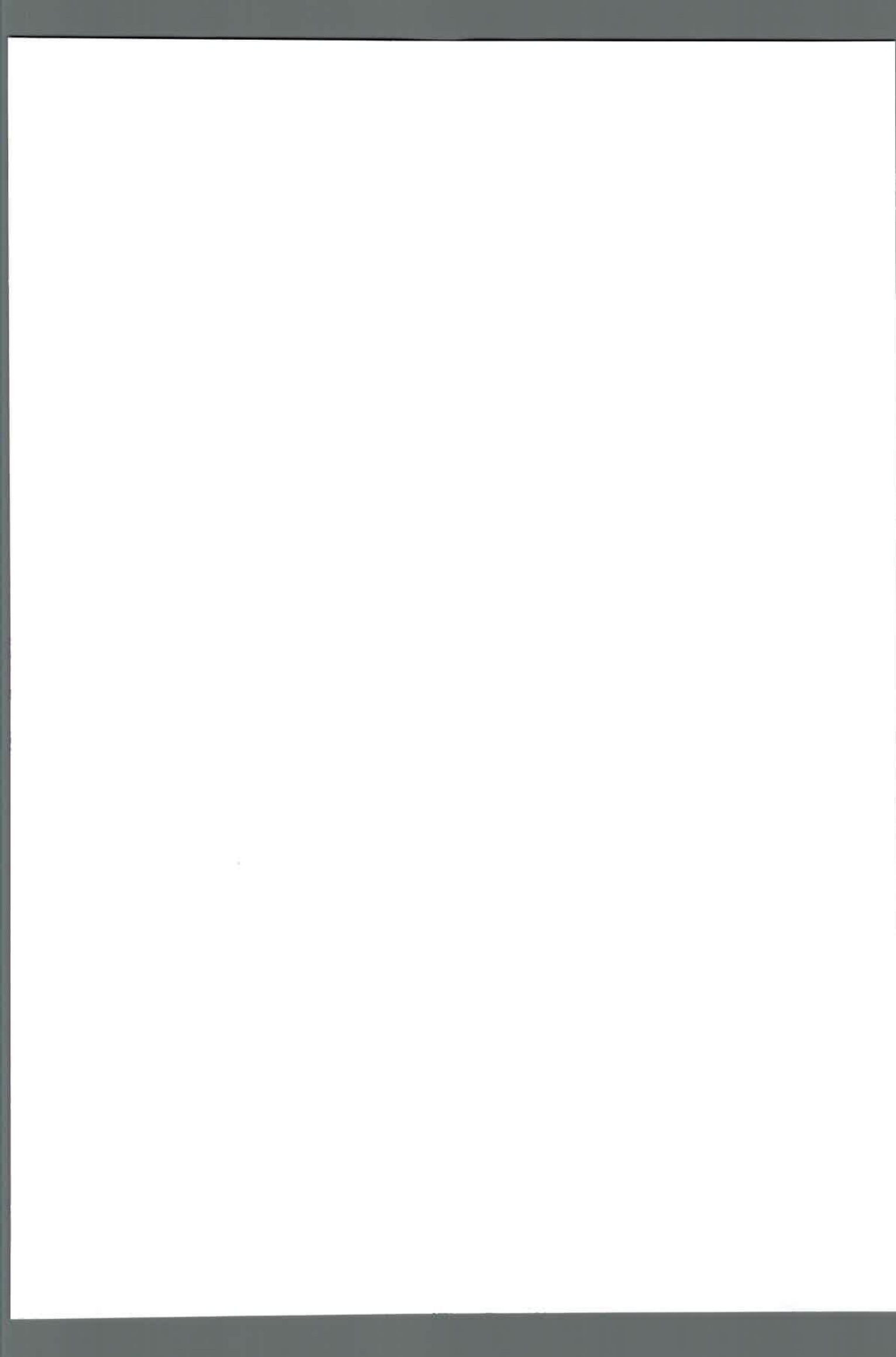
Este inconveniente ha estimulado controversias respecto a su aplicación en los animales de producción cuyos productos y subproductos ingresan en la cadena alimentaria humana, tras la manifestación de cepas *Campylobacter jejuni* resistentes y la menor susceptibilidad de *Salmonella thiphymurium* a la ciprofloxacina, inmediatamente después de aprobarse la enrofloxacin para uso en animales en el Reino Unido (Paige & Tollefson, 2003; Girardi & Odore, 2008; Domínguez Rodríguez et al., 2010; Boerlin & White, 2013).

En la actualidad la Administración Federal de Drogas (FDA) de USA no autoriza el uso de nuevas fluoroquinolonas en animales destinados a producción debido al incremento de cepas hospitalarias resistentes, aspecto relacionado con la aplicación oral y la presunción de inefectividad de fluoroquinolonas para tratar infecciones en humanos, particularmente las causadas por los géneros *Campylobacter* spp y *Salmonella* spp (Paige & Tollefson, 2003; Jensen et al., 2008; Boerlin & White, 2013).

El problema de residuos de fluoroquinolonas es significativo debido a la posibilidad de resistencia cruzada con otros integrantes del grupo, inclusive entre las utilizadas en animales y las disponibles para uso humano (Orden & de la Fuente, 2001; Boerlin & White, 2013) y por la elevada estabilidad térmica que exhiben estas sustancias, propiedad que las protege de temperaturas extremas como las que se logran durante la cocción de los alimentos (Roca et al., 2010). De todos modos, el problema de la resistencia a fluoroquinolonas en los caprinos, por el momento, no resulta significativo, por cuanto la incidencia es mínima, posiblemente consecuencia de las restricciones impuestas a este grupo de fármacos (Scott & Menzies, 2011).

### **Límites máximos de residuo y periodo de supresión**

El **summary report** del comité para productos veterinarios de la Agencia Europea de Medicamentos establece en el documento EMEA/MRL/693/99-FINAL



(EMEA, 2000), que marbofloxacin se incluya en el Anexo I del Reglamento (CEE) del Consejo n° 2377/90 (luego derogado y sustituido por el Reglamento (EC) del Parlamento Europeo y del Consejo n° 470/2009).

En el mencionado documento, considerando la Ingesta Diaria Admisible (ADI), se establecen LMRs para marbofloxacin en productos cárnicos (músculo, hígado y riñón) procedentes de vacunos y de porcinos, haciendo la salvedad de la tasa permitida en grasa de vacuno que se aplica con igual magnitud al conjunto de grasa y piel en porcinos. En el vacuno se incluyen los valores de LMR para leche de 75 µg/ml, valor adoptado por la Unión Europea (González & Nieto, 2007).

La consecuencia práctica de estos límites es el establecimiento de los periodos de supresión o tiempos de espera (Pr) para los productos comerciales que incluyan a la marbofloxacin.

En el bovino, el periodo de supresión de marbofloxacin para el consumo de carne es de 3 días tras la administración intramuscular y de 6 días tras la administración subcutánea, mientras que en cerdos el periodo de supresión es de 4 días para la carne. Finalmente, para la leche el periodo de supresión es de 72 horas luego de la administración intramuscular y de 36 horas tras la aplicación por vía subcutánea. Para completar estos datos, Shem-Tov et al. (1997), afirmaron la ausencia de marbofloxacin en leche transcurridas 24 horas de la administración intravenosa o intramuscular del fármaco a dosis de 2, 2.5 y 4 mg/kg.

Los preparados comerciales disponibles que contienen marbofloxacin recomiendan un periodo de resguardo de 5 ordeños ó 3 días, según refiere el prospecto de Marbocyl 10%, solución inyectable, Laboratorio Vetoquinol, España; hasta 72 horas acorde las indicaciones de Ubiflox Cattle, 100 mg/ml, Irlanda y de Marbiflox 100 mg/ml, Dechra Veterinary Products Limited, UK.

Si bien, cada país tiene su reglamentación pertinente sobre cada fármaco (Reeves, 2010), es necesario que los organismos de gobiernos implementen técnicas analíticas de control para la determinación de residuos, como así también el compromiso de los profesionales a la hora de implementar un medicamento, producto de que muchas veces la resistencia se debe a fallos terapéuticos y los residuos a la falta de espera a la hora de sacrificar u ordeñar a los animales.

Las consecuencias de la presencia de inhibidores incide negativamente en la calidad de la leche caprina (Suhren, 1998; Silanikove et al., 2010; García et al., 2014), plantea riesgos para la salud pública (Demoly & Romano, 2005), interfiere en los

procesos industriales de fermentación de la leche al perjudicar el desarrollo de bacterias lácticas (Suhren, 1998; Raynal-Ljutovac et al., 2005) y afecta la imagen de este producto, alimento que goza de confianza en los consumidores (Motarjemi & Lelieveld, 2014).

Desde el aspecto económico, la exportación de leche puede ser perjudicada ya que esta sometida a controles de LMR químicos, diferentes para cada fármaco, y con niveles de exigencia diferentes para cada país importador. Para superar las barreras comerciales internacionales asociadas con residuos de antibióticos en leche, deberían estandarizarse los métodos de evaluación para determinar LMR y establecer programas de vigilancia activa del monitoreo de residuos.

El Centro de Medicina Veterinaria (CMV) de la Food and Drug Administration (FDA, USA) desarrolló un programa de residuos en tejidos, cuya meta principal es reducir la exposición del consumidor a residuos de drogas en tejidos comestibles.

Este programa centraliza en la prevención y el refuerzo de las regulaciones para restringir la prevalencia de residuos ilegales en productos y subproductos que llegan al consumidor (Guest & Paige, 1991). En el año 2000 el Centro para medicina veterinaria de FDA propuso el retiro de aprobación con respecto al uso de enrofloxacin.

La cantidad de fármaco secretado a la leche se incrementa con su mayor liposolubilidad y menor su peso molecular, su afinidad por proteínas plasmáticas y su grado de ionización: la proporción de fármaco ionizado / no ionizado es una función de la interacción entre su pKa y el pH del medio donde se encuentre (Baggot & Giguère, 2013).

La transferencia de inhibidores de la sangre a la leche es facilitada por transportadores de membranas de alta capacidad de eflujo (Ito & Lee, 2003). Estos transportadores, denominados ABC ó ATP-binding cassette resguardan al organismo ante situaciones de toxicidad por xenobióticos y metabolitos endógenos (Sarkadi et al., 2006; Schrickx & Fink-Gremmels, 2008; Robey et al., 2009).

Los ABCG2/BCRP también atañen a esta familia de transportadores, que desempeñan un rol clave en la protección de tejidos frente a xenobióticos pues es un mecanismo relevante implicado en la aparición de residuos de fármacos y xenotoxinas en la leche (Kaminski et al, 2006; Schrickx & Fink-Gremmels, 2008; Sharom, 2008; Vlaming et al., 2009).

Se demostró con enrofloxacin en ovejas (Pulido et al., 2006), con marbofloxacin en cerdas (Petracca & Wanner, 1993) y con norfloxacin en ovejas



(Soback et al., 1994) que durante la lactancia se incrementa la eliminación de fluoroquinolonas desde la sangre a la leche.

El BCRP ó Breast Cancer Resistant Protein, incrementa su expresión en los periodos de lactancia en bovinos, ovinos y humanos y promueve la eliminación de fármacos y xenobióticos (Merino et al. 2005 a, b; Merino et al. 2006; Pulido et al. 2006; Kusuhara & Sugiyama 2007).

Cabe destacar la expresión del transportador ABCG2 en la glándula mamaria lactante de distintas especies como ratones, ovejas, vacas y humanos, y su rol en la excreción de fármacos a leche (Jonker et al., 2005; Pulido et al., 2006; González Lobato, 2012).

Estudios inmunohistoquímicos y por western-blot realizados en diferentes estados de desarrollo de la mama, revelaron que ABCG2 no se expresa en ratones hembra de 8 ó 14 semanas de edad, pero durante la gestación y, especialmente en la lactación, aumenta su expresión considerablemente, aunque disminuye pronto durante la involución de la glándula.

En contraposición con el papel protector propuesto en la placenta, varios estudios demostraron que ABCG2 en la glándula mamaria actúa concentrando compuestos en la leche materna, con diferencias interespecíficas importantes en la expresión de estos transportadores (Li et al., 2008; González Lobato, 2012).

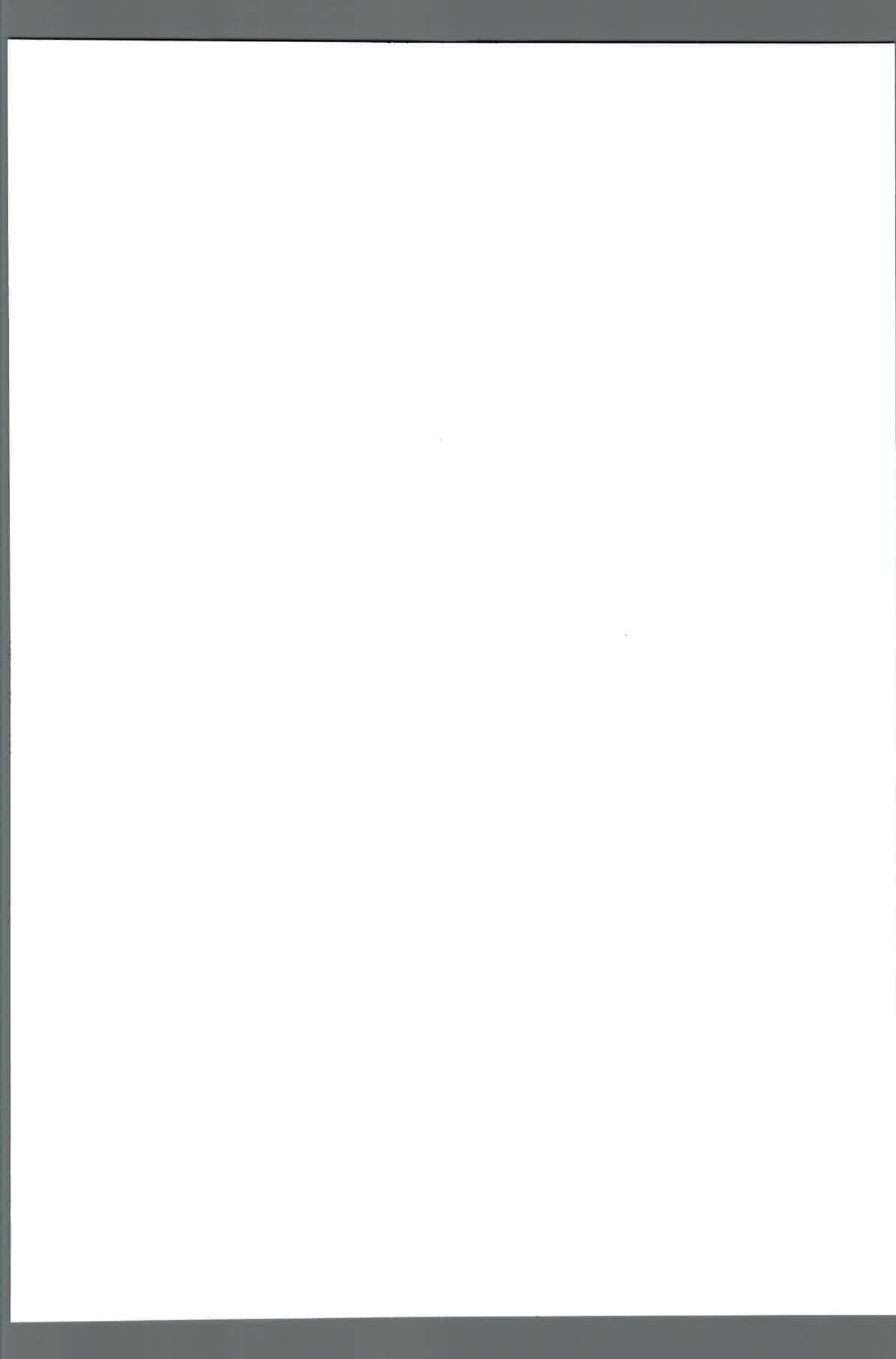
El rol de ABCG2 en la secreción de fluoroquinolonas en la leche fue confirmado en ratones *ABGG2-/-*. La concentración en leche y el cociente leche/plasma para la ciprofloxacina fue dos veces mayor en ratones *wild-type* versus ratones *ABCG2-/-* tras la inyección intravenosa (Merino et al., 2006).

En el caso de marbofloxacina se han detectado mayores niveles en leche que en plasma (Shem-Tov et al., 1997), lo que podría indicar que marbofloxacina es transferida a la leche mediante ABCG2 (González Lobato, 2012).

En el caso de marbofloxacina, existe poca información referente a los tiempos de espera que es necesario contemplar para que los productos o subproductos de animales no contengan residuos de estas sustancias.

### **Estudios de residuos:**

El límite de tolerancia percentil 99 con 95% de confianza es un procedimiento que establece el tiempo de retirada para que podamos estar seguros de con 95% de



confianza de que al menos 99% de los animales ajustan sus niveles residuales a niveles tolerables en el tiempo especificado (Weber, 1992).

Actualmente, para uniformar los cálculos para fármacos que se quieran comercializar en Europa, la Agencia Europea de Medicamentos, a través de su página web (European Medicines Agency, <http://www.ema.europa.eu/ema/>), facilita el uso del software que permite calcular los tiempos de retiro en leche (Weber, 1992; Reeves, 2010).

### **Métodos analíticos para la determinación de fluoroquinolonas**

La seguridad alimentaria es un criterio básico que debe regir la producción de alimentos en todos los eslabones de la cadena, por lo tanto es indispensable no sólo instruir a los productores de leche caprina en cuanto al empleo racional de antimicrobianos e implementar estrategias para el control de residuos de inhibidores.

Las herramientas disponibles para la detección de inhibidores fueron desarrolladas para la leche de origen bovino y están orientadas esencialmente hacia los grupos betalactámicos y tetraciclinas (Zvirauskiene & Salomskiene, 2007).

Consisten en ensayos físico-químicos que incluyen electroforesis, etc, que permiten la detección cuali-cuantitativa en contraste con los métodos microbiológicos como el Char Farm Test, Delvotest P y Delvotest SP, que valoran cambios en el crecimiento ó el metabolismo de microorganismos sensibles utilizados como indicadores, y las pruebas de receptor, aglutinación de látex ó Spot Test e inmunoensayo enzimático (Suhren & Hammer, 1998; Escobar, 1999; Zvirauskiene & Salomskiene, 2007).

Estos ensayos son utilizados por su simpleza y rapidez, proveen resultados sólo cualitativos y en leche caprina generan resultados falsos positivos, influenciados por la cantidad de células somáticas, productos de la inflamación y el elevado contenido de materia grasa (Zeng et al., 1996; Contreras et al., 1997; Schenck & Callery, 1998), de modo que la extrapolación de las técnicas de detección cualitativas disponibles para leche de bovinos no están validadas para leche de caprinos (Hinckley et al., 1994; Zeng et al, 1996; Contreras et al, 1997).

La situación expuesta revela la necesidad de desarrollar métodos de detección específicos para esta especie (Hinckley et al., 1994; Silanikove et al., 2010), en



particular para las fluoroquinolonas mas recientes, cuyo empleo no es admitido en las hembras lecheras en producción debido a la eventuales efectos nocivos hacia los consumidores de leche (Brown, 1996; Papich & Riviere, 2009) y que tras la administración parenteral, ciertas propiedades físico químicas de éstas sustancias sugieren extensa disposición tisular y vaticinan concentraciones elevadas en la glándula mamaria, que habitualmente exceden a las plasmáticas (Brown, 1996; Escudero et al., 2007; Papich & Riviere, 2009).

En las matrices biológicas se emplea corrientemente la cromatografía líquida ó High Performance Liquid Chromatography (HPLC), asociada a detección ultravioleta ó de fluorescencia y eventualmente, espectrometría de masas (Aerts et al., 1995; Hernández-Arteseros et al., 2002; Cinquina et al., 2003; Idowu & Peggins, 2004; Reig & Toldrá, 2009).

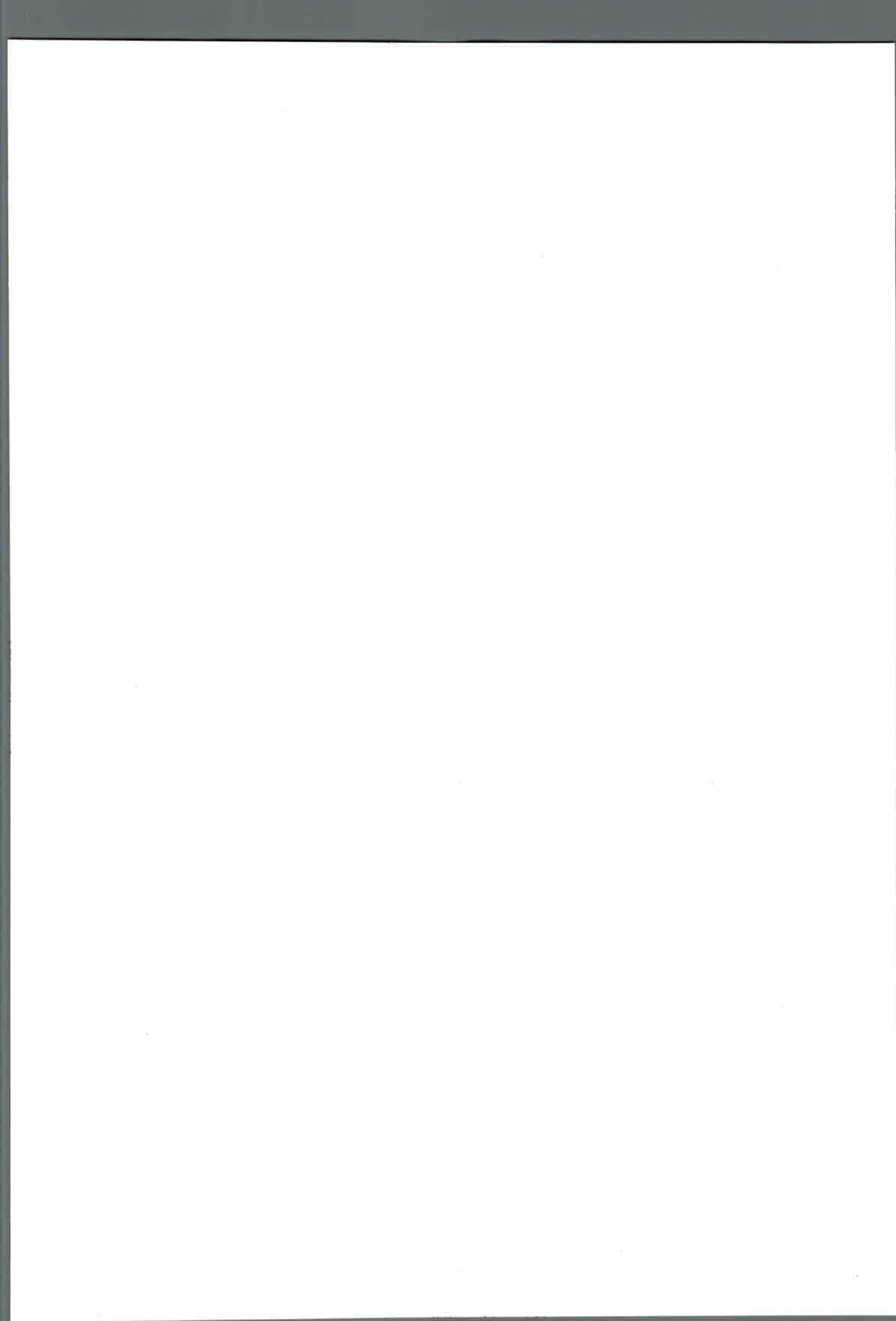
Esta técnica presenta sensibilidad analítica y ofrece la ventaja de que pueden determinarse separadamente las concentraciones del compuesto original inalterado y sus metabolitos (Carlucci, 1998), superando otros métodos, considerados poco específicos, como el microbiológico (Carlucci, 1998; Marzo & Dal Bo, 1998).

Cada fluoroquinolona tiene propiedades físico-químicas específicas, que definen exactamente el procedimiento de análisis necesario para su detección y permiten que la sustancia sea separada y aislada de otros compuestos mediante etapas en su extracción y análisis (Andreu et al., 2007; Schneider, 2009).

Existe variada información respecto a la determinación de diferentes fluoroquinolonas mediante HPLC en leche bovina (Yang et al., 2005; Rodríguez Díaz et al., 2006; Hassouan et al., 2007; Tang et al., 2009) y caprina (Cinquina et al, 2003; Escudero et al., 2007).

Estos ensayos si bien son específicos y sensibles, aplican metodologías provistas de cierta complejidad y en algunos casos requieren extracción por fase sólida ó posibilitan la detección mediante derivatización ó con arreglo de diodos (Schneider, 2009).

El mayor inconveniente que afecta el análisis de estas moléculas es la naturaleza de la matriz en la que se encuentran, por si mismas son complejas por cuanto contienen proteínas, grasas, enzimas y otras macromoléculas, que interfieren con la sustancia a determinar y obstaculizan la extracción del analito (Aerts et al., 1995; Reig & Toldrá, 2009; Schneider, 2009).



El proceso tendiente a remover macromoléculas u otras sustancias incorporadas en la matriz ó *clean up*, contempla alternativas como 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 la concentración inicial esperable en la muestra, e implica que el procedimiento adoptado sea cada vez más específico para la molécula en sí (Aerts et al., 1995).

Un método de análisis que comprenda varias etapas de extracción, en general, exhibe baja recuperación y por 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 debe ser mucho más específica y selectiva (Aerts et al., 1995).

La extracción constituye el mayor desafío con las fluoroquinolonas, que su naturaleza anfótera, resultado del grupo piperazinil y el ácido carboxílico (Marzo & Dal Bo, 1998), 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).

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 su detección.

Consecuencia de la naturaleza polar de estas sustancias, algunos procedimientos utilizados para la extracción son complejos (Andreu et al., 2007), otros demandan numerosos solventes orgánicos, los habituales son diclorometano (Bailac, et al., 2004; Idowu & Peggins, 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; Cinquina, et al., 2003; Verdon et al., 2005), seguido de extracción líquida ó en fase sólida y por la desnaturalización con ácido perclórico (Marzo & Dal Bo, 1998; Bailac et al., 2004).

Debido que las fluoroquinolonas fluorescen por la incorporación del grupo piperacinil, suele emplearse el para su determinación (Carlucchi, 1998; Marzo & Dal Bo, 1998). La fluorescencia depende del pH del medio; los mejores resultados se logran entre rangos de pH de 2.5 a 4.5 (Ramos et al., 2003; Carlucchi, 1998).



La dificultad del análisis puede afectar la estabilidad del analito en estudio ó impedir que la molécula se separe del resto de componentes de la matriz. En este caso puede quedar retenida en la misma ó bien que no se aísle de otros compuestos inherentes a la muestra, interfiriendo en la detección del analito (Aerts et al., 1995).

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

La incorporación de acetonitrilo en la fase móvil mejora 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).

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 (Barnes, 1992; 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 (Barnes, 1992; Chang, 2000).

Suhren & Hammer (1998), en ensayos de validación en realizados en leche bovina, determinaron límites de detección y de cuantificación de 0.001 µg/gr y de 0.0025 µg/gr, respectivamente, mientras la recuperabilidad alcanzó el 108 %.

## HIPÓTESIS

Marbofloxacin presenta en caprinos una cinética de distribución similar al de otras especies animales, alcanzando niveles sanguíneos y tisulares compatibles con el tratamiento de patologías bacterianas de distinta localización orgánica. Así mismo, los tiempos moderados de resguardo para la leche caprina, permiten indicar este antibiótico en cabras lactantes, sin los inconvenientes de drogas de larga permanencia.

## OBJETIVOS

### Objetivo General:

- Describir la disposición y establecer el periodo de resguardo de marbofloxacin en plasma y leche de cabras.

### Objetivos específicos:

- Obtener parámetros descriptivos de la disposición de marbofloxacin en plasma y leche.
- Establecer el periodo de resguardo para el consumo y/o con destino a procesamiento de leche caprina tratada con marbofloxacin.
- Disponer de una técnica analítica que permita detectar niveles residuales de marbofloxacin en leche caprina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Equipos y material de Laboratorio

- Agitador magnético con superficie térmica regulable.
- Balanza analítica Ohaus Explorer, sensibilidad 0,0001g.
- Campana de extracción de gases y vapores.
- Centrífuga de mesa, 2500 rpm.

- Centrífuga refrigerada Presvac EPF-12R, régimen 14.000 rpm, con temperatura, velocidad y tiempo regulables.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC).
- Equipo de filtración de vidrio borosilicato, 1000 mL, acoplado a bomba de vacío.
- Heladera y freezer con temperatura regulable.
- Peachímetro digital Orion con error de 0.001 unidades
- Propipeta y micropipetas Nichipet de 200 y 1000  $\mu$ L.
- Sonicador Ultrasonic Cleaner PS-10
- Vortex Fbr, 3500 rpm.

### **Material farmacológico y reactivos**

- Acetonitrilo calidad HPLC (Laboratorio Baker)
- Acido clorhídrico proanálisis (Laboratorio Cicarelli)
- Acido ortofosfórico (Laboratorio Sintorgan)
- Ácido tricloroacético, solución 50% p/v, Laboratorio Biopack)
- Agua deionizada (Laboratorio Biopack)
- Enrofloxacina al 99.31 % (Laboratorio Chile)
- Heparina, solución 5000 UI (Laboratorio Northia)
- Marbofloxacina 99.9 %, (Laboratoio Zhejiang Guobang Pharmaceutical)
- Metanol calidad HPLC (Laboratorio Baker)
- Trietilamina calidad HPLC (Laboratorio Sintorgan)

### **Animales**

Como sujetos experimentales se utilizaron cabras criollas provenientes de un rebaño de 110 animales, en período de lactación de 10 a 30 días post parto para estandarizar los niveles de producción.

Los animales fueron evaluados clínicamente al inicio del ensayo, encontrándose los mismos sanos y libres de tuberculosis y brucelosis. Las cabras estuvieron sujetas a idénticas condiciones de alimentación, consistente en pastura natural desde la mañana hasta el encierro en horas de la tarde, momento en que se las suplementó con heno de alfalfa y maíz molido.

Al inicio del ensayo ninguno de los animales experimentales registró antecedentes recientes de tratamientos con antimicrobianos. Durante el transcurso de la experiencia contaron con alimento, agua ad-libitum y recibieron la sujeción mínima indispensable para facilitar la extracción de las muestras de sangre y leche, sin que manifestaran signos evidentes de estrés. En un diseño cruzado de tratamiento se utilizaron 6 hembras caprinas criollas de  $40 \pm 3.1$  kg de peso, conformadas en 2 lotes. El lote A (n=3) recibió 2 mg/kg de marbofloxacina comercial (Marbocyl 10%, frasco ampolla x 100 ml, laboratorio Vetoquinol, España) por vía endovenosa en la vena yugular derecha, mientras que el lote B (n= 3) recibió idéntica dosis por vía subcutánea. Dos semanas después se intercambiaron los tratamientos.

### **Lugar de realización y material biológico.**

La experiencia se realizó en el mes de septiembre de 2013, en las instalaciones de la Granja Siquem, distante aproximadamente a 15 Km al este de la ciudad de Río Cuarto, provincia de Córdoba, dentro de las coordenadas geográficas  $33^{\circ} 07' 21''$  latitud sur y  $64^{\circ} 13' 28''$  longitud oeste.

Anterior a la administración de marbofloxacina, se obtuvieron muestras de leche y sangre de los animales afectados al ensayo. Las muestras de sangre, colectadas en tubos heparinizados, fueron centrifugadas durante 10 minutos a 2500 rpm. El plasma resultante y las muestras de leche se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se emplearon para conformar un pool de reserva de plasma y otro de leche, utilizados para confeccionar las curvas de calibración.

Luego de la aplicación de marbofloxacina, se extrajeron de cada animal muestras de 2 ml de sangre de la vena yugular izquierda en los siguientes tiempos: 10, 20, 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Las muestras se depositaron en tubos heparinizados estériles y fueron centrifugados a 1200 G durante 5 minutos para separar el plasma.

El volumen de plasma obtenido se dispuso en tubos Eppendorf. Cada muestra fue rotulada con el correspondiente tiempo de extracción y número de animal. El material se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  sin aditivos hasta su análisis por HPLC.

Sólo en los animales que recibieron marbofloxacina por vía subcutánea, se obtuvieron muestras de leche (2 ml) previo a la administración del antimicrobiano y a los 15, 30, 45 minutos y 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, las últimas



obtenidas inmediatamente antes del ordeño diario. Cada muestra fue rotulada con el correspondiente tiempo de extracción y número de animal. El material se conservó a -20°C sin aditivos hasta su análisis por HPLC.

### **Soluciones**

Se preparó una solución stock de marbofloxacina de 100 µg/ml. Se pesaron exactamente 10,01 mg equivalentes a 10 mg de marbofloxacina base, en un vaso de precipitado se 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, luego se sonicó durante 30 minutos para asegurar la completa disolución.

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

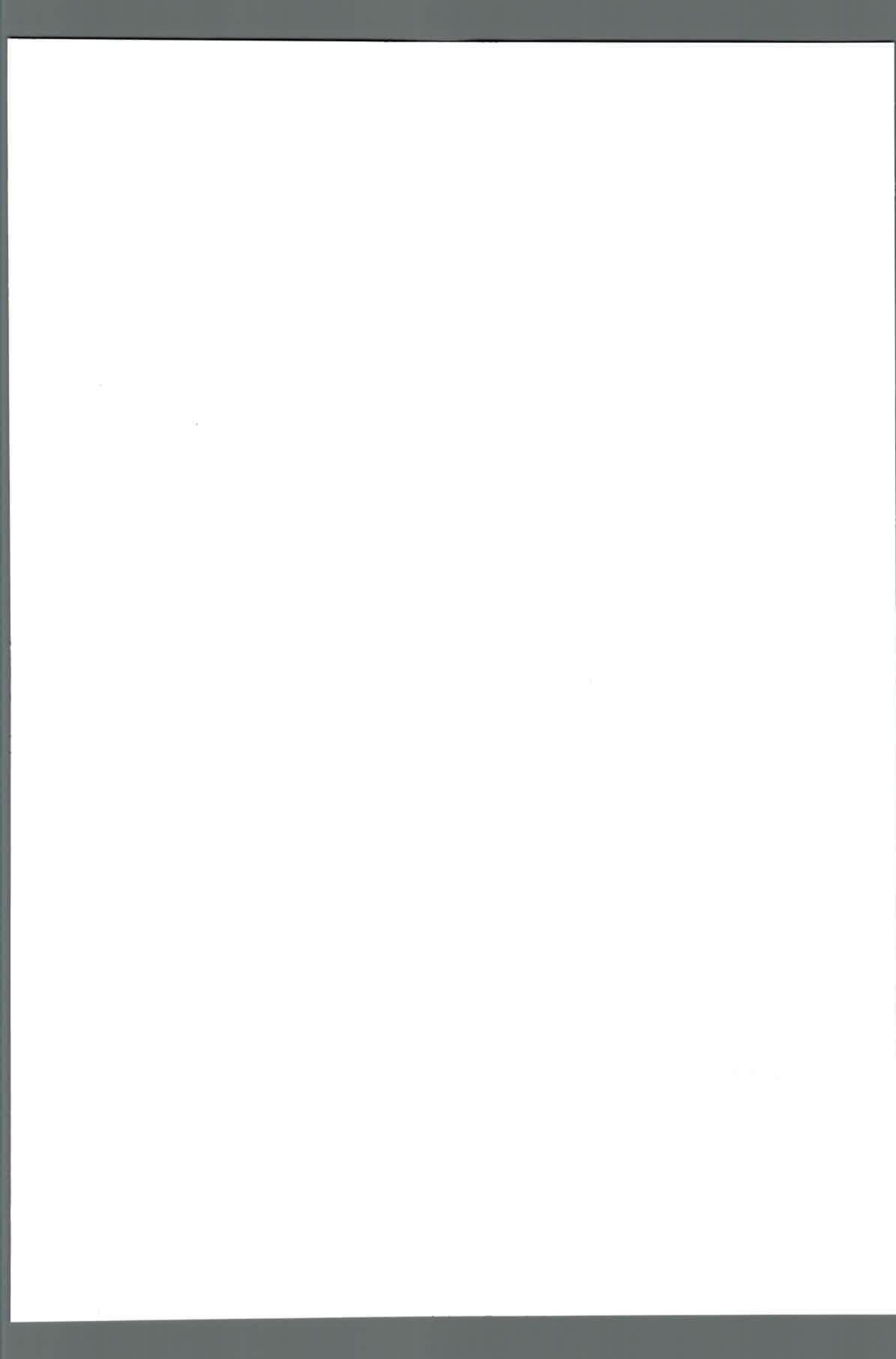
Se confeccionó una solución stock de enrofloxacina (100 µg/ml). Se pesaron exactamente 10,069 mg enrofloxacina, equivalentes a 10 mg de enrofloxacin base, se disolvieron con 3 ml de HCL 0.1 N y luego se agregó agua deionizada y aforó en matraz 100 ml. La solución fue sonicada durante 30 minutos para asegurar la completa disolución.

La solución se conservó a temperatura ambiente, al abrigo de la luz. A partir de la solución stock de enrofloxacina se elaboró una solución de 2.5 µg/ml de enrofloxacina, que se utilizó como estándar interno.

La fase móvil se preparó con agua deionizada, acetonitrilo y trietilamina (790:200:10 v/v/v) ajustada a pH 3.0 con ácido ortofosfórico, utilizando un pHmetro Orión 410, calibrado mediante soluciones buffer patrón pH 4.0 y pH 7.0. La fase móvil fue filtrada con bomba de vacío y filtro de nylon de 0.22 µ y conservada en heladera hasta su empleo.

### **Separación y cuantificación**

La separación y cuantificación se llevó a cabo con un equipo de cromatografía líquida de alta performance Hewlett-Packard, serie 1050, inyector manual Rheodyne,



provisto de bomba cuaternaria y desgasificador de fase móvil en línea y columna octadecilsilano C-18, 5  $\mu\text{m}$ , de 25 cm marca Agilent y precolumna Phenomenex.

### Software

Los datos de concentraciones plasmáticas y lácteas obtenidas por tiempo se analizaron con el programa farmacocinético no compartimental PK Solution 2.0 Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis (Farrier, 1999).

El software provisto por la EMEA, WTM 1.4 (Hekman & Hoogland, 2000), se aplico para la estimación del periodo de resguardo.

### Tratamiento de las muestras

En el plasma el ensayo preparativo consistió en la extracción líquido-líquido del analito utilizando 200  $\mu\text{L}$  de plasma, 200  $\mu\text{L}$  de agua deionizada, 800  $\mu\text{L}$  de metanol y 20  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de enrofloxacin 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 14000 rpm a 4°C durante 30 minutos, según Böttcher et al. (2001).

El sobrenadante fue filtrado con filtro de nylon de 0.22  $\mu$  y 50  $\mu\text{L}$  del mismo se emplearon como volumen de inyección de la muestra para su separación y cuantificación por HPLC.

Las muestras de leche se trataron con ácido tricloroacético al 50 %, 2:1 v/v, luego fue sometida a 30 segundos de vórtex y centrifugado a 14000 rpm durante 10 minutos.

Empleando 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante obtenido, el ensayo preparativo consistió en la extracción líquido-líquido del analito utilizando 200  $\mu\text{L}$  de agua deionizada, 800  $\mu\text{L}$  de metanol y 20  $\mu\text{L}$  de una solución de 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de enrofloxacin 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 14000 rpm a 4°C durante 30 minutos, según Böttcher et al. (2001).

El sobrenadante fue filtrado con filtro de nylon de 0.22  $\mu$  y 50  $\mu\text{L}$  del mismo se emplearon como volumen de inyección de la muestra para su separación y cuantificación por HPLC.

### Procedimiento de separación y cuantificación

Se utilizó un equipo de HPLC serie 1050 de Hewlett-Packard, dotado de bomba cuaternaria, desgasificador de fase móvil en línea, inyector manual tipo Rheodyne, detector de fluorescencia y computadora personal con placa y programa para el control del equipo, adquisición y procesamiento de los datos e impresión de los cromatogramas.

La separación y cuantificación se concretó a temperatura ambiente, mediante elución isocrática en fase reversa con un flujo de 0.8 ml/minuto, empleando una columna octadecilsilano C-18, 5  $\mu\text{m}$ , de 25 cm marca Agilent, precolumna Phenomenex. La lectura del detector de fluorescencia se ajustó a 490 nm de emisión y 295 nm de excitación, según lo propuesto por Böttcher et al., (2001).

### Cálculo de las concentraciones de marbofloxacin

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

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

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

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



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

### **Análisis farmacocinético**

El programa cinético no compartimental PK Solution 2.0 (Farrier, 1999), se aplicó para el análisis fármacocinético individual en el plasma aplicando las concentraciones de marbofloxacina obtenidas en cada tiempo de muestreo, dosis y peso de cada animal utilizado en el trabajo.

Por cada vía de administración, en cada animal se calcularon los parámetros farmacocinéticos robustos, indispensables para valorar la disposición de marbofloxacina en plasma, tales como: vida media ( $t_{1/2\beta}$ ), concentración a tiempo cero ( $C_0$ ), volumen de distribución ( $V_{d\text{área}}$ ), clearance ( $Cl_t$ ), área bajo la curva (ABC), concentración máxima ( $C_{\text{máx}}$ ), tiempo para alcanzar concentración máxima ( $T_{\text{máx}}$ ), tiempo medio de residencia (TMR).

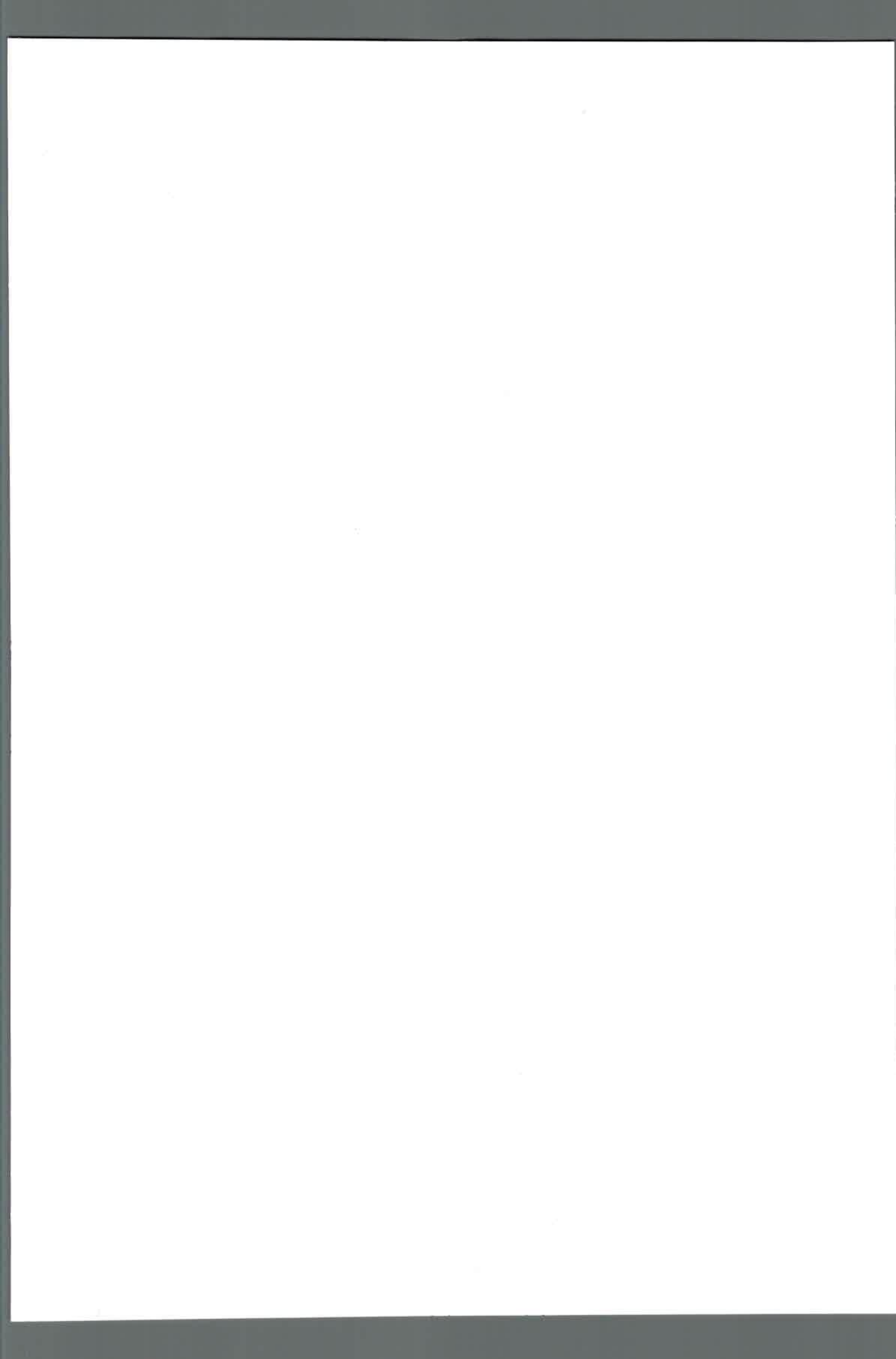
En cada animal se estimó la biodisponibilidad (% F) para la aplicación subcutánea, según la siguiente ecuación:

$$F = \frac{ABC_{Sc}}{ABC_{EV}} \times 100$$

El análisis fármacocinético de los datos obtenidos de concentraciones lácteas por animal se concretó mediante el programa cinético PK Solution 2.0. Se estimaron parámetros cinéticos robustos como  $C_{\text{máx}}$ ,  $T_{\text{máx}}$ , ABC, etc, que permitieron establecer el grado de ingreso de marbofloxacina a la secreción láctea.

### **Cálculo del período de retiro en leche (Pr)**

El Pr se estimó mediante el software WTM 1.4 (Hekman & Hoogland, 2000), sugerido por la Agencia Europea de Medicamentos, aplicando las concentraciones residuales de marbofloxacina hasta las 96 horas, aplicando el método “Tiempo hasta concentración segura” (TTSC), recomendado por las normativas EMEA/CVMP/473/98-Final (EMEA, 1998).



### Validación del método analítico

Previo al análisis de las muestra problemas se validó la metodología cromatográfica, mediante 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 marbofloxacina y el estándar interno, enrofloxacina.

El ensayo de linealidad residió en establecer 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:

$$y = a + b x$$

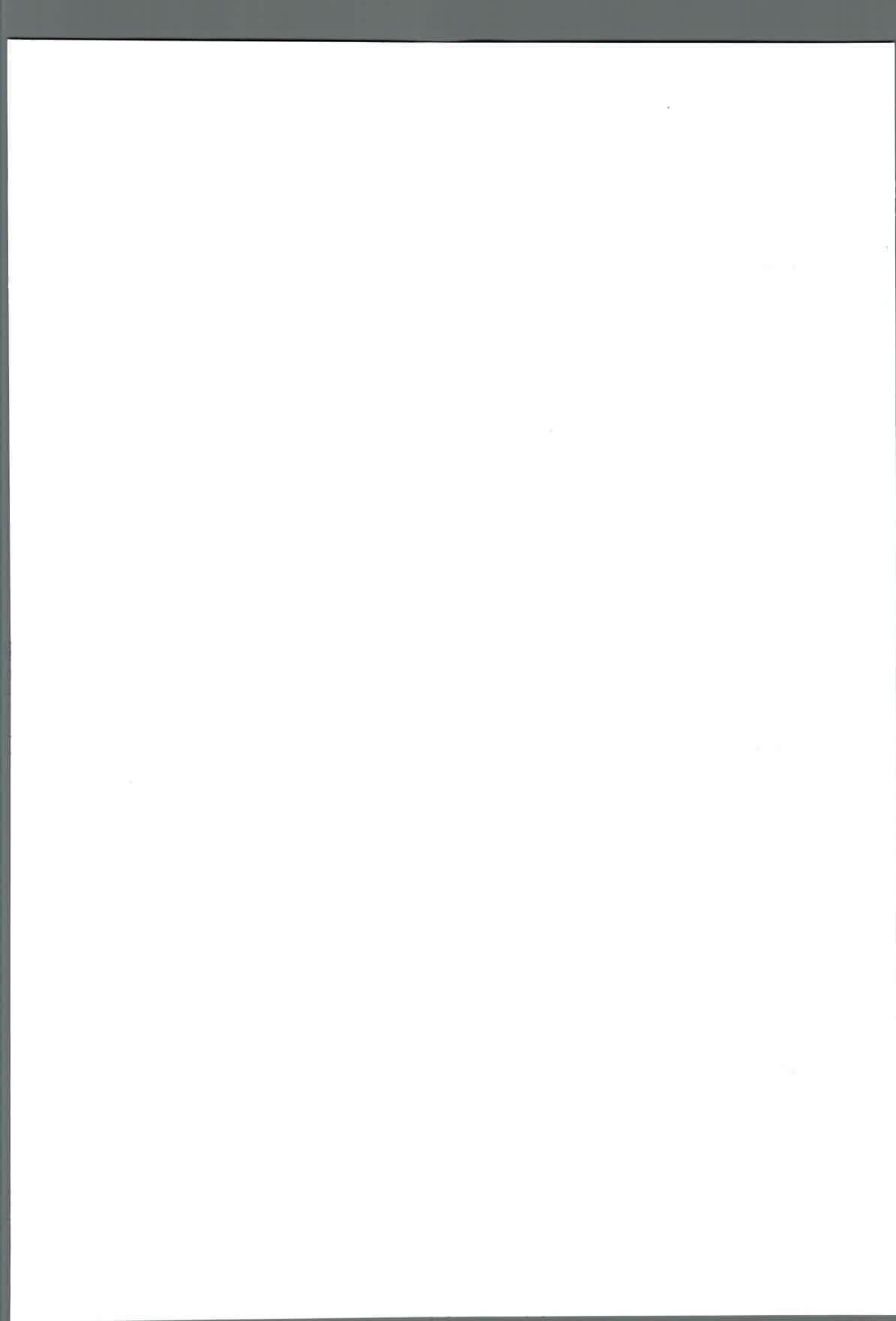
dónde:  $y$ = índice de área,  $a$ = intercepto,  $b$ = pendiente y  $x$ = concentración, en cuya fórmula transformada:

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

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”, radicó 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 marbofloxacina 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 efectuó utilizando la fórmula recomendada por la EMEA (2006 a; 2006 b), que contempla las 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  $\beta$

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

El límite de cuantificación (LC) se determinó 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 radicó en la elusión de los estándares de calibración por sextuplicado. Se consideró aceptable cuando el coeficiente de variación (CV) entre elusiones, 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 6 días diferentes. Se consideró aceptable cuando el CV de los índices de áreas de los cromatogramas fue  $\leq 3\%$ .

**RESULTADOS**

<b>Matriz</b>	<b>Rango concentración</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
Plasma	0.0195 - 2.5 µg/ml	0.1715	0.0007548	0.99
Leche	0.0048 - 10 µg/ml	.0.0636	0.1314	0.99

Tabla 1: Ensayo de linealidad de marbofloxacina en plasma y leche.

<b>Matriz</b>	<b>Concentraciones</b>	<b>% recuperabilidad</b>
Plasma	0.125; 0.5; 1 y 2 µg/ml	93.96 ± 6.22
Leche	0.125; 0.25; 1 y 2 µg/ml	88.84 ± 11.02

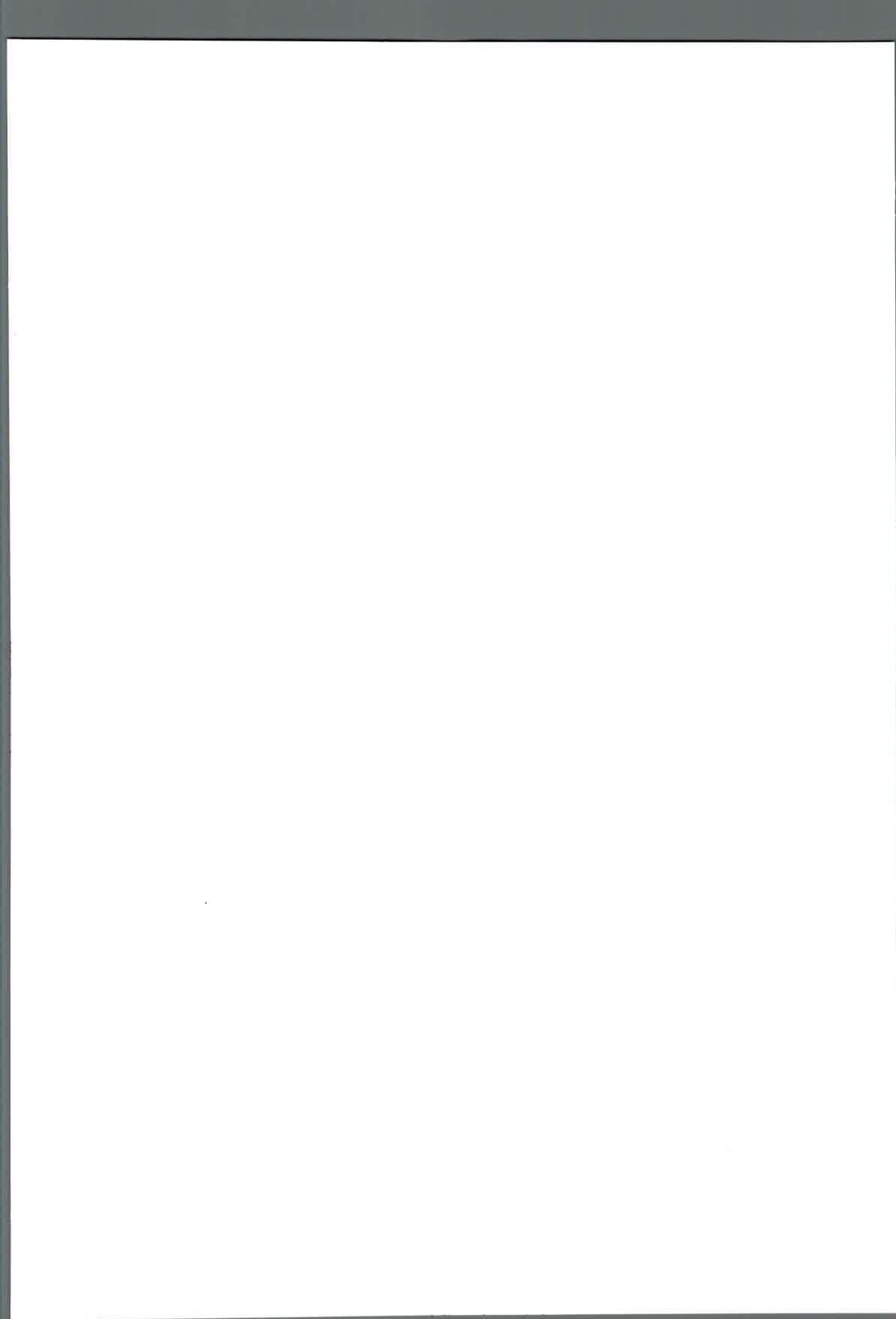
Tabla 2: Ensayo de recuperabilidad de marbofloxacina en plasma y leche.

<b>Matriz</b>	<b>Concentraciones</b>	<b>% CV repetibilidad</b>
Plasma	0.312; 0.65 y 2.5 µg/ml	0.83 ± 0.37
Leche	0.125; 0.25; 1 y 2 µg/ml	1.28 ± 0.36

Tabla 3: Ensayo de repetibilidad de marbofloxacina en plasma y leche.

<b>Matriz</b>	<b>Concentraciones</b>	<b>% CV reproducibilidad</b>
Plasma	0.312; 0.65 y 2.5 µg/ml	1.15 ± 0.27
Leche	0.125; 0.25; 1 y 2 µg/ml	1.85 ± 1.93

Tabla 4: Ensayo de repetibilidad y reproducibilidad de de marbofloxacina.



<b>Matriz</b>	<b>LD (µg/ml)</b>	<b>LQ (µg/ml)</b>
Plasma	0.0171	0.5186
Leche	0.00877	0.02632

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

<b>Tiempo</b>	<b>Subcutánea</b>	<b>Endovenosa</b>
0.16	0.373 ± 0.318	3.033 ± 0.415
0.33	0.697 ± 0.664	2.631 ± 0.531
0.5	0.862 ± 0.798	2.206 ± 0.454
0.75	0.961 ± 0.569	1.929 ± 0.415
1	0.826 ± 0.474	1.522 ± 0.451
2	0.728 ± 0.411	0.926 ± 0.249
3	0.538 ± 0.325	0.626 ± 0.217
4	0.409 ± 0.255	0.415 ± 0.102
6	0.242 ± 0.114	0.241 ± 0.106
8	0.159 ± 0.058	0.189 ± 0.031
12	0.101 ± 0.008	0.142 ± 0.031
24	0.092 ± 0.002	0.109 ± 0.017

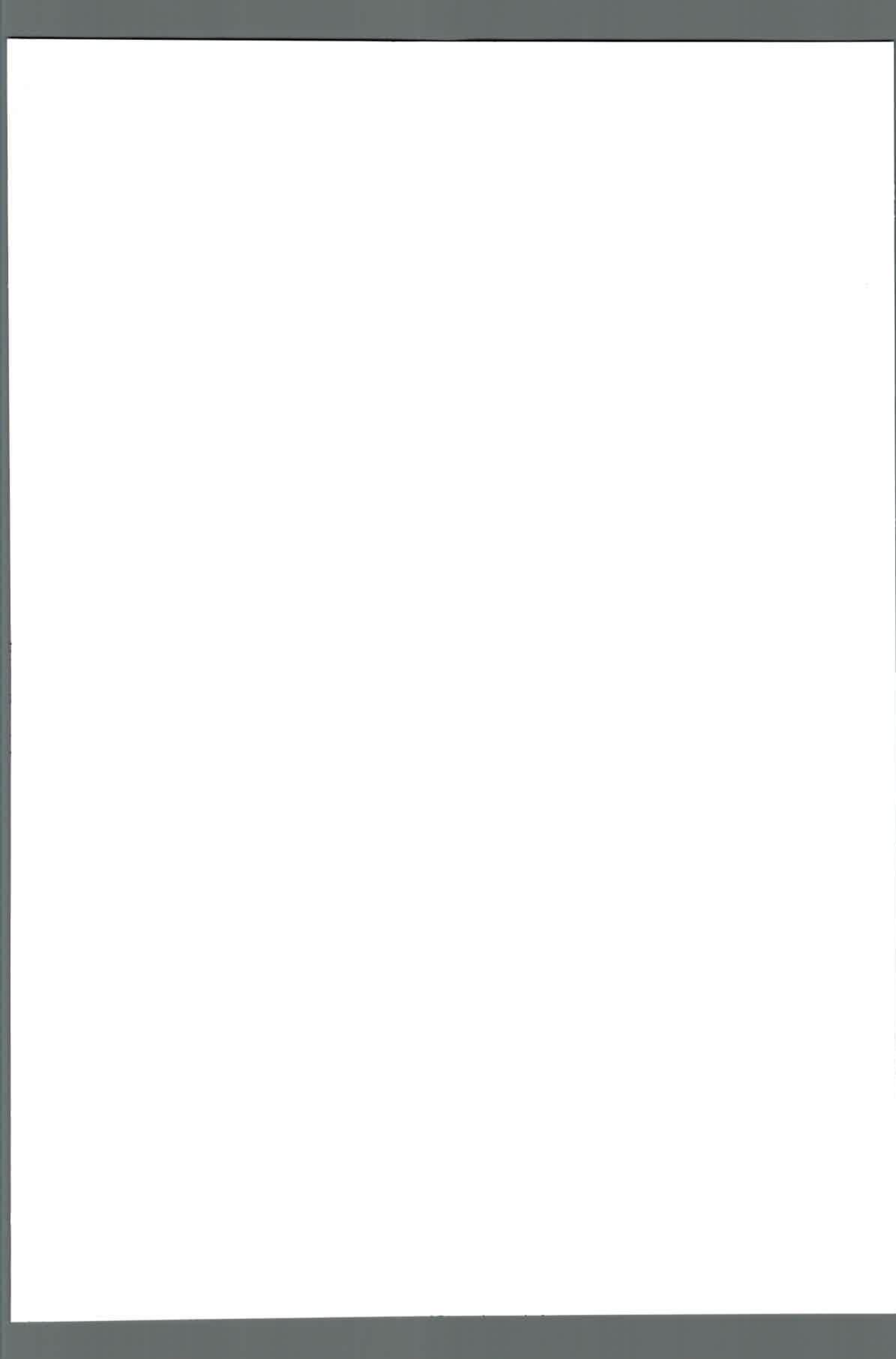
Tabla 6: Concentraciones plasmáticas (µg/ml) versus tiempo por aplicación subcutánea e intravenosa de 2 mg/kg de marbofloxacina

Parámetro cinético	Plasma EV	Plasma SC
$t_{1/2}$ abs (hs)	-	$0.17 \pm 0.06$
$t_{1/2}$ $\alpha$ (hs)	$0.71 \pm 0.23$	$1.01 \pm 0.84$
$t_{1/2}$ $\beta$ (hs)	$9.57 \pm 1.98$	$9.42 \pm 2.25$
$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	-	$0.73 \pm 0.51$
$T_{max}$ (hs)	-	$1.38 \pm 0.39$
ABCárea ( $\mu\text{g-h/ml}$ )	$8.48 \pm 1.83$	$6.58 \pm 2.19$
TMR (hs)	$10.68 \pm 3.44$	$14.06 \pm 5.22$
$V_d$ (l/kg)	$3.46 \pm 1.38$	$3.39 \pm 1.12$
Cl <sub>t</sub> (ml/min/kg)	$4.10 \pm 0.94$	$4.12 \pm 0.90$
F %	-	$77.16 \pm 16.33$

Tabla 7: Parámetros cinéticos plasmáticos de marbofloxacina en cabras.

**Referencias:**  $t_{1/2}$ abs: vida media de absorción,  $t_{1/2}\alpha$ : tiempo medio de distribución,  $t_{1/2}\beta$ : vida media de eliminación,  $C_{m\acute{a}x}$ : concentración máxima;  $T_{m\acute{a}x}$ : tiempo en que se alcanza la  $C_{m\acute{a}x}$ ; TMR: tiempo medio de residencia; ABCárea, área bajo la curva;  $V_d$ : volumen de distribución; Cl<sub>t</sub>: clearance total. F: biodisponibilidad.

Tiempo	Concentración
0.25	$0.114 \pm 0.033$
0.5	$0.175 \pm 0.075$
0.75	$0.250 \pm 0.117$
1	$0.357 \pm 0.209$
2	$0.413 \pm 0.172$
3	$0.502 \pm 0.265$
4	$0.566 \pm 0.358$
6	$0.607 \pm 0.375$



8	0.631 ± 0.473
12	0.424 ± 0.360
24	0.310 ± 0.218
48	0.154 ± 0.042
72	0.111 ± 0.013
96	0.102 ± 0.002

Tabla 8: Concentraciones lácteas versus tiempo por aplicación subcutánea de 2 mg/kg de marbofloxacina.

Parámetro cinético	Leche subcutánea
$t_{1/2} \beta$ (hs)	20.5 ± 15.6
$C_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.83 ± 0.62
$T_{m\acute{a}x}$ (hs)	6.66 ± 4.27
ABCárea ( $\mu\text{g-h/ml}$ )	20.01 ± 12.55
TMR (hs)	31.3 ± 22.5

Tabla 9: Parámetros farmacocinéticos lácteos obtenidos tras la aplicación de 2 mg/kg de marbofloxacina por vía subcutánea.

**Referencias:**  $t_{1/2}\beta$ : vida media de eliminación,  $C_{m\acute{a}x}$ : concentración máxima;  $T_{m\acute{a}x}$ : tiempo en que se alcanza la  $C_{m\acute{a}x}$ ; ABCárea, área bajo la curva; TMR: tiempo medio de residencia.

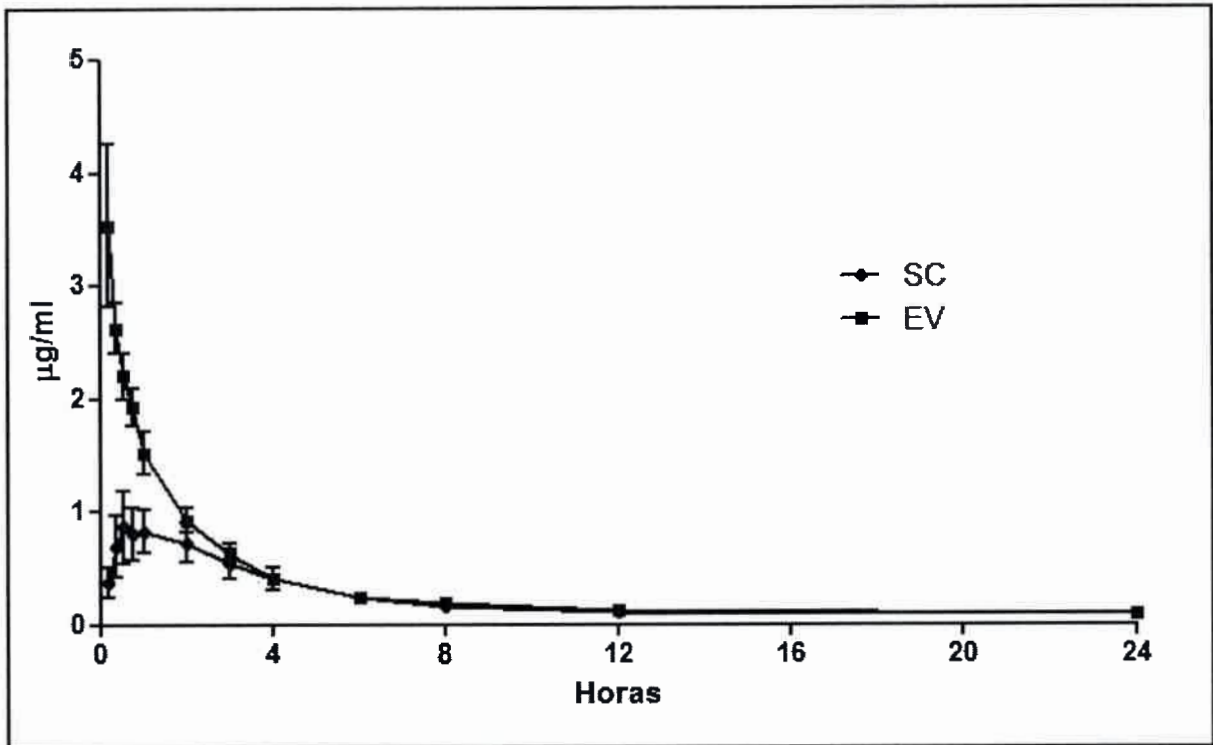


Figura 3: Concentraciones plasmáticas de marbofloxacin versus tiempo, por vía EV y SC

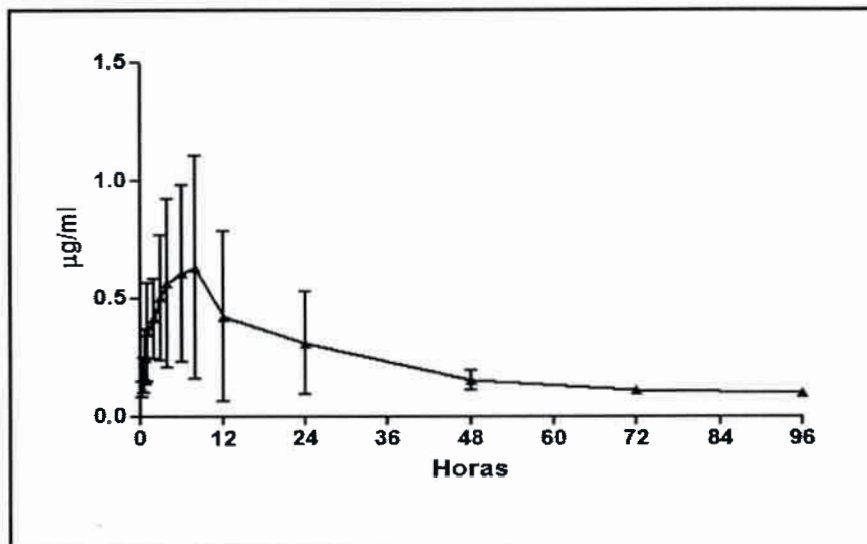
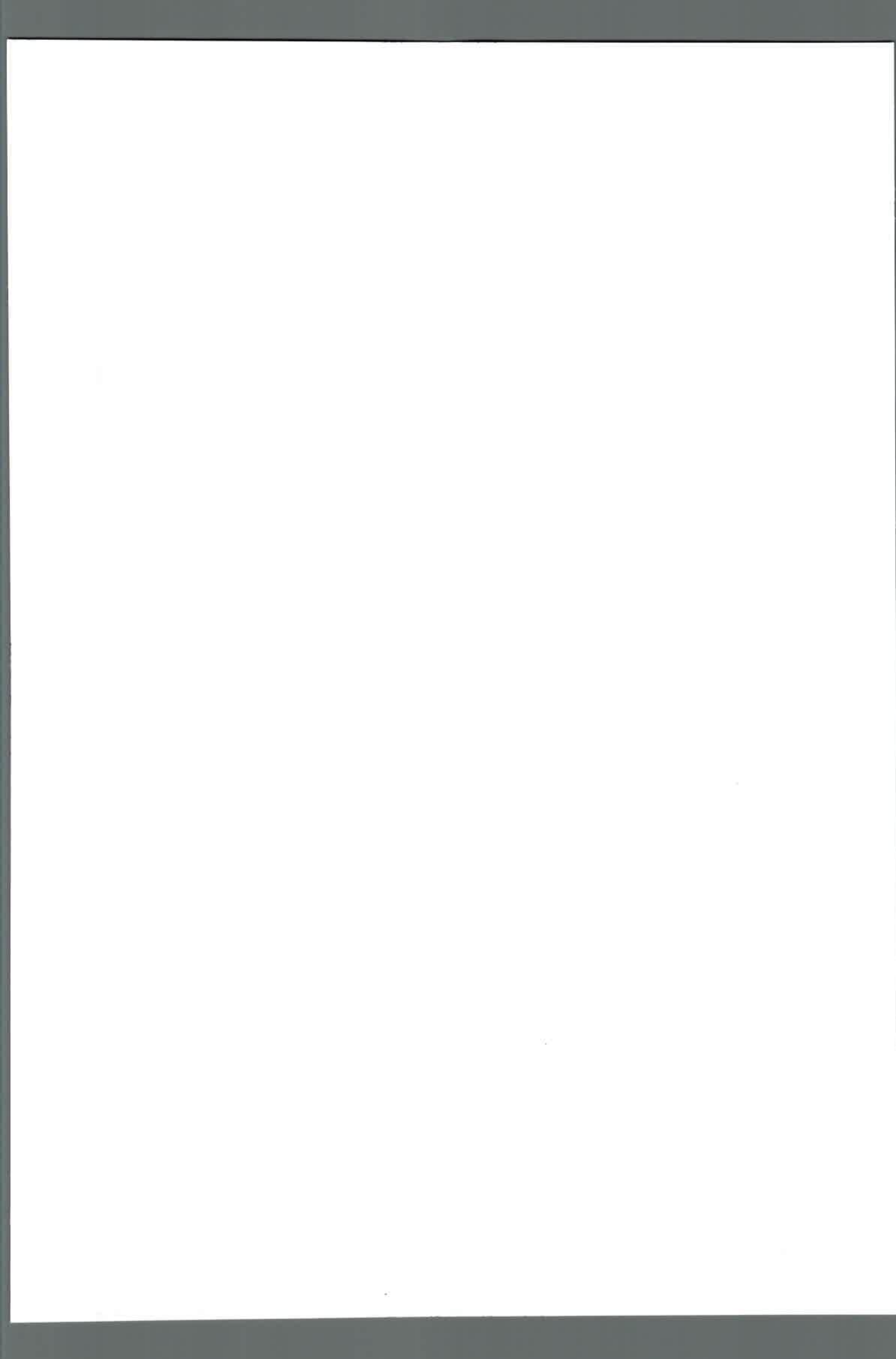


Figura 4: Concentraciones lácteas de marbofloxacin versus tiempo tras la aplicación subcutánea de 2 mg/kg.





## DISCUSION

En concordancia con el perfil de seguridad que ofrece el conjunto de fluoroquinolonas de uso veterinario (Brown, 1996; Gupta et al., 2012; Giguère & Dowling, 2013), no se observaron efectos adversos en ninguno de los animales experimentales luego de la administración intravenosa y subcutánea de marbofloxacin, similar a lo sucedido en otras experiencias desarrolladas con este antimicrobiano en animales domésticos (Carretero et al., 2002).

La administración subcutánea de marbofloxacin en hembras caprinas determina pronta absorción desde el sitio de aplicación; el valor de  $t_{1/2abs}$  hallado en este ensayo es similar al registrado en caninos (Schneider et al., 1996) e inferior al revelado en terneros por esta vía de aplicación (Ismail & El-Kattan, 2007).

Respecto a otros estudios realizados con marbofloxacin por aplicación intramuscular, el  $t_{1/2}$  de absorción hallado es próximo a los reportados en otras experiencias realizadas en porcinos (Ding et al., 2010), en vacas en lactación (Shem Tov et al., 1997; Schneider et al., 2004), en ovinos (Shem Tov et al., 1997; Shidu et al., 2010 b), en terneros (Errecalde et al., 2012), ligeramente inferior al informado en equinos (Carretero et al., 2002).

Con relación a otros estudios realizados con otras fluoroquinolonas, en esta especie el  $t_{1/2 abs}$  es menor a los establecidos con danofloxacin al 18 % (Errecalde et al., 2010 a), orbifloxacin (Marín et al., 2007 b), moxifloxacin (Fernández-Varón et al., 2006), enrofloxacin al 10 % (Errecalde et al., 2012), y significativamente menor al hallado con norfloxacin (El-Sayed et al., 2011).

El  $C_{máx}$  plasmático provisto por la administración subcutánea de 2 mg/kg de marbofloxacin en cabras es de  $0.73 \pm 0.51 \mu\text{g/ml}$ . Este valor es inferior al informado con este antimicrobiano por aplicación subcutánea en caninos (Schneider et al., 1996) y con los hallados en caprinos por vía intramuscular de idéntica dosis en ovinos (Shem Tov et al., 1997; Shidu et al., 2010 b), caprinos (Dova et al., 2007; Shidu et al., 2010 a), terneros (Ismail & El-Kattan, 2007; Errecalde et al., 2012) y en vacas en lactación (Shem Tov et al., 1997; Schneider et al., 2004).

El  $C_{máx}$  conseguido en el plasma con marbofloxacin es inferior a los proporcionados en cabras luego de la administración subcutánea de las siguientes fluoroquinolonas: danofloxacin (Escudero et al., 2007; Errecalde et al., 2010 a), moxifloxacin (Fernández-Varón et al., 2006), difloxacin (Marín et al., 2007 b),

orbifloxacina (Marín et al., 2007 c) y enrofloxacina, aunque excede el  $C_{m\acute{a}x}$  provisto por su metabolito, ciprofloxacina (Errecalde et al., 2012).

El  $T_{m\acute{a}x}$  plasmático provisto por marbofloxacina en cabras fue de  $1.38 \pm 0.39$  horas. Este valor excede los conseguidos con este fármaco por vía subcutánea en caninos (Schneider et al., 1996) y por vía intramuscular en porcinos (Ding et al., 2010), ovinos (Shidu et al., 2010 b) y vacas lecheras (Schneider et al., 2004).

En cambio, en esta experiencia el  $T_{m\acute{a}x}$  plasmático es obtenido más pronto respecto otros estudios realizados en caprinos con otras fluoroquinolonas: danofloxacina (Errecalde et al., 2010 a), difloxacina (Marín et al., 2007 b), norfloxacina (El-Sayed et al., 2011), orbifloxacina (Marín et al., 2007 c), moxifloxacina (Fernández-Varón et al., 2006), enrofloxacina y su metabolito, ciprofloxacina (Errecalde et al., 2012).

La biodisponibilidad plasmática (F) obtenida tras la administración subcutánea de marbofloxacina en caprinos fue del  $77.16 \pm 16.33$  %, menor al reportado en otras experiencias con este fármaco realizadas por vía subcutánea en terneros (Ismail & El-Kattan, 2007; Errecalde et al., 2012) y en caninos (Schneider et al., 1996) y por vía intramuscular en porcinos (Ding et al., 2010), equinos (Carretero et al., 2002), ovinos (Shem Tov et al., 1997; Shidu et al., 2010 b), vacas en lactación (Shem Tov et al., 1997) y caprinos (Waxman et al., 2001).

La biodisponibilidad obtenida en esta experiencia en cabras excede a la comunicada en esta especie luego de la aplicación intramuscular de norfloxacina (El-Sayed et al., 2011) pero es inferior a la reportada con danofloxacina (Escudero et al., 2007) y difloxacina (Marín et al., 2007 b), utilizando la misma vía de administración.

En hembras caprinas, marbofloxacina difunde pronto desde el compartimento central, según expresan los  $t_{1/2\alpha}$  conseguidos de  $0.71 \pm 0.23$  y de  $1.01 \pm 0.84$  horas, luego de las aplicaciones intravenosa y subcutánea, respectivamente.

La distribución luego de la aplicación endovenosa es más paulatina respecto a difloxacina (Errecalde et al., 2010 b), gatifloxacina (Singh et al., 2010) e ibafloxacina (Marín et al., 2007 a). El  $t_{1/2\alpha}$  de marbofloxacina en cabras por vía subcutánea es mayor al encontrado con este antimicrobiano en bovinos (Shem Tov et al., 1997) y menor a los hallados en caninos (Schneider et al., 1996) y similar al comunicado con orbifloxacina, por la misma vía de aplicación (Marín et al., 2007 c).

El  $t_{1/2\alpha}$  provisto por marbofloxacin en cabras por vía subcutánea excede al encontrado en cabras con levofloxacin por administración intramuscular (Goudah & Abo-El-Sooud, 2008).

En la presente experiencia marbofloxacin experimenta amplia permanencia en el organismo, según expresan los valores obtenidos de  $t_{1/2\beta}$  y TMR de  $9.57 \pm 1.98$  horas y  $10.68 \pm 3.44$  horas, respectivamente.

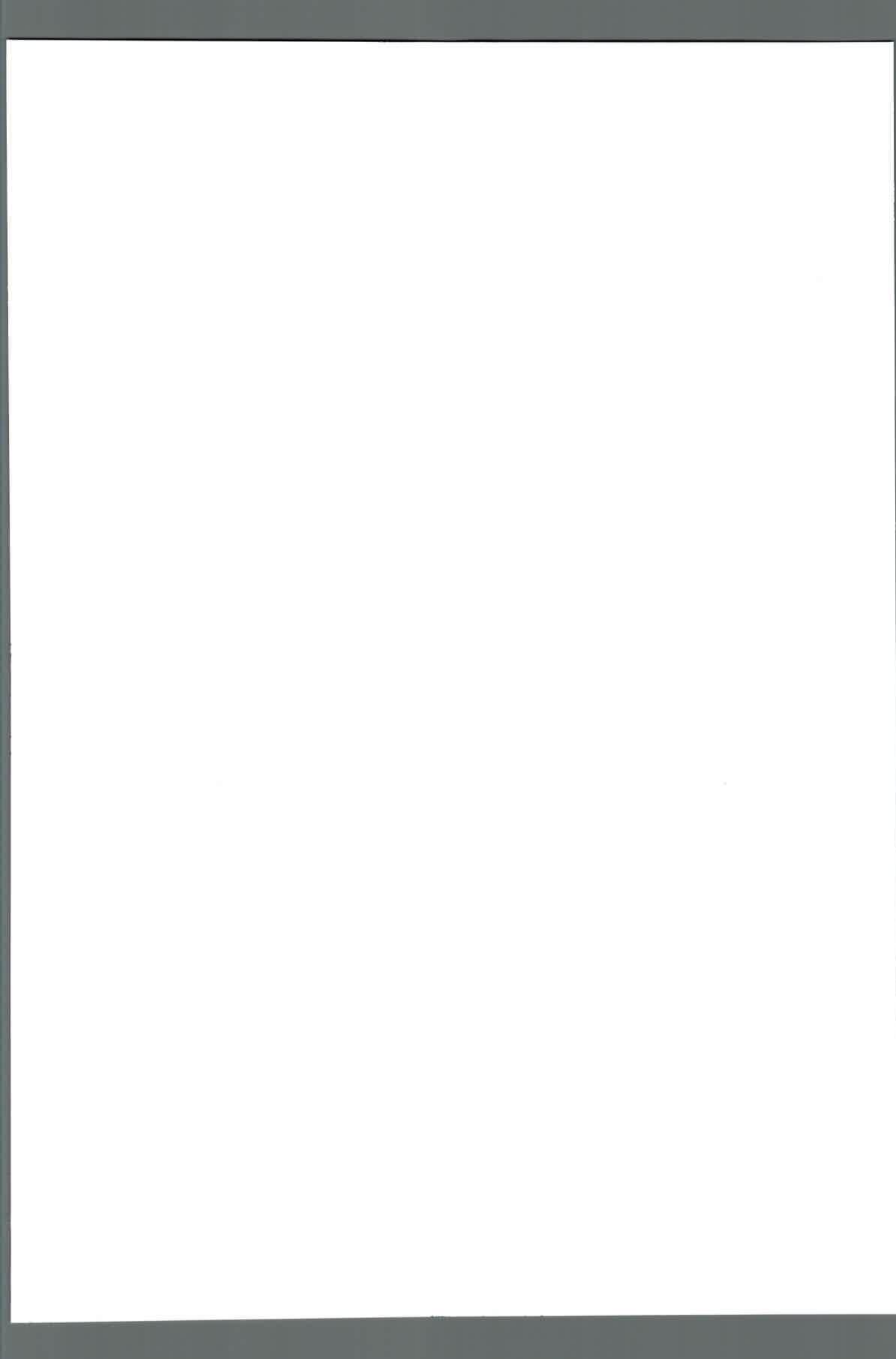
El  $t_{1/2\beta}$  conseguido supera los adjudicados con este antimicrobiano en ovinos (Shem Tov et al., 1997; Shidu et al., 2010b), vacas lecheras (Shem Tov et al., 1997; Schneider et al., 2004), terneros (Ismail & El-Kattan, 2007), equinos (Carretero et al., 2002), y con otras fluoroquinolonas utilizadas en caprinos: orbifloxacin (Marín et al., 2007 c), ibafloxacin (Marín et al., 2007 a), danofloxacin (Errecalde et al., 2010 a), enrofloxacin (Errecalde et al., 2012), moxifloxacin (Fernández-Varón et al., 2006), gatifloxacin (Singh et al., 2010) y con norfloxacin (El-Sayed et al., 2011), mientras que resultó inferior a los encontrados en caprinos con difloxacin (Errecalde et al., 2010 b) y con levofloxacin (Errecalde et al., 2008) y tras la aplicación de marbofloxacin en cerdos (Ding et al., 2010) y en caninos (Schneider et al., 1996).

El TMR obtenido con marbofloxacin en cabras fue de  $10.68 \pm 3.44$  horas y de  $14.06 \pm 5.22$  horas para las vías endovenosa y subcutánea, respectivamente. El TMR generado en esta experiencia da cuenta de la extensa persistencia del antimicrobiano en la secreción láctea de los caprinos y excede el registrado en esta especie con enrofloxacin pero es ligeramente inferior al provisto por su metabolito ciprofloxacin (Errecalde et al., 2012).

El Cl total obtenido en esta experiencia fue de  $4.10 \pm 0.94$  y  $4.12 \pm 0.90$  ml/min.kg para las aplicaciones intravenosa y subcutánea, respectivamente. Estos valores exceden largamente los informados en cabras lactantes con norfloxacin (El-Sayed et al., 2011) y moxifloxacin (Fernández-Varón et al., 2006), son similares a los comunicados con ciprofloxacin e inferiores al reportado con enrofloxacin (Errecalde et al., 2013) e ibafloxacin (Marín et al., 2007 a).

Respecto a otros ensayos realizados con marbofloxacin en animales domésticos, los valores de Cl hallados son mayores que los encontrados en caninos (Schneider et al., 1996), terneros (Ismail & El-Kattan, 2007) y porcinos (Ding et al., 2010) y próximos a los comunicados en equinos (Bousquet-Melou et al., 2002).

En hembras caprinas, marbofloxacin experimenta extensa difusión tisular según expresa el Vd conseguido luego de la aplicación intravenosa, de  $3.46 \pm 1.38$  L/kg. Este



valor supera los reportados con marbofloxacina en mamíferos domésticos en terneros (Ismail & El-Kattan, 2007), en equinos (Carretero et al., 2002), en caninos (Schneider et al., 1996), en bovinos lecheros (Shem Tov et al., 1997; Schneider et al., 2004), en porcinos (Ding et al., 2010), en ovinos (Shem Tov et al., 1997; Shidu et al., 2010 b) e incluso en otras experiencias realizadas con marbofloxacina en caprinos (Waxman et al., 2001; Shidu et al., 2010 a).

El Vd de marbofloxacina excede a los informados en caprinos con difloxacina (Marín et al., 2007 b), norfloxacin (El-Sayed et al., 2011), levofloxacin (Errecalde et al., 2008), moxifloxacin (Fernández-Varón et al., 2006), ibafloxacin (Marín et al., 2007 a) y enrofloxacin, pero es superado por el valor provisto por el metabolito, ciprofloxacin (Errecalde et al., 2012), danofloxacin (Errecalde et al., 2010 a) y gatifloxacin (Singh et al., 2010).

La disposición en la glándula mamaria, luego de la aplicación subcutánea de marbofloxacin es pronta y extendida, similar a lo que sucede con la aplicación de difloxacin (Marín et al., 2007 b).

El cociente logrado de  $ABC_{\text{leche}}/ABC_{\text{plasma}}$  en este estudio es de  $3.3 \pm 2.3$ , relación significativamente inferior a la informada con danofloxacin en cabras (Escudero et al., 2007; Errecalde et al., 2010 a) y más importante que las informada en vacas lecheras con marbofloxacin (Schneider et al., 2004) y las alcanzadas en cabras con otras fluoroquinolonas por distintas vías de administración: con difloxacin (Marín et al., 2007 b; Errecalde et al., 2010 b), con gatifloxacin (Singh et al., 2010); con orbifloxacin (Marín et al., 2007 c), con levofloxacin (Errecalde et al., 2008; Goudah & Abo-El-Sooud, 2008), con ibafloxacin (Marín et al., 2007 a), moxifloxacin (Fernández-Varón et al., 2006) y con enrofloxacin (Errecalde et al., 2012).

El  $C_{\text{máx}}$  lácteo provisto por la aplicación subcutánea de 2 mg/kg de marbofloxacin es de  $0.83 \pm 0.62$  µg/ml. El valor alcanzado en este ensayo excede al comunicado en caprinos por la aplicación intravenosa de 15 mg/kg de ibafloxacin (Marín et al., 2007 a) y es inferior a los suministrado luego de la administración por vía subcutánea de 5 mg/kg de difloxacin (Marín et al., 2007 b), de 2.5 mg/kg de orbifloxacin (Marín et al., 2007 c), de 5 mg/kg de moxifloxacin (Fernández-Varón et al., 2006), de 7.5 mg/kg de enrofloxacin (Errecalde et al., 2012) y por 6 mg/kg de danofloxacin (Errecalde et al., 2010), y en vacas lecheras tras la aplicación de 2 mg/kg de marbofloxacin (Schneider et al., 2004).

El  $C_{m\acute{a}x}$  lácteo provisto con marbofloxacina en cabras también es superado tras la aplicación endovenosa de 5 mg de difloxacina (Errecalde et al., 2010 b), de 10 mg/kg de gatifloxacina (Singh et al., 2010) y de 5 mg/kg de levofloxacina (Errecalde et al., 2008; Goudah & Abo-El-Sooud, 2008).

El  $T_{m\acute{a}x}$  lácteo en cabras es alcanzado con marbofloxacina a las  $6.6 \pm 4.27$  horas, posterior al reportado con este antimicrobiano en vacas lecheras (Schneider et al., 2004) y a los informados con difloxacina (Marín et al., 2007 b; Errecalde et al., 2010 b), con gatifloxacina (Singh et al., 2010), con orbifloxacina (Marín et al., 2007 c); con levofloxacina (Errecalde et al., 2008; Goudah & Abo-El-Sooud, 2008), con moxifloxacina (Fernández-Varón et al., 2006), y con enrofloxacina (Errecalde et al., 2012).

Marbofloxacina experimenta extensa permanencia en la secreción láctea, según revelan el  $t_{1/2\beta}$  de  $20.5 \pm 15.6$  horas y el TMR de  $31.3 \pm 22.5$  horas, más importantes que los valores de  $t_{1/2\beta}$  establecidos con gatifloxacina (Singh et al., 2010), con moxifloxacina (Fernández-Varón et al., 2006) y con enrofloxacina, pero similar al exhibido por el metabolito ciprofloxacina (Errecalde et al., 2012).

La significativa disposición de marbofloxacina en la leche tendría relación con su naturaleza liposoluble, con ciertas modificaciones estructurales en su molécula que le confieren mayor difusión, como la incorporación del anillo oxadiazínico (Rubio Langre, 2011), sus propiedades anfóteras (Sörgel & Kinzig) y la reducida unión a proteínas plasmáticas (Petarca et al., 1993; Bregante et al., 2000), aspectos que promueven la disposición de fármacos en la leche (Baggot & Giguère, 2013).

Como el pH normal de la leche ( $\approx 6.6$ ) es inferior que el pH del plasma ( $\approx 7.4$ ), las bases débiles, que se encuentran mayormente no ionizadas en la sangre, difundirán con mayor facilidad hacia la leche que las moléculas ácidas, y una vez, en ese medio, el equilibrio deriva hacia la fracción ionizada (Ito & Lee, 2003; Martínez & Modric, 2010; Baggot & Giguère, 2013).

Estas características son similares en el conjunto de fluoroquinolonas de uso veterinario (Brown, 1996; Martínez et al., 2006; Gupta et al., 2012), sin embargo, las diferencias de cada integrante del grupo son importantes en cuanto a la magnitud de la disposición en leche caprina y se explicarían por la expresión de transportadores (Sarkadi et al., 2006; Schrickx & Fink-Gremmels, 2008; Robey et al., 2009), comprobados en ratas con ciprofloxacina (Merino et al., 2006), en ovejas con

enrofloxacin (Pulido et al., 2006) y norfloxacin (Soback et al., 1994) y marbofloxacin en cerdas (Petracca & Wanner, 1993).

Debido que no existe un LMR para marbofloxacin en leche caprina, se consideró un LMR de 75 µg/ml, establecido para este antimicrobiano en leche de bovinos en la Unión Europea (González & Nieto, 2007).

Aplicando las concentraciones residuales del antimicrobiano obtenidas en leche en cada uno de los animales tratados por vía subcutánea al programa WT 1.4 de la EMEA (Hekman & Hoogland, 2000), se estimó un periodo de resguardo de 61.8 horas, superior al calculado en caprinos con enrofloxacin (Errecalde et al., con danofloxacin (Errecalde et al., 2010 a) con difloxacin (Errecalde et al., 2010 b) y con levofloxacin (Errecalde et al., 2008).

El periodo de retirada calculado para marbofloxacin en leche caprina es ventajoso, compatible con las condiciones de explotación y similar al recomendado por la industria farmacéutica veterinaria cuando este antimicrobiano se utiliza en vacas lecheras en producción (Marbocyl 10 %<sup>®</sup>, solución inyectable, Laboratorio Vetoquinol, España).

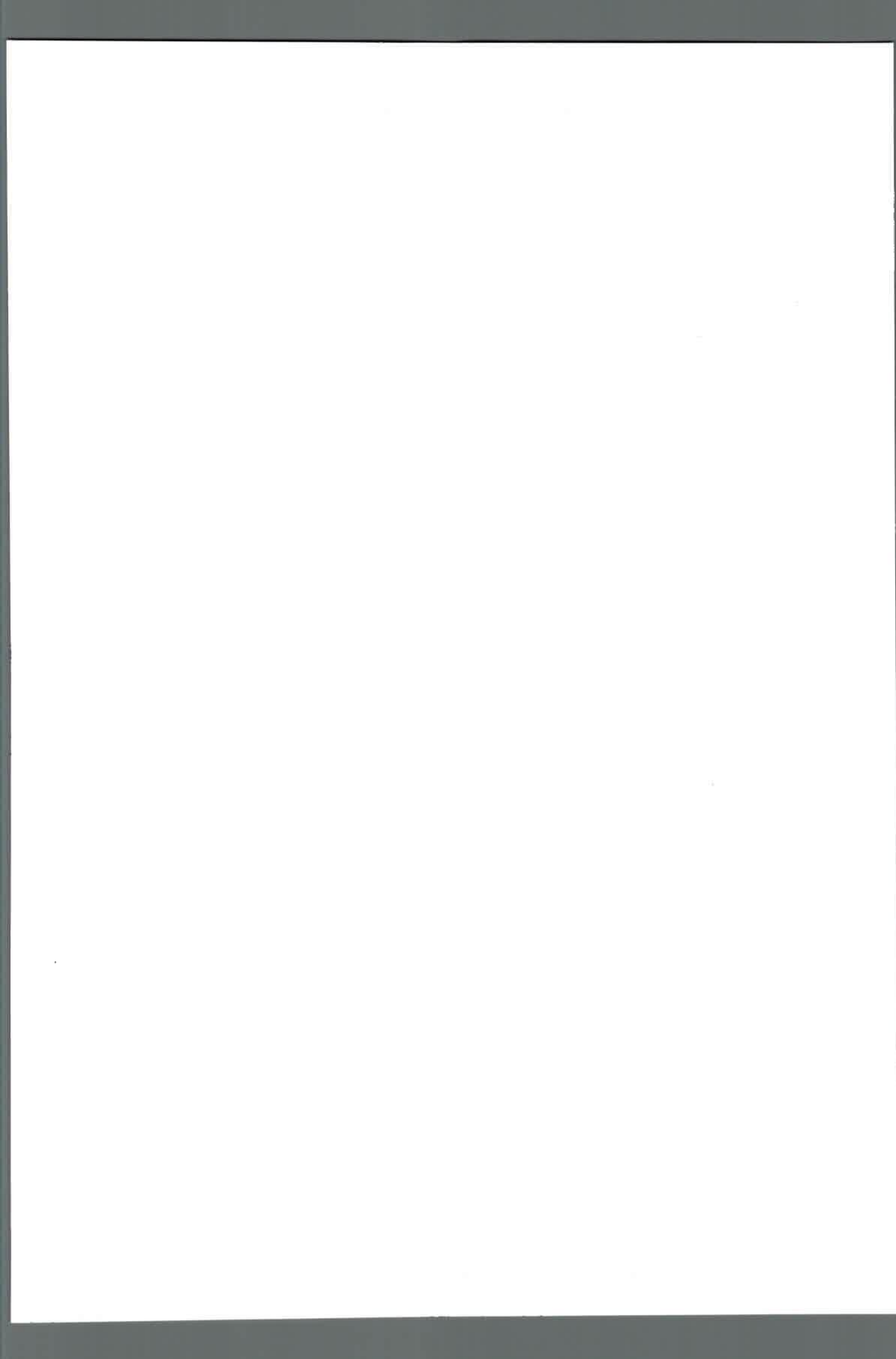
La complejidad de las muestras de leche (Aerts et al., 2005; Reig & Toldrá, 2009; Schneider, 2009), demandó el tratamiento previo con ácido tricloroacético al 50 %, 2:1 v/v, indispensable para remover macromoléculas que interfieren en cromatograma (Posyniack et al., 2001), que afectaron la separación de marbofloxacin (Marzo & Dal Bo, 1998; Maraschiello et al., 2001).

Los resultados obtenidos respaldan la competencia del procedimiento destinado a extraer el analito del plasma, utilizando metanol como solvente polar seguido de extracción líquida y centrifugación (Aerts et al., 1995; Marzo & Dal Bo, 1998; Böttcher et al., 2001; Bailac et al., 2004).

El método de HPLC implementado propuesto por Böttcher et al., (2001), permitió cuantificar el antimicrobiano en plasma durante 24 horas y en leche, luego de la aplicación subcutánea, al menos hasta las 72 horas posteriores, superando los niveles provistos con marbofloxacin por el método microbiológico en bovinos (Shem Tov et al., 1997) y similar a difloxacin por HPLC en caprinos (Marín et al., 2007 b).

Utilizando columna C18 (Carlucchi, 1998; Bailac et al., 2004; Verdón et al., 2005), detector de fluorescencia (Aerts et al., 1995; Carlucchi, 1998; Hernández-Arteseros et al., 2002) ajustado a 490 nm de emisión y 295 nm de excitación (Böttcher et al., 2001) y fase móvil ajustada a pH ácido (Carlucchi, 1998; Ramos, 2003),





integrada por agua deionizada: acetonitrilo: trietilamina 79:20:1 v/v/v, componentes que evitan interferencias en el cromatograma (Carlucchi, 1998; Marzo & Dal Bo, 1998; Bailac et al., 2004; Verdón et al., 2005; Maraschiello et al., 2001), el método implementado es adecuado para estudios cinéticos plasmáticos en caprinos por cuanto permite cuantificar el fármaco y en leche, es útil para cuantificar el ingreso y establecer su depleción.

En el ensayo de linealidad, los coeficientes de correlación ( $r^2 > 0.99$ ) acreditan la confiabilidad de las curvas de calibración utilizadas en los cálculos de concentración del analito en las muestras problema (Barnes, 1992; Chang, 2000).

El método de detección implementado es preciso, según indican los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad realizados en plasma y leche. Los CV en ambas matrices estudiadas fueron  $\leq 1.5\%$  y  $\leq 3.0\%$ , respectivamente, estimados razonables (Barnes, 1992; Aerts et al., 1995; Chang, 2000).

La recuperabilidad conseguida en las matrices estudiadas es elevada, aunque es inferior a la reportada con marbofloxacin en leche bovina (Suhren & Hammer, 1998).

El método aplicado es sensible por cuanto el LD estimado en leche caprina, si bien excede el informado en leche bovina por Suhren & Hammer (1998), es inferior al LMR establecido para marbofloxacin por la UE (González & Nieto, 2007), en consecuencia es válido para estudios de residuos.

Asimismo, el método es sencillo, requiere pocas etapas en su desarrollo, con escasa demanda de solventes, y es 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 y para establecer niveles residuales, dada la sencillez en el procesamiento de las muestras, y versatilidad, pues se adapta a las matrices estudiadas, constituye una opción en los planes de monitoreo de residuos (Böttcher et al., 2001).



## CONCLUSIONES

La disposición de marbofloxacina en hembras caprinas es compatible con sus propiedades físico-químicas.

El perfil cinético plasmático exhibido por marbobloxacina en hembras caprinas acuerda con los antecedentes farmacocinéticos disponibles de este antimicrobiano y por el conjunto de fluoroquinolonas en animales domésticos.

El método de detección por HPLC implementado para cuantificar marbofloxacina en leche es útil para estudios cinéticos y para estudios de residuos por cuanto es sensible, sencillo y preciso.

El software PK solution es adecuado para establecer parámetros cinéticos plasmáticos y lácteos de marbofloxacina en hembras caprinas.

La disposición de marbofloxacina en leche caprina es más importante que otras fluoroquinolonas de uso veterinario.

El programa WTM 1.4 es apropiado para analizar la depleción de marbofloxacina en leche de cabras.

La aplicación subcutánea de marbofloxacina demanda un periodo de retiro de 61.8 horas.

El periodo de retiro establecido es compatible con el sugerido por la industria veterinaria



**BIBLIOGRAFÍA**

- 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.
- ALBARELLOS G, MONTOYA L & LANDONI M (2005). Pharmacokinetics of marbofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats. *Vet J* 170 (2): 222-229.
- ANDERSSON M & MAC GOWAN A (2003). Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother* 51 (supl 1): 1-11.
- 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.
- APPELBAUM P & HUNTER P (2000). The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents* 16: 5-13.
- 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.
- BAGGOT J & GIGUERE S (2013). Principles of antimicrobial drug bioavailability and disposition. En *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, por Giguère S, Prescott J & Dowling P (ed), 5ta ed., Wiley & Sons, Ames, Iowa, USA: 41-77.
- 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.
- BALIKCI E, KIZIL O, KARAPINAR T, KARAHAN M, OZDEMIR H & DABAK M (2008). Efficacy of marbofloxacin for naturally occurring contagious caprine pleuropneumonia. *Small Rum Res* 77: 75-79.
- BARGER A, FUHST C & WIEDEMANN B (2003). Pharmacological indices in antibiotic therapy. *J Antimicrob Chemother* 52: 893-898.
- BARNES C (1992). Importance of laboratory validations and accurate descriptions of analytical procedures for drug residues in foods. En *Analysis of antibiotic drug*

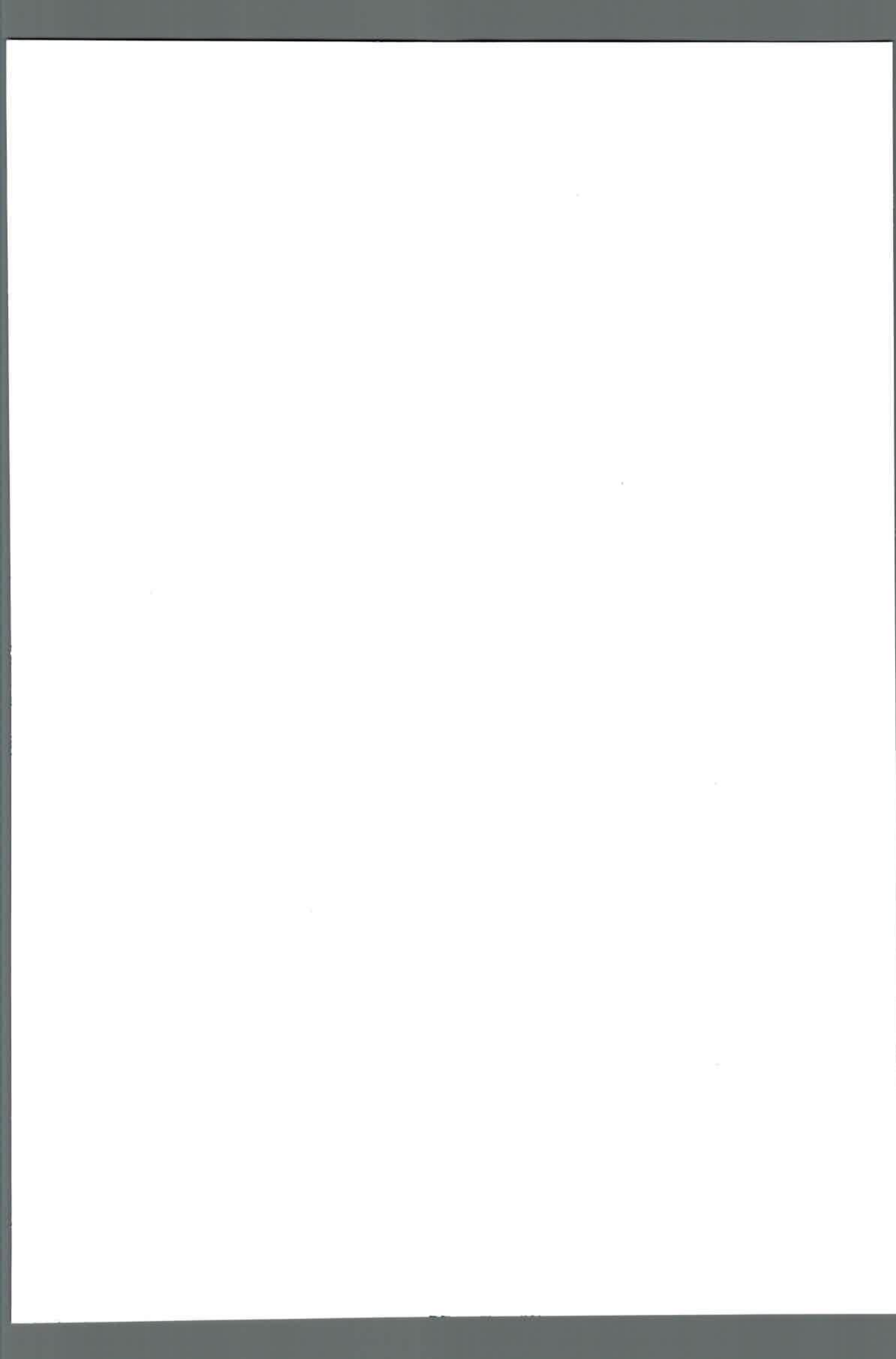
- residues in food products of animal origin, por Agarwal V (ed), Plenum Press, New York: 1-4.
- BELTRÁN C (2004). Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: utilidad práctica. *Rev Chil Infect* 21 (supl 1): 39-44.
  - BHAVSAR S & THAKER A (2012). Pharmacokinetics of antimicrobials in food producing animals. En *Readings in Advanced Pharmacokinetics- Theory, Methods and Applications*. Noreddin A (ed). InTech, Rijeka, Croatia: 157-178.
  - BOERLIN P & WHITE D (2013). Antimicrobial resistance and its epidemiology. En *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, por Giguère S, Prescott J & Dowling P (ed), 5ta ed., Wiley & Sons, Ames, Iowa, USA: 21-40.
  - BOTTCHE 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.
  - BOUSQUET-MELOU A, BERNARD S, SCHNEIDER M & TOUTAIN P (2002). Pharmacokinetics of marbofloxacin in horses. *Equine Vet J* 34 (4): 366-372.
  - BREGANTE M, DE JONG A, ARAMAYONA J, GARCÍA M, SOLANS C & RUEDA S (2000). Protein binding of fluoroquinolones applied to livestock and companion animals. *J vet Pharmacol Therap* 23 (supl 1) B16.
  - BROWN S (2005). Farmacocinética: distribución y destino de los fármacos en el organismo. En *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Adams R (ed), 2ed. Acribia S.A., Zaragoza, España: 13-56.
  - BROWN S (1996). Fluoroquinolones in animal health. *J vet Pharmacol Therap* 19: 1-14.
  - CARLUCCI G (1998). Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 812: 343-367.
  - CARRETERO M, RODRÍGUEZ C, SAN ANDRÉS M, FORES P, DE LUCAS J, NIETO J, WAXMAN S, SAN ANDRÉS M & GONZÁLEZ F (2002). Pharmacokinetics of marbofloxacin in mature horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine Vet J* 34 (4): 360-365.
  - CHANG B (2000). Regulatory analytical methods for veterinary drug residues. 2000 APEC China Seminar. *Public Health Issues in Animal Production/Animal Products*. October 15-19, Beijing: 106-111.
  - CINQUINA A, ROBERTI P, GIANNETTI L, LONGO F, DRAISCI R, FAGIOLO A & BRIZIOLI N (2003). Determination of enrofloxacin and its metabolite

- ciprofloxacin in goat milk by HPLC with diode-array detection. Optimization and validation. *J Chromatogr A*, 987: 221-226.
- CLARK C (2013). Antimicrobial drug use in sheep and goats. En *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, por Giguère S, Prescott J & Dowling P (ed), 5ta.ed, Wiley & Sons, Ames, Iowa, USA: 529-540.
  - COFECYT (Consejo Federal de Ciencia y Tecnología) (2008). Lácteo caprino, La Pampa y Córdoba. Debilidades y desafíos tecnológicos del sector productivo. . [http://www.cofecyt.mincyt.gov.ar/pcias\\_pdfs/cordoba/UIA\\_lacteo\\_caprino\\_08.pdf](http://www.cofecyt.mincyt.gov.ar/pcias_pdfs/cordoba/UIA_lacteo_caprino_08.pdf)
  - ČONKOVA E, ČELLAROVA E, VACZI P & SABOVA L (2009). Quinolones from the point of view of pharmacology and veterinary indications. A review. *Folia Vet* 53 (4): 175-185.
  - CONTRERAS A, PAAPE M, DI CARLO A, MILLER M & RAINARD P (1997). Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual goats. *J Dairy Sci* 80: 1113-1118.
  - COTARD J, GRUET P, PECHEREAU D, MOREAU P, PAGES J, THOMAS E & DELEFORGE J (1995). Comparative study of marbofloxacin and amoxicillin clavulanic acid in the treatment of urinary tract infections in dogs. *J Small Anim Pract* 36 (8): 349-353.
  - DAWSON L (2005). A guide to drug usage in goats. Proc. 20th Ann. Goat Field Day, Langston University, Langston, OK: 94-101.
  - DE GEA G, PETRYNA A, MELLANO A, BONVILLANI A & TURIELLO P (2005). El ganado caprino en la argentina. Ed. UNRC, 1ed: 198p.
  - DEMOLY P & ROMANO A (2005). Update on betalactam allergy diagnosis. *Curr Allergy Asthma Rep* 1: 9-14.
  - DÍAZ P & ANADÓN A (2000). Residuos de sustancias con actividad biológica en alimentos de origen animal y responsabilidad legal (1ª parte). *Eurocarne*. 83: 83-94.
  - DÍEZ P & CALDERÓN V (1997). Empleo de antibióticos en veterinaria. *Rev Esp Quimioter* 10 (4).
  - DING H, LI Y, CHEN Z, RIZWAN-UL-HAQ M & ZENG Z (2010). Plasma and tissue cage fluid pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous, intramuscular, and oral single-dose application in pigs. *J vet Pharmacol Therap* 33: 507-510.

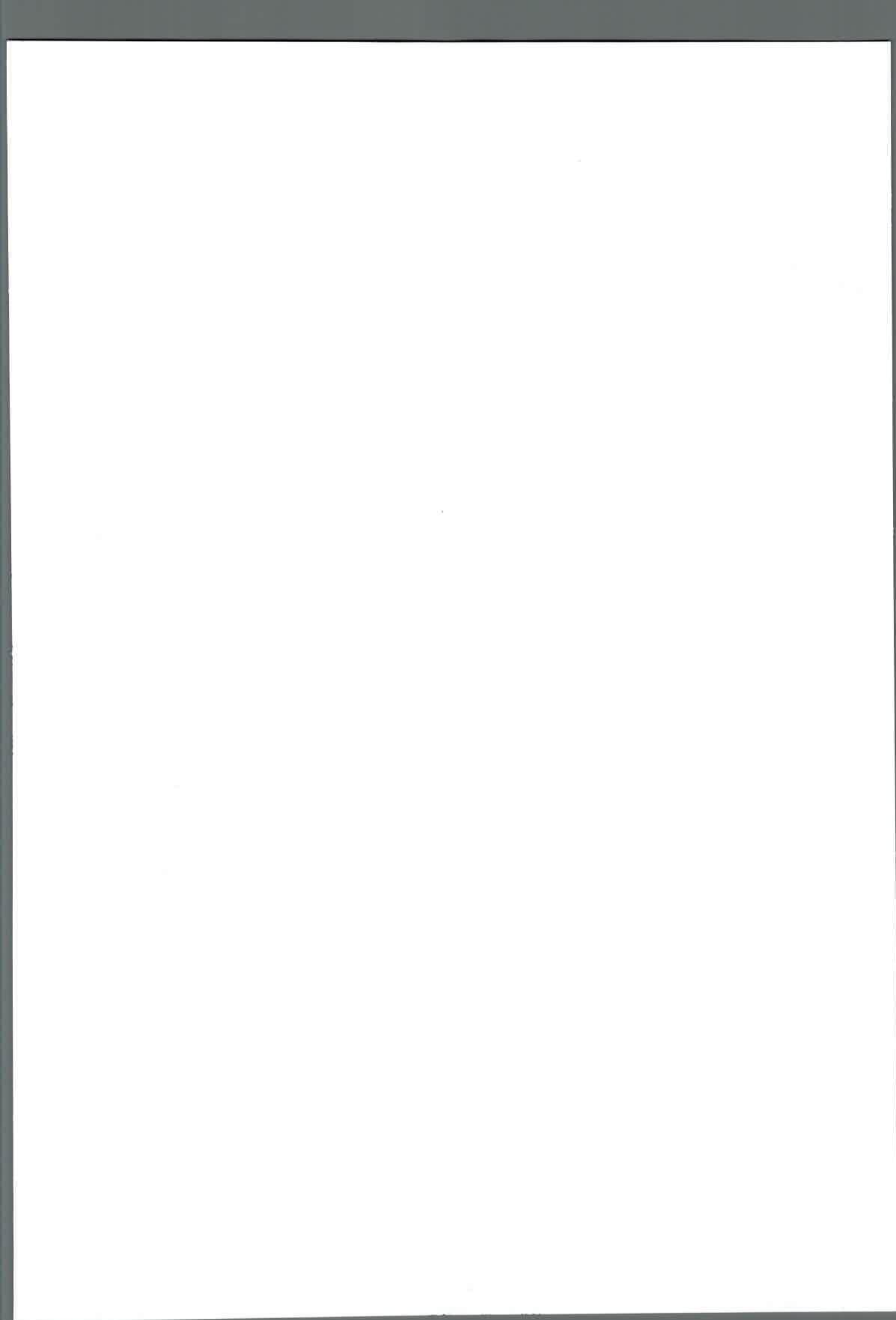
- DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ L, MORENO ROMO M, PORRERO CALONGE M & TÉLLEZ PEÑA S (2010). Uso prudente de antimicrobianos y propuestas de mejora en veterinaria. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28 (supl 4): 40-44.
- DOVA S, SAN ANDRÉS M, GONZÁLEZ F, SAN ANDRÉS M, DE LUCAS J & RODRÍGUEZ C (2007). Pharmacokinetic behavior and pharmacokinetic / pharmacodynamic integration of marbofloxacin after subcutaneous administration in goats. *Vet J* 174 (2): 425-427.
- DRAKSLER D, NÚÑEZ M, GONZALEZ S & OLIVER G (2002). Leches de pequeños rumiantes: características generales. En Barberis S. *Bromatología de la leche*. San Luis: Hemisferio Sur: 121-148.
- EL-SAYED M, EL-KOMY A & ABOUBAKR M (2011). Pharmacokinetics and excretion of norfloxacin in milk of normal and experimentally infected goats. *IJAVMS* 5 (2): 123-137.
- EMEA (European Medicines Agency) (1998). Note for guidance for the determination of withdrawal periods for milk: 1-26
- EMEA (European Medicines Agency) (2000). Committee for veterinary medicinal products. Summary reports: Marbofloxacin: 1-15.
- EMEA (European Medicines Agency) (2006 b). Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (CPMP/ICH/381/95)
- EMEA (European Medicines Agency) (2006 a). Validation of analytical procedures. Part II: Metodology. London, UK
- ERRECALDE C, DAVICINO R, PRIETO G & BOUREL B (2012). Deplecion plasmática y lactea de enrofloxacina 10 % y su metabolito ciprofloxacina en cabras. Jornada XVI Latinoamericanas- XXI Nacionales de Fármaco-Toxicología Veterinaria, FCV, Universidad del Nordeste, Corrientes.
- ERRECALDE C, PRIETO G, MAÑAS F & GARCÍA OVANDO H (2008). Disposición plasmática y láctea de levofloxacina en cabras. Memorias Jornadas XIII Latinoamericanas- XVIII Nacionales de Fármaco-Toxicología Veterinaria, Universidad de Buenos Aires.
- ERRECALDE C, PRIETO G, MAÑAS F & GARCÍA OVANDO H (2010 a). Farmacocinética plasmática y láctea de danofloxacina 18% en caprinos. Memorias XX Jornadas Nacionales-XV Latinoamericanas de Farmacología y Toxicología Veterinaria, FCV, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza.



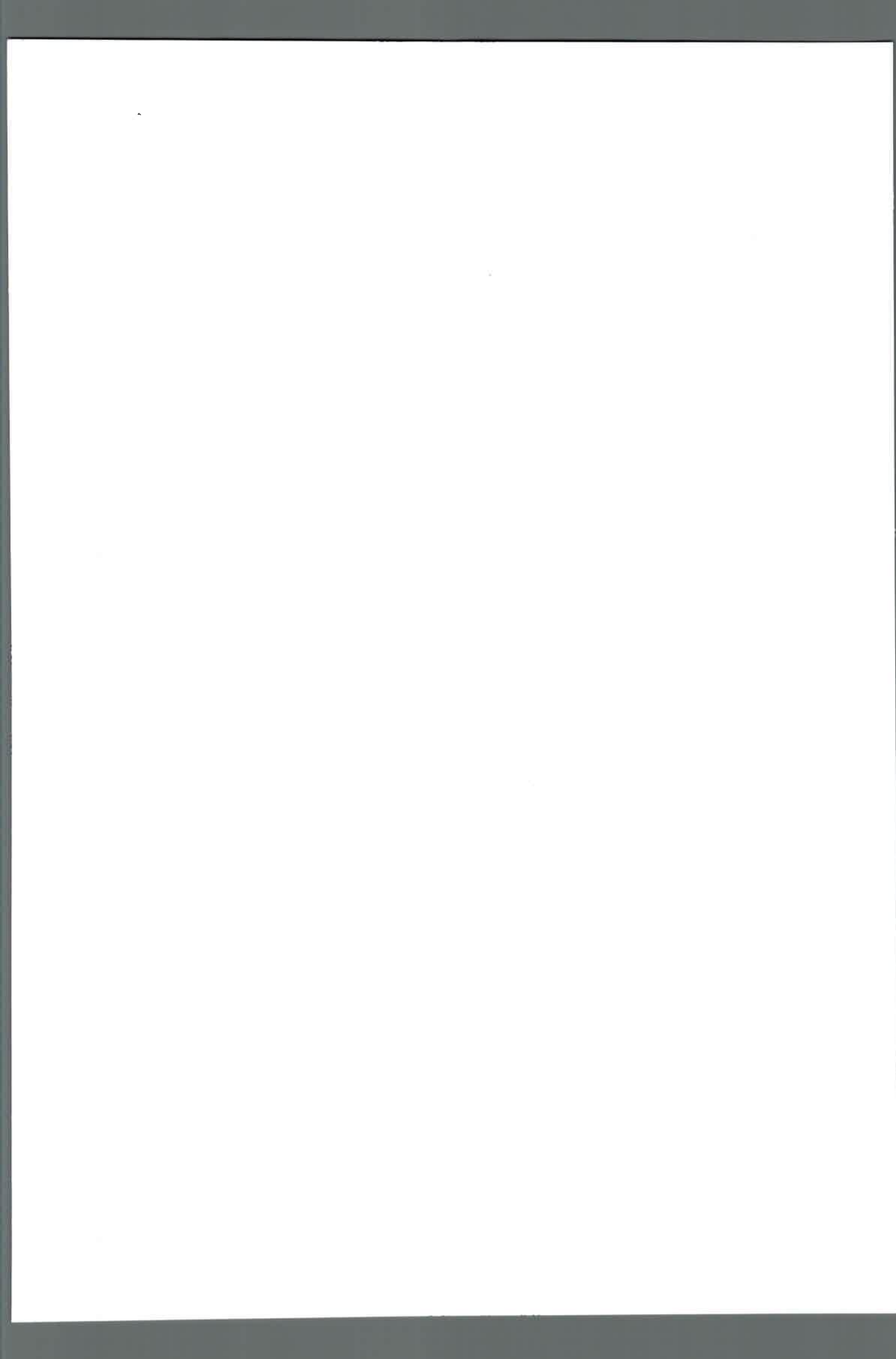
- ERRECALDE C, PRIETO G, MAÑAS F, GARCÍA OVANDO H & LÜDERS C (2010 b). Disposición sérica y láctea de difloxacina en cabras por aplicación intravenosa. Memorias XX Jornadas Nacionales- XV Latinoamericanas de Farmacología y Toxicología Veterinaria, FCV, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza.
- ESCOBAR E (1999). Use of antibiotic residue test kits for goat milk. Proc. 14th Ann. Goat Field Day, Langston University, Langston, OK: 115-118.
- ESCUDERO E, C CÁRCELES, E FERNANDEZ-VARON, P MARIN & H BENCHAOUI (2007). Pharmacokinetics of danofloxacin 18% in lactating sheep and goats. J vet Pharmacol Therap 30: 572-577.
- FAJT V (2011). Drug laws and regulations for sheep and goats. Vet Clin North Am Food Anim Pract 27: 1-21.
- FARRIER D (1999). PK Solution 2.0, Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis. Summit Research Services. Ashland, USA.
- FERNÁNDEZ PALACIOS O'CONNOR R (2013). Estudio farmacocinético de formulaciones poliméricas de liberación controlada para marbofloxacin en caprino. Tesis Doctoral, Departamento de Farmacología, Universidad de Murcia, España: 291p.
- FERNÁNDEZ-VARÓN E, VILLAMAYOR L, ESCUDERO E, ESPUNY A & CÁRCELES C (2006). Pharmacokinetics and milk penetration of moxifloxacin after intravenous and subcutaneous administration to lactating goats. Vet J 172: 302-307.
- FIROUZI R, RAJAIAN H, MANSOURIAN TABAEE I & SAEEDZADEH A (2010). *In vitro* antibacterialeffects of marbofloxacin on microorganisms causing mastitis in cows. J Vet Res 65 (1): 51-55.
- FITTON A (1992). The quinolones. An overview of their pharmacology. Clin Pharmacok 22 (supl 1): 1-11.
- GARCÍA V, ROVIRA S, BOUTOIAL K & LÓPEZ M (2014). Improvements in goat milk quality: a review. Small Rum Res 121 (1): 51-57.
- GIGUÈRE S & DOWLING P (2013). Fluoroquinolones. En Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine por Giguère S, Prescott J & Dowling P (ed), 5ta.ed, Wiley & Sons, Inc. Ames, Iowa, USA: 295-314.
- GIRARDI C & ODORE R (2008). Pharmacological treatments and risks for the food chain. Vet Res Commun 32 (supl 1): 11-18.



- GONZÁLEZ F & NIETO 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.
- GONZÁLEZ LOBATO L (2012). Actividad y modulación a través de inhibidores del transportador abcg2/bcrp. Tesis doctoral. Depto Cs Biomédicas, Universidad de León, España. 338p.
- GOUDAH A & ABO-EL-SOUD K (2008). Pharmacokinetics, urinary excretion and milk penetration of levofloxacin in lactating goats. *J vet Pharmacol Therap* 32: 101-104.
- GRANDEMANGE P, MATHEVET E, CHARRIER J & DAVOT . (2002). Use of marbofloxacin to treat K99 *Escherichia coli* gastroenteritis in newborn calves. *Irish Vet J* 55: 180-189.
- GRUET P, RICHARD P, THOMAS E & AUTEFAGE (1997). Prevention of surgical infections in dogs with a single intravenous injection of marbofloxacin: an experimental model. *Vet Rec* 140 (8): 199-202.
- GUARDABASSI L & KRUSE H (2008). Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals. En *Guide to Antimicrobial Use in Animals*, por Guardabassi L, Jensen L & Kruse H (ed). Garsington Road, Oxford, UK, Blackwell Publishing: 1-12.
- GUEST G & PAIGE C. (1991). The magnitude of the tissue residue problems with regard to consumer needs. *J Am Vet Med Assoc* 198 (5): 805-808.
- GUPTA R, SHARMA K, SHARMA R, GUPTA D, TYAGI S & YADAV B (2012). A review: pharmacokinetics application of fluoroquinolones. *IJPPR* 3 (2): 650-660.
- GUTIERREZ-ZUFIAURRE N (2004). Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas. *Rev Esp Quimioter* 17 (3): 232-243.
- HAENLEIN G (2007). About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Rumin Res* 68: 3-6.
- HAENLEIN G (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Rumin Res* 51: 154-163.
- HASSOUAN M, BALLESTEROS O, VÍLCHEZ J, ZAFRA A & NAVALÓN A (2007). Simple multiresidue determination of fluoroquinolones in bovine milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Lett* 40: 779-791.



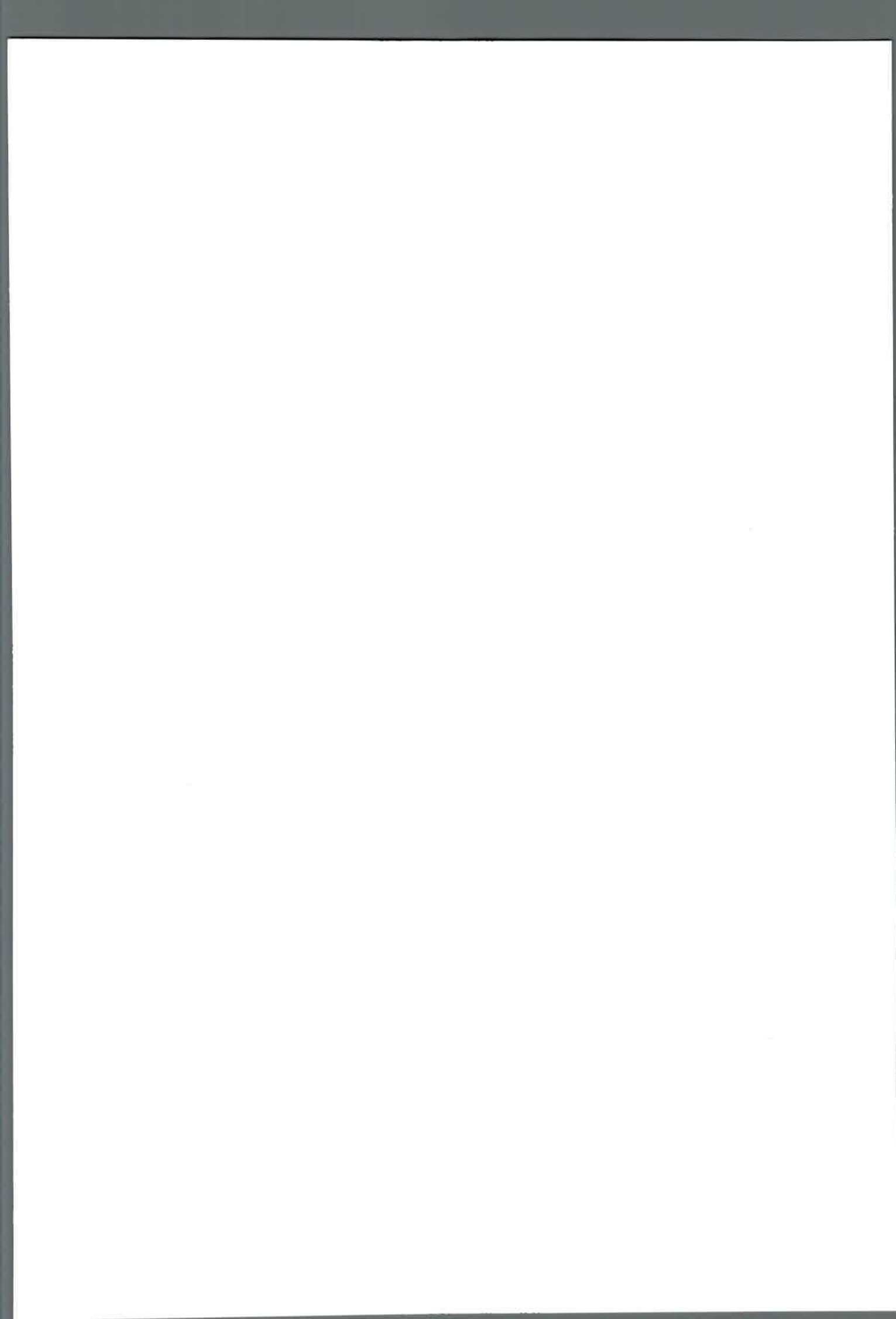
- HATZIMINAOGLOU Y & BOYAZOGLU J (2004). The goat in ancient civilizations: from the fertile crescent to the Aegean sea. *Small Rum Res* 51: 123-129.
- HAWKEY P (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother* 51 (supl 1): 29-35.
- HEKMAN P & HOOGLAND J (2000). WTM 1.4 Milk withdrawal time calculation program, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA, London, UK.
- HERNÁNDEZ-ARTESEROS J, BARBOSA J, COMPAÑÓ R & PRAT M (2002). Analysis of quinolone residues in edible animal products. *J Chromatogr A*, 945: 1-24
- HINCKLEY L, ATHERTON H & PORTER J (1994). Guidelines for production and regulation of quality dairy goat milk. Agway Inc., Syracuse, NY: 4pp.
- 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.
- ISMAIL M & EL-KATTAN Y (2007). Comparative pharmacokinetics of marbofloxacin in healthy and Mannheimia haemolytica infected calves. *Res Vet Sci* 82: 398-404.
- ITO S & LEE A (2003). Drug excretion into breast milk: overview. *Adv Drug Deliv Rev* 55 (5): 617-627.
- JENSEN L, ANGULO F, MØLBAK K & WEGENER H (2008). Human health risks associated with antimicrobial use in animals. En *Guide to Antimicrobial Use in Animals* por Guardabassi L, Jensen L & Kruse H (ed). Garsington Road, Oxford, UK, Blackwell Publishing: 13-26.
- JERZSELE A (2012). Comparative Veterinary Pharmacokinetics. En *Readings in advanced pharmacokinetics-Theory, methods and applications*. Noreddin A (ed). InTech, Rijeka, Croatia: 179-198.
- JONKER J, MERINO G, MUSTERS S, VAN HERWAARDEN A, BOLSCHER E, WAGENAAR E, MESMAN E, DALE T & SCHINKEL A (2005). The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med* 11: 127-129.
- JUAREZ M & RAMOS M (1986). Physico-chemical characteristics of goat milk as distinct from those of cow milk. En *International Dairy Federation* (Ed.),



- Proceedings of the IDF Seminar production and utilization of Ewe's and Goat's Milk, Bulletin No. 202. Athens, Greece: 54-67.
- KAMINSKI W, PIEHLER A & WENZEL J (2006). ABC a subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta* 1762: 510-524.
  - KATO M (2008). Chondrotoxicity of quinolone antimicrobial agents. *J Toxicol Pathol* 21: 123-131.
  - KHARDORI N (2006). Antibiotics: past, present, and future. *Med Clin N Am* 90: 1049-1076.
  - KUSUHARA H & SUGIYAMA Y (2007). ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Eur J Physiol* 453: 735-744.
  - LECOEUR BITCHATCHI S & KOLF CLAUW M (1998). Les nouvelles quinolones en médecine vétérinaire. *Rec Méd Vét* 175: 7-15.
  - LEE M & RYU P (2000). Public Health Risks: drug and antibiotic residues. 2000 APEC China Seminar. Beijing, China: 80-98.
  - LEES P, SVENDSEN O & WIUFF C (2008). Strategies to minimise the impact of antimicrobial treatment on the selection of resistant bacteria. En: *Guide to Antimicrobial Use in Animals* por Guardabassi L, Jensen L & Kruse H (Ed). Garsington Road, Oxford, UK, Blackwell Publ.: 77-101.
  - LI M, YUAN H, LI N, SONG G, ZHENG Y, BARATTA M, HUA F, THURSTON A, WANG J & LAI Y (2008). Identification of interspecies difference in efflux transporters of hepatocytes from dog, rat, monkey and human. *Eur J Pharm Sci* 35 (1-2): 114-126.
  - LOZANO M & ARIAS D (2008). Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Rev Colomb Cien Pecua* 21: 121-135.
  - 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.
  - MACRI A & MANTOVANI A (1995). The safety evaluation of residues of veterinary drugs in farm animal tissues and products. *J Exp Clin Cancer Res* 14 (2): 119-129.
  - MARÍN P, CÁRCELES C, ESCUDERO E & FERNÁNDEZ-VARÓN E (2007 a). Pharmacokinetics and milk penetration of ibafloxacin after intravenous administration to lactating goats. *Can J Vet Res* 71: 74-76.

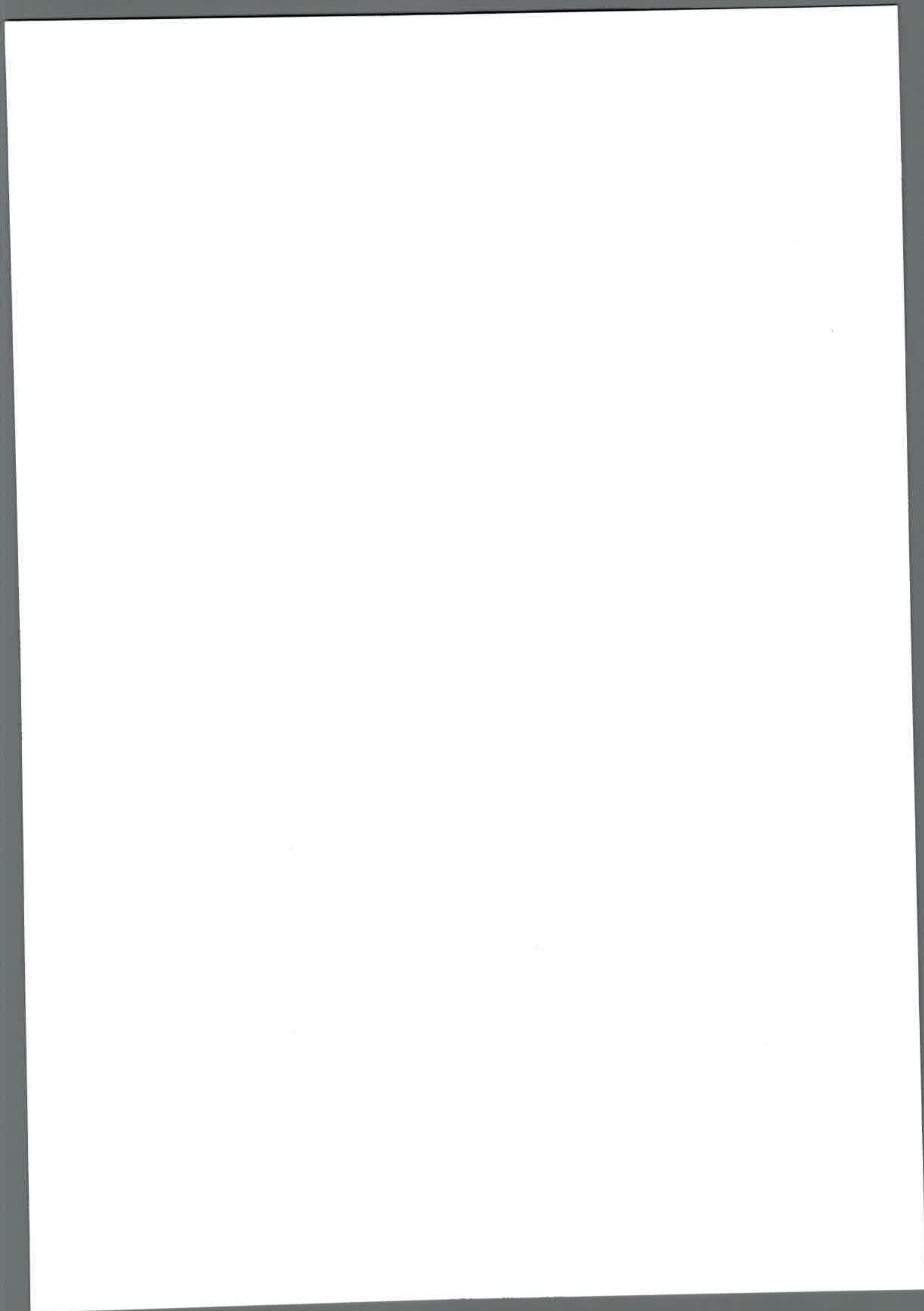
- MARÍN P, ESCUDERO E, FERNÁNDEZ-VARÓN E & CÁRCELES C (2007 b). Pharmacokinetics and milk penetration of orbifloxacin after intravenous, subcutaneous, and intramuscular administration to lactating goats. *J Dairy Sci* 90: 4219-4225.
- MARÍN P, ESCUDERO E, FERNÁNDEZ-VARÓN E & CÁRCELES C (2007 c). Pharmacokinetics and milk penetration of difloxacin after intravenous, subcutaneous and intramuscular administration to lactating goats. *J vet Pharmacol Therap* 30 (1): 74-79.
- MARTINEZ M & MODRIC S (2010). Patient variation in veterinary medicine: part I. Influence of altered physiological states. *J vet Pharmacol Ther* 33: 213-216.
- MARTÍNEZ M, MC DERMOTT P & WALKER R (2006). Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet J* 172 (1): 10-28.
- 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.
- MAVROGIANNI V, MENZIES P, FRAGKOU I & FTHENAKIS G (2011). Principles of mastitis treatment in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 27: 115-120.
- MCKINNON P & DAVIS S (2004) Pharmacokinetic and pharmacodynamic tissues in the treatment of bacterial infectious diseases. *Eur J Clin Infect Dis*. 23: 271-288.
- MERINO G, ALVAREZ A, PULIDO M, MOLINA A, SCHINKEL A & PRIETO J (2006) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metab Dispos* 34 (4): 690-695.
- MERINO G, JONKER J, WAGENAAR E, VAN HERWAARDEN A & SCHINKEL A (2005 a). The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol Pharmacol* 67 (5): 1758-1764.
- MERINO G, VAN HERWAARDEN A, WAGENAAR E, JONKER J & SCHINKEL A (2005 b). Sex-dependent expression and activity of the ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in liver. *Mol Pharmacol* 67 (5): 1765-1771.





- MITSCHER A & ZHENKUN M (2003). Structure-activity relationships of quinolones. En Fluoroquinolone antibiotics. Ronald A. & Low D (ed). Springer Basel AG, Boston: 11-48.
- MODI C, PATEL H & MODY S (2013). Animal husbandry practice to contaminants and residues of chemical in animal origin foods and health hazard. *Int J Molecular Vet Res* 3 (10): 55-61.
- MORENO G, GARCÍA A & LÓPEZ M (2000). Riesgos sanitarios de la contaminación de los alimentos. *Alimentaria* (Enero-Febrero): 19-28.
- MOTARJEMI Y & LELIEVELD H (2014). Milk and dairy products. A practical guide for the food industry. En Food Safety Management, por Motarjemi Y, Moy G, Jooste P & Anelich L, Elsevier Inc, London, UK: 84-119.
- NICHOLAS R & CHURCHWARD C (2012). Contagious caprine pleuropneumonia: new aspects of an old disease. *Transbound Emerg Dis* 59: 189-196.
- 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.
- ORDEN GUTIÉRREZ J & FUENTES LÓPEZ R (2001). Repercusiones en salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. *Rev Esp Salud Públ* 75 (4): 313-320.
- PAIGE J & TOLLEFSON L (2003). Veterinary products: residues and resistant pathogens. En Food safety: contaminants and toxins por D'Mello J (ed). Edinburgh, UK. CAB International: 293-313.
- PAPICH M & RIVIERE J (2009). Fluoroquinolone antimicrobial drugs. En *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Papich M, Riviere J & Adams H (Ed.), 9th ed, Wiley-Blackwell Publishing, Ames Iowa: 983-1001.
- PARK Y, JUÁREZ M, RAMOS C & HAENLEIN G (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin Res* 68: 88-113.
- PARK Y & HAENLEIN G (2006). Goat milk, its products and nutrition. En *Handbook of Food Products Manufacturing*, Hui Y (Ed.), John Wiley, New York, NY.
- PEA (2011) Plan Estratégico Alimentario y Agroindustrial- Participativo y Federal. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentos de Córdoba y Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación.

- PETRACCA K & WANNER M (1993). The effect of pregnancy and lactation in sows on the pharmacokinetics of the gyrase inhibitor marbofloxacin. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 135 (10): 298-304.
- PETRACCA K, RIOND J, GRASER T & WANNER M (1993). Pharmacokinetics of the gyrase inhibitor marbofloxacin: influence of pregnancy and lactation in sows. *J Vet A* 40: 73-79.
- PLUMB D (2010). Marbofloxacin. En: *Manual de farmacología veterinaria..* Ed. Inter-Médica, Buenos Aires, Argentina: 682-684.
- 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
- PULIDO M, MOLINA A, MERINO G, MENDOZA G, PRIETO J & ALVAREZ A (2006). Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (bcpr/abcg2): influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep. *J vet Pharmacol Ther* 29 (4): 279-287.
- 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.
- RAYNAL-LJUTOVAC K, GABORIT P & LAURET A (2005). The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Rumin Res* 60: 167-177.
- RAYNAL-LJUTOVAC K, LAGRIFFOULB G, PACCARD P, GUILLET I & CHILLIARD Y (2008). Composition of goat and sheep milk products: an update. *Small Rumin Res* 79: 57-72.
- REEVES P (2010). Drug Residues. En *Comparative and Veterinary Pharmacology*, por Cunningham F, Elliott J & Lees P (Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 266-289.
- REIG M & F TOLDRÁ (2009): Veterinary Drug Residues. En *Handbook of processed meats and poultry análisis*, por Nollet L & Toldrá F (ed), CRC Press, Boca Raton London- New York: 647-665
- RIVEROS MORCILLO L E (2008). Cinética sanguínea y láctea de enrofloxacin en vacas lecheras en el último tercio de gestación. Tesis Maestría en Inocuidad y Calidad de Alimentos. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.



- RIVIERE J & SUNDLOF S (2009). Chemical residues in tissue of food animals. En *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Riviere J & Papich M (Ed), 9th ed., Wiley-Blackwell, Usa: 1453-1462.
- ROBEY R, TO K, POLGAR O, DOHSE M, FETSCH P, DEAN M & BATES S (2009). Abcg2: A perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 61 (1): 3-13.
- ROCA M, CASTILLO M, MARTI P, ALTHAUS R & MOLINA M (2010). Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *J Agric Food Chem* 58 (9): 5427-5431.
- RODRÍGUEZ-DÍAZ R, FERNÁNDEZ-ROMERO J, AGUILAR-CABALLOS M & GOÑMEZ-HENS A (2006). Determination of fluoroquinolones in milk samples by postcolumn derivatization liquid chromatography with luminescence detection. *J Agric Food Chem* 54: 9670-9676.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ J (2005). Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23 (1): 25-31.
- ROUGIER S, BORELL D, PHEULPIN S, WOHRLE F & BOISRAME B (2005). A comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. *Vet Dermatol* 16 (5): 299-307.
- ROUGIER S, VOULDOUKIS I, FOURNEL S, PERES S & WOHRLE F (2008). Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniasis: a pilot study. *Vet Parasitol* 153 (3- 4): 244-254.
- RUBIO LANGRE S (2011). Comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin y de la enrofloxacin en llamas ("*Lama glama*"). Tesis Doctoral, Departamento de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.
- SARKADI B, HOMOLYA L, SZAKACS G & VARADI A (2006). Human multidrug resistance abcb and abcg transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* 86 (4): 1179-1236.
- SCHENCK F & CALLERY P (1998). Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J Chromatogr A*, 812: 99-109.
- SCHNEIDER M (2009). Methods for the analysis of fluoroquinolones in biological fluids. *Bioanalysis* 1 (2): 415-435.
- SCHNEIDER M, THOMAS V, BOISRAME B & DELEFORGE J (1996). Pharmacokinetics of marbofloxacin in dogs after oral and parenteral administration. *J vet Pharmacol Therap* 19: 56-61.

- SCHNEIDER M, VALLE M, WOEHRLE F & BOISRAMÉ B (2004). Pharmacokinetics of marbofloxacin in lactating cows after repeated intramuscular administrations and pharmacodynamics against mastitis isolated strains. *J Dairy Sci* 87: 202-211.
- SCHOLAR E (2002). Fluoroquinolones: past, present and future of a novel group of antibacterial agents. *Am J Pharm Educ* 16: 14-22.
- SCHRICKX J & FINK-GREMMELS J (2008). Implications of ABC transporters on the disposition of typical veterinary medicinal products. *Eur J Pharmacol* 585: 510-519.
- SCOTT L & MENZIES P (2011). Antimicrobial resistance and small ruminant veterinary practice. *Vet Clin Food Anim* 27: 23-32.
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) (2011) Res. 559/2011
- SHAROM F (2008). ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 9 (1): 105-127.
- SHEEHAN G & CHEW N (2003). The history of quinolones. En *Fluoroquinolone antibiotics*. Ronald A & Low D (ed). Springer Basel AG, Boston: 1-10.
- SHEM-TOV M, ZIV G, GLICKMAN A & SARAN A (1997). Pharmacokinetics and penetration of marbofloxacin from blood into the milk of cows and ewes. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A*, 44 (9-10): 511-519.
- SIDHU P, LANDONI M, ALIABADI S & LEES P (2010 a). Pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of marbofloxacin administered alone and in combination with tolfenamic acid in goats. *Vet J* 184: 219-229.
- SIDHU P, LANDONI M, ALIABADI S & LEES P (2010 b). PK–PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *Res Vet Sci* 88: 134-141.
- SILANIKOVE N, LEITNER G, MERIN U & PROSSER C (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: quality, safety and production aspects. *Small Rum Res* 89: 110-124.
- SINGH C, SINGH S, JAYACHANDRAN C, AKHTAR M & SINGH M (2001). Kinetics and distribution of ciprofloxacin in biological fluids of goats after intramuscular administration. *Indian J Anim Res* 35 (2): 116-119.
- SMITH M & SHERMAN D (2009). *Goat Medicine*. Wiley-Blackwell, 2th ed, 888p.



- SOBACK S, GIPS M, BIALER M & BOR A (1994). Effect of lactation on single-dose pharmacokinetics of norfloxacin nicotinate in ewes. *Antimicrob Agents Chemother* 38 (10): 2336-2339.
- SÖRGEL F & KINZIG M (1993) Pharmacokinetics of gyrase inhibitors. Part 2: renal and hepatic elimination pathways and drug interactions. *Amer J Medicine* 94: 56-59.
- SPRENG M, DELEFORGE J, THOMAS V, BOISRAME B & DRUGEON H (1995). Antibacterial activity of marbofloxacin. A new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates. *J vet Pharmacol Therap* 18 (4): 284-289.
- SUHREN G & HAMMER P (1998). Detection of residues of quinolones in milk. *Procc. 3rd Karlsruhe Nutrition Symposium European Research towards Safer and Better Food*, Gaukel V & Spieß W (Eds). October 18-20, Karlsruhe, Germany: 77-81.
- SUHREN G (1998). Influence of antimicrobials on starter cultures in milk - model trials. *Procc. 3rd Karlsruhe Nutrition Symposium European Research towards Safer and Better Food*, Gaukel V & Spieß W (Ed). October 18-20, Karlsruhe, Germany: 3-9.
- TANG Q, YANG T, TAN X & LUO J (2009). Simultaneous determination of fluoroquinolone antibiotic residues in milk sample by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 57 (11): 4535-4539.
- THOMAS E, CALDOW G, BORELL D & DAVOT J (2001). A field comparison of the efficacy and tolerance of marbofloxacin in the treatment of bovine respiratory disease. *J vet Pharmacol Therap* 24: 353-358.
- THOMAS V, DELEFORGE J & BOISRAME B (1994). Pharmacokinetics of marbofloxacin in preruminant and ruminant cattle. *Proceedings of the Sixth Congress the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT)*, 60-61.
- TOLLEFSON L & KARP B (2004). Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Med Mal Infect* 34 (11): 514-521.
- TOUTAIN P & BOUSQUET-MELOU A (2004 a). Bioavailability and its assessment. *J vet Pharmacol Therap* 27: 455-466.



- TOUTAIN P & BOUSQUET-MELOU A (2004 b). Clearance. *J vet Pharmacol Therap* 27: 415-425.
- TOUTAIN P & BOUSQUET-MÉLOU A. (2004 c). Plasma terminal half-life. *J vet Pharmacol Therap* 27: 427-439.
- TOUTAIN P & BOUSQUET-MÉLOU A (2004 d). Volumes of distribution. *J vet Pharmacol Therap* 27: 441-453.
- TOUTAIN P, FERRAN A & BOUSQUET-MÉLOU A (2010). Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. En *Comparative and Veterinary Pharmacology, Handbook of Experimental Pharmacology* 199, Cunningham F et al. (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 19-48.
- TREPANIER L (2013). Applying pharmacokinetics to veterinary clinical practice. *Vet Clin Small Anim* 43: 1013-1026.
- VALLE M, WOHRLE F & BOISRAME B (2004). Antibacterial activity of marbofloxacin against bacteria isolated from bovine mastitis. National GTV Conference, 26 to 28 May, Tours, France.
- VAN BAMBEKE F, MICHOT J, VAN ELDERE J & TULKENS P (2005). Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect* 11 (4): 256-280.
- VANCUTSEM P, BABISH J & SCHWARK W (1990). The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet* 80 (2): 173-186.
- 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. *J. AOAC Int* 88: 1179-1192.
- VLAMING M, LAGAS J & SCHINKEL A (2009). Physiological and pharmacological roles of *abcg2* (*bcrp*): recent findings in *abcg2* knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev* 61(1): 14-25.
- WAXMAN S, RODRÍGUEZ C, GONZÁLEZ F, DE VICENTE M, SAN ANDRÉS M I & SAN ANDRÉS M D (2001). Pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in adult goats. *J vet Pharmacol Therap* 24 (6): 375-378.
- WEBER N (1992). Use of xenobiotics in food-producing animals in the United States. Regulatory Aspects. En *Xenobiotics and Food-Producing Animals*; Hutson

- D, Hawkins D, Paulson G, Struble C al. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC: 2-16.
- WOODWARD K (1992). Veterinary Medicines: regulation in Europe and the importance of pharmacokinetic studies. En Xenobiotics and Food-Producing Animals; Hutson D, Hawkins D, Paulson G, Struble C et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC: 26-36.
  - YANG G, LIN B, ZENG Z, CHEN Z & HUANG H (2005). Multiresidue determination of eleven quinolones in milk by liquid chromatography with fluorescence detection. J AOAC Int 88: 1688-1698.
  - ZENG S, ESCOBAR E & BROWN-CROWDER I (1996). Evaluation of screening tests for detection of antibiotic residues in goat milk. Small Rumin Res 21: 155-156.
  - ZVIRDAUSKIENE R & SALOMSKIENE J (2007). An evaluation of different microbial and rapid test for determining inhibitors in milk. Food Control 18: 541-547.

