



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y
NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor
en Ciencias Biológicas

ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE
MARBOFLOXACINA Y DESARROLLO DE UN MODELO PREDICTIVO
DE RESIDUOS EN AVES DE ENGORDE EN CONDICIONES DE
TEMPERATURAS EXTREMAS DE EXPLOTACIÓN
ESTIVAL E INVERNAL

Lic. Natalia Francisca Urzúa Pizarro

DIRECTOR: Dr. Eduardo Jesús Picco

CODIRECTOR: Dr. Carlos Errecalde

Río Cuarto, Marzo 2018

COMISIÓN ASESORA

Nombre y Apellido.....Lugar de trabajo.....

Nombre y Apellido.....Lugar de trabajo.....

Nombre y Apellido.....Lugar de trabajo.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha.....

Calificación.....

JURADO

Firma..... Aclaración.....

Firma..... Aclaración.....

Firma..... Aclaración.....

DEDICATORIA

*A mi familia
y a quienes acompañaron este caminar...*

AGRADECIMIENTOS

A CONICET, el cual fue la plataforma mediante la cual alcance el doctorado, por brindarme todo el apoyo económico durante este periodo y permitir formar parte de esta prestigiosa entidad de investigación nacional Argentina.

A mi familia, ya que a pesar de la distancia, siempre estuvieron atrás apoyándome y alentándome a seguir mis sueños y cumplir mis metas.

A los profesores Dr. Carlos Errecalde y Mg. Guillermo Prieto, por estar dispuestos a ayudarme en todo, brindándome cada conocimiento y guiarme en este desafío académico, por la paciencia y la disposición día a día, sin su apoyo incondicional jamás hubiese llegado tan lejos.

Al Dr. Carlos Lüders, por tener fe en mí desde el día uno en mi postulación al doctorado y el reconocer que uno debe proponerse metas inalcanzables para volverlas realidad.

Al Dr. Eduardo Jesús Picco, por su dirección en todo este periodo y grandes aportes a la realización de esta investigación en los momentos requeridos, y disposición a colaborar en la realización de este sueño.

Secretaria y Ciencia y técnica de la UNRC, por el financiamiento para la realización de la investigación del doctorado.

A secretaria de posgrado de Facultad de Exactas, Físicoquímica y Naturales, por estar siempre dispuestos colaborarme en todo lo requerido, y por aceptarme para realizar el Doctorado en Ciencias Biológicas.

A las autoridades de posgrado de la FAV UNRC por su indispensable colaboración y apoyo a lo largo de mi camino académico en vuestra facultad.

Al laboratorio de Reproducción de la FAV, por facilitarme el lugar para el desarrollo de la investigación.

A cada una de las personas que se cruzaron en esta travesía, por cada palabra de ánimo cuando todo se ponía difícil, fueron tantas personas parte de este proceso, que compartieron diferentes etapas de este caminar, de todo corazón muchas gracias.

ÍNDICE

	Páginas
Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vii
Resumen en español e ingles	ix
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	5
2.1 Hipótesis	6
2.2 Objetivo general	6
2.2.1 Objetivos específicos	6
CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS	7
3.1 Materiales	8
3.1.1 Animales	8
3.1.2 Antimicrobianos	8
3.1.3 Equipos y reactivos	9
3.2 Metodología	
3.2.1 Estudio cinético y de disposición tisular	9
3.2.2 Tratamiento de muestras	10
3.2.3 Separación y cuantificación	11
3.2.4 Validación del método analítico	11
3.2.5 Análisis Farmacocinético	13
3.2.6 Construcción del modelo predictivo de residuos marbofloxacina de pollos parrilleros	14
3.2.7 Estimación del período de carencia por el programa wt 1.4	15
3.2.8 Análisis estadístico	15
CAPITULO 4: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	16
4.1 Producción de aves de engorde en argentina	17
4.1.1 Interferencia ambiental en la producción avícola	19
4.2 Utilización de antimicrobianos en la avicultura	23
4.2.1 Farmacocinética de antimicrobianos y consideraciones anatómo-fisiológicas de las aves	26
4.2.1.1 Farmacocinética	26
4.2.1.2 Características anatómo-fisiológicas de las aves	39
4.2.2 Fluoroquinolonas	41
4.2.2.1 Antecedentes farmacocinéticos de fluoroquinolonas en pollos Parrilleros	45
4.2.2.2 Resistencias bacterianas a fluoroquinolonas	48
4.2.2.3 Marbofloxacina en aves	49

ÍNDICE

	Páginas
4.3 Factores fisiológicos que interaccionan con la farmacocinética	54
4.4 Residuos de antimicrobianos	58
4.4.1 Metodologías analíticas para determinar residuos de fluoroquinolonas en tejidos de pollo	59
4.4.2 Período de carencia y farmacocinética	62
CAPITULO 5: RESULTADOS	69
5.1 Validación del método cromatográfico	70
5.2 Ensayo farmacocinético y de disposición tisular	72
5.3 Período de carencia y construcción de modelo	82
	85
CAPITULO 6: DISCUSIÓN	
6.1 Validación del método de extracción y cuantificación	86
6.2 Disposición plasmática y muscular de marbofloxacina en “temperatura confort”	88
6.3 Disposición plasmática y muscular de marbofloxacina en distinta época del año.	93
6.4 Período de carencia	98
CAPITULO 7: CONCLUSIONES	100
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Pesos promedio (kg) por cada estación del año (media \pm DE).	14
2	Período de carencia de fluoroquinolonas en músculo de aves según diferentes autores.	68
3	Resultados de los ensayos de linealidad para la cuantificación de marbofloxacina en plasma y musculo de pollo.	72
4	Recuperación y precisión del método analítico para la determinación de marbofloxacina en plasma de pollo parrillero	72
5	Recuperación y precisión del método analítico para la determinación de marbofloxacina en músculo de pollo parrillero.	72
6	Promedio de concentraciones plasmáticas ($X \pm DE$) de marbofloxacina ($\mu\text{g/ml}$) luego de una dosis de 2 mg/kg por aplicación endovenosa.	76
7	Promedio de concentraciones plasmáticas ($X \pm DE$) de marbofloxacina ($\mu\text{g/ml}$) en pollos luego de la administración oral (2 mg/kg)	76
8	Parámetros cinéticos plasmáticos de marbofloxacina en pollos luego de la administración endovenosa de 2 mg/kg, en las diferentes estaciones del año.	77
9	Parámetros farmacocinéticos plasmáticos de marbofloxacina por vía oral, en pollos parrilleros en las diferentes épocas del año.	77
10	Concentraciones musculares promedio ($X \pm DE$) de marbofloxacina ($\mu\text{g/g}$), posterior a una dosis de 2 mg/kg por aplicación endovenosa en cada estación estudiada.	79
11	Concentraciones musculares promedio ($X \pm DE$) de marbofloxacina ($\mu\text{g/g}$), posterior a una dosis de 2 mg/kg por aplicación oral en cada estación estudiada	80
12	Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacina en músculo por vía intravenosa, en pollos parrilleros en las diferentes épocas del año.	80
13	Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacina en músculo por vía oral, en pollos parrilleros en las diferentes épocas del año.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras		Página
1	Distribución de granjas por provincias.	18
2	Granjas familiares	19
3	Granjas industriales	19
4	Efectos de la temperatura ambiente en el gallinero sobre el consumo de agua y de alimento.	21
5	Representación esquemática de la complejidad de las interacciones entre animal, patógeno (bacteria) y antibiótico	24
6	Esquema básico por el cual el fármaco es absorbido, distribuido, metabolizado y excretado del cuerpo. Estos procesos son los que forman la base para el desarrollo de modelos farmacocinéticos.	28
7	Representación gráfica de los parámetros cinéticos $C_{máx}$, $T_{máx}$ y ABC.	29
8	Ilustración del dilema del veterinario, en animales productores de alimento en la optimización de la dosis terapéutica en un fármaco.	38
9	Modificaciones del núcleo básico de las quinolonas.	42
10	Estructura química de marbofloxacin	50
11	Esquema de un modelo farmacocinético de múltiple-compartimentos luego de una aplicación intravenosa.	64
12	Gráfico del ensayo de linealidad del método analítico para la determinación de marbofloxacin en muestras de plasma de pollos.	71
13	Gráfico del ensayo de linealidad del método analítico para la determinación de marbofloxacin en muestras de músculo de pollos.	71
14	Gráfico de la disposición plasmática de marbofloxacin en pollos ($\mu\text{g}/\text{ml}$), luego de la administración endovenosa y oral (2 mg/kg), en época primaveral.	73
15	Gráfico de la disposición plasmática de marbofloxacin en pollos ($\mu\text{g}/\text{ml}$), luego de la administración endovenosa y oral (2 mg/kg), en época estival	74
16	Gráfico de la disposición plasmática de marbofloxacin en pollos ($\mu\text{g}/\text{ml}$), luego de la administración endovenosa y oral (2 mg/kg), en época invernal.	74
17	Gráfico de la disposición plasmática de marbofloxacin por aplicación intravenosa, en todas las épocas.	75
18	Gráfico de la disposición plasmática de marbofloxacin por aplicación oral en todas las épocas de estudio	75
19	Gráfico de la disposición muscular de marbofloxacin ($\mu\text{g}/\text{g}$) en pollos parrilleros post-aplicación endovenosa y oral (2 mg/kg), en primavera.	78
20	Gráfico de la disposición muscular de marbofloxacin ($\mu\text{g}/\text{g}$) en pollos parrilleros post-aplicación endovenosa y oral (2 mg/kg), en época estival	78

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
21	Gráfico de la disposición muscular de marbofloxacina ($\mu\text{g/g}$) en pollos parrilleros post-aplicación endovenosa y oral (2 mg/kg), en invierno.	79
22	Gráfico de la disposición muscular de marbofloxacina por aplicación intravenosa en todas las épocas de estudio.	80
23	. Gráfico de la disposición muscular de marbofloxacina por aplicación oral en todas las épocas de estudio.	81

RESUMEN

En la avicultura, la temperatura ambiente debe mantenerse en un rango entre 18 a 24°C, para evitar cambios fisiológicos, que modifiquen el comportamiento cinético de los fármacos antimicrobianos utilizados, e interferir con el periodo de carencia que garantice un alimento inocuo. Con el propósito de evaluar diferencias farmacocinéticas de marbofloxacin, fluoroquinolona de segunda generación, en diferentes estaciones del año, y elaborar un modelo predictivo en pollos parrilleros que permita ajustar el período de carencia, se estudió su disposición plasmática y muscular. Se utilizaron pollos parrilleros (n= 345), conformados en lotes de 5 individuos por tiempo, divididos 6 grupos, según la vía de administración (endovenosa y oral) con una dosis única de 2 mg/kg en primavera, verano e invierno. Post administración se obtuvieron muestras de plasma y músculo en diferentes tiempos: 0,08 a 24 horas (endovenosa) y 0,25 a 120 horas (oral). Las muestras se eluyeron por HPLC con detector de fluorescencia, con una linealidad de $r^2 \geq 0,99$ y elevados porcentajes de recuperabilidad y coeficientes de variación $\leq 1,73$. Las concentraciones plasmáticas y musculares en los diferentes tiempos, se analizaron con un ANOVA y el programa PK Solution 2.0. Se determinó el periodo de carencia mediante la ecuación de Riviere y Sundlof, corroborada con el programa WT 1.4. Las concentraciones plasmáticas de invierno y verano por vía oral, fueron menores ($p < 0,05$) que en la época control (primavera), y se detectaron en invierno hasta las 72 horas post-aplicación. Se presentan diferencias en los parámetros farmacocinéticos plasmáticos por vía oral respecto del grupo control, con mayor depuración en verano, mayor permanencia en invierno y menor biodisponibilidad oral en verano e invierno. En músculo, por vía oral se registraron concentraciones significativamente mayores ($p < 0,05$) en invierno respecto de las otras dos épocas, y se detecta hasta 72 horas post aplicación. La semivida de eliminación y TMR determinan una salida del fármaco más tardía en invierno a diferencia de primavera. En verano se reducen las concentraciones en músculo y es rápida la salida del fármaco. La cinética de eliminación de marbofloxacin en aves administrada en distintas estaciones del año sufre variaciones; la semivida de eliminación se acorta en verano y se extiende en invierno, determinándose un período de carencia de 3 días para primavera y de 2 y 4 días para verano e invierno respectivamente; lo que demanda un ajuste según la época para garantizar un alimento inocuo para el ser humano.

ABSTRACT

In poultry farming, ambient temperature should be maintained in a range between 18 to 24 °C, to avoid physiological changes, which modify the kinetic behavior of antimicrobial drugs used, and interfering with withdrawal time to generate a healthy food. With the purpose of evaluating pharmacokinetic differences of marbofloxacin, second generation fluoroquinolone, in different seasons of the year, and to elaborate a predictive model in broiler chickens that allows adjustments in the withdrawal time, its plasma and muscular disposition were studied. Broiler chickens (n = 345) were used, formed into lots of 5 individuals per time, divided into 6 groups, according to the route of administration (intravenous and oral), receiving each animal a 2 mg / kg single dose, in spring, summer and winter. Post-administration plasma and muscle samples were obtained at different times: 0.08 to 24 hours (intravenous) and 0.25 to 120 hours (oral). Samples were eluted by HPLC with fluorescence detector, with a linearity of $r^2 \geq 0.99$ and high percentages of recoverability and coefficients of variation ≤ 1.73 . Plasma and muscle concentrations at different times were analyzed with an ANOVA and the PK Solution 2.0 software. Withdrawal time was determined by the Riviere and Sundlof equation, corroborated with the WT 1.4 software. Winter and summer plasma concentrations by oral route were lower ($p < 0.05$) than in the control season (spring), and were detected in winter until 72 hours post-application. Differences in plasma pharmacokinetic parameters are presented orally with respect to the control group, with greater purification in summer, greater permanence in winter and lower oral bioavailability in summer and winter. In muscle, orally significantly higher concentrations were recorded ($p < 0.05$) in winter compared to the other two periods, and it was detected up to 72 hours after application. The elimination half-life and TMR determine a later release of the drug in winter as opposed to spring. In summer, concentrations in muscle are reduced and drug withdrawal is rapid. The kinetics of elimination of marbofloxacin in chickens administered in different seasons of the year suffers variations; the elimination half-life is shortened in summer and extends in winter, determining a withdrawal time of 3 days for spring and 2 and 4 days for summer and winter respectively; what demands an adjustment according to the time, giving a healthy food for humanity.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La producción avícola cárnica es una de las actividades que ostenta mayor crecimiento en los últimos años a nivel mundial, aspecto vinculado a la brevedad del ciclo productivo y el reducido costo para el consumidor (Gouvêa *et. al*, 2015). En estas explotaciones intensivas, los factores que más interaccionan con las aves de engorde, son los componentes ambientales, debido que las líneas genéticas han relegado la adaptabilidad y rusticidad al medio ambiente, con el propósito de favorecer elevadas tasas de crecimiento en cortos periodos de tiempo (Estrada y Márquez, 2005; Gouvêa *et. al*, 2015). El factor ambiental que más influye es la temperatura, la cual debe mantenerse en un rango ideal entre 18 a 22 °C (Estrada y Márquez, 2005; Lisboa, 2012), a pesar que en los últimos se han desarrollado múltiples intentos en mantener la automatización controlada de los factores ambientales en estas producciones, aún en Latinoamérica se observan falencias.

En Argentina, la mayoría de las granjas son empresas familiares y poseen limitaciones de orden tecnológico de nivel medio o bajo. En consecuencia, la producción es afectada según la temperatura ambiental y humedad relativa, circunstancia que induce a las aves a situaciones de estrés, que las predisponen a padecer enfermedades y a mermas productivas (MAG, 2016). Entre las enfermedades, las infecciones bacterianas son las que habitualmente afectan a los pollos parrilleros, por ello las herramientas terapéuticas de mayor uso en avicultura son los antimicrobianos, y una de las familias más utilizadas son las fluoroquinolonas (Anjum y Rizvi, 1998; Gouvêa *et. al*, 2015; Landoni y Albarelllos, 2015). Este grupo desarrolla su acción impidiendo el enrollamiento del ADN microbiano, necesario para su replicación y determina un efecto bactericida. Con el transcurso del tiempo, la molécula inicial de las fluoroquinolonas se ha modificado generando nuevas sustancias que mejoran su actividad antimicrobiana y sus propiedades farmacocinéticas (Díaz David, 2012; Gouvêa *et. al*, 2015).

Las fluoroquinolonas se dividen en generaciones, las de segunda generación, de uso exclusivo veterinario, tales como enrofloxacin, danofloxacin, difloxacin, marbofloxacin, entre otras, poseen un espectro orientado hacia bacterias gram negativas y positivas y micoplasmas, además de mayor biodisponibilidad oral, elevada distribución a tejidos y moderada permanencia en el organismo. (Anjum y Rizvi, 1998; Löhren *et. al*, 2008; Gouvêa *et. al*, 2015).

Por otro lado, se debe considerar que los procesos fisiológicos o fisiopatológicos del ave frente a ciertas condiciones ambientales, tienen un impacto sobre el comportamiento

farmacocinético de algunos antibióticos, que se pueden traducir en un uso erróneo de estas herramientas terapéuticas, consideradas imprescindibles para las producciones intensivas. Esta situación puede generar un fuerte riesgo para la salud pública, ya que el empleo indebido de antimicrobianos en animales de consumo es una de las causas que promueve la manifestación de nuevas cepas de bacterias resistentes, con impacto negativo en la salud humana (Baynes y Riviere, 2014; Modric, 2014). Además, el uso indiscriminado de compuestos químicos en producción animal puede determinar la persistencia de niveles residuales peligrosos en los productos y subproductos, que generan trastornos en la salud en los consumidores, mediante reacciones alérgicas y otros fenómenos tóxicos (Anadón, 2007).

En este contexto, los estudios farmacocinéticos realizados en animales destinados al consumo humano constituyen un instrumento fundamental, empleados no sólo para la racionalización del tratamiento en busca del éxito terapéutico en el plantel productivo (Baggot, 2002), sino también para adoptar las medidas necesarias que permitan restringir los residuos farmacológicos en tejidos comestibles, estableciendo el período de carencia, a los efectos de proveer un alimento inocuo para el consumidor (Anadón, 2007; Lees y Toutain, 2012; Baynes y Riviere, 2014). Generalmente, estos estudios se desarrollan en una cantidad reducida de animales que conforman un grupo homogéneo, que luego de la administración de la dosis correspondiente se les extrae sangre o tejido donde se determinan las concentraciones del fármaco en función del tiempo, para originar una curva de disposición (Riviere y Sundlof, 2009; Lees y Toutain, 2012). Con esta información se determinan los parámetros farmacocinéticos necesarios que se utilizan para implementar el período de carencia, tales como la concentración a tiempo cero (C_0), la tasa de depuración (Cl_t), la semivida de eliminación y semivida de eliminación diferida (Riviere y Sundlof, 2009)

Se utilizan modelos cinéticos o programas informáticos que simulan las pruebas estadísticas necesarias para establecer el período de carencia, es decir el tiempo que debe transcurrir luego de la aplicación de la última dosis del fármaco hasta la faena del animal, la determinación de este período es indispensable para garantizar un alimento seguro y sin residuos nocivos para el humano, es decir bajo los límites máximos de residuos para estos compuestos, determinados por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Anadón, 2007; Riviere y Sundlof, 2009; Lees y Toutain, 2012).

Como se describe anteriormente, estas determinaciones se realizan en individuos clínicamente sanos y en condiciones productivas ideales, sin tener en cuenta que cuando los animales se medican con antimicrobianos con un propósito terapéutico, las aves padecen enfermedades que interaccionan con su fisiología y que interfieren con la farmacocinética del antimicrobiano, además de las condiciones ambientales que ejercen cambios fisiológicos, que conllevan una modificación en la persistencia y depleción del antibiótico en organismo del ave. Estos cambios, pueden modificar el tiempo de carencia del fármaco, por lo tanto se desarrollará un modelo predictivo con los parámetros cinéticos de eliminación de marbofloxacin, una fluoroquinolona relativamente nueva y con mejores propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas respecto otros miembros pertenecientes al grupo, con el objetivo de determinar la influencia de las modificaciones fisiológicas en los pollos parrilleros inducidas en diferentes condiciones ambientales en distintas épocas del año, frente a los parámetros farmacocinéticos.

CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La cinética de eliminación de marbofloxacin en aves sometidas a distintas condiciones ambientales de producción, sufre variaciones significativas que pueden ser inferidas para reajustar el período de carencia según la temperatura a la que fueron expuestas, evitando así los residuos al momento de la faena.

2.2 Objetivo general

Analizar la cinética de eliminación de marbofloxacin en aves de engorda en condiciones productivas de invierno, primavera y verano, a los efectos de construir un modelo predictivo que permita ajustar el período de carencia del antibiótico y evitar niveles residuales al momento de la faena.

2.2.1 Específicos

1. Validar método de extracción y detección de marbofloxacin en sangre de pollos parrilleros.
2. Validar método de extracción y detección de marbofloxacin en músculo de pollos parrilleros
3. Obtener parámetros cinéticos robustos tras la administración de marbofloxacin en pollos por vía endovenosa y oral
4. Describir la cinética de eliminación de marbofloxacin en pollos parrilleros sometidos a temperaturas ambientales durante la explotación estival, invernal y de primavera.
5. Construir un modelo predictivo de cambios en la cinética de eliminación que permita ajustar el período de carencia según la temperatura ambiente al cual se expuso al ave.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Materiales

3.1.1 Animales

Para el desarrollo de cada uno de los ensayos realizados en las diferentes épocas del año, primavera, verano e invierno, se utilizaron 115 pollos parrilleros, línea Ross, mixtos, de una edad próxima a los 30 días, clínicamente sanos, los cuales se seleccionaron al azar a partir de una población cercana a los 1600 pollos existentes en una avícola comercial próxima a la ciudad de Río Cuarto.

Todos los animales fueron previamente vacunados contra Marek, Newcastle, Gumboro y Bronquitis Infecciosa, y eran alimentados con un balanceado comercial (El Granjero[®]), constituido por maíz, avena, sorgo, afrechillo de trigo, soja desactivada, núcleo vitamínico mineral, metionina, pellet de girasol, pellet de soja, y que además contenía robenidina como coccidiostático y virginiamicina como promotor de crecimiento.

Las aves fueron trasladadas a dependencias de la Facultad de Agronomía y Veterinaria dependiente de la Universidad Nacional de Río Cuarto 7 días previo al inicio del ensayo para su aclimatación a las condiciones del estudio; alojadas en un ambiente semicontrolado, con condiciones de temperatura variables según la estación del año de $18,6 \pm 2,5$ °C en primavera, de $26,6 \pm 2,3$ °C en verano y en invierno de $12 \pm 2,9$ °C, ventilación adecuada y plan de luz de 18 horas totales. Las aves recibieron agua de bebida *ad libitum* y el mismo alimento balanceado comercial que se les suministraba en el establecimiento de procedencia, pero en este caso sin promotores de crecimiento y coccidiostáticos.

3.1.2 Antimicrobianos

Se utilizaron, una solución comercial de marbofloxacina, Marbocyl[®] 2%, (Laboratorio Vétoquinol S.A., España) y estándares de calibración de marbofloxacina con un grado de pureza del 98% (Laboratorio Guobang Pharma, China) y enrofloxacina con un grado de pureza del 99,9% (Laboratorio Chile) como estándar interno, para la determinación del analito y validación del método.

3.1.3 Equipos y reactivos

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que corresponde a la serie 1050 de Hewlett-Packard, dotado de bomba cuaternaria, desgasificador de fase móvil en línea, inyector manual tipo Rheodyne, detector de fluorescencia Hewlett-Packard serie 1046-A de longitud de onda regulable y computadora personal con placa y programa para el control del equipo, adquisición y procesamiento de los datos e impresión de los cromatogramas.

La fase móvil estuvo compuesta por agua deionizada, acetonitrilo (Applichem Panrekar 99,9%), trietilamina (Sintorgan 99%) en una relación de 790:200:10 v/v/v, ajustada a pH 3,0 con ácido ortofosfórico al 85% (Laboratorios Cicarelli) según Böttcher y colaboradores (2001) y filtrada con membrana de nylon de un diámetro de 0,22 μm y desgasificada con bomba de vacío.

Además, se confeccionó una solución de homogenización conformada por agua deionizada, metanol (Applichem Panrekar 99,9%) y ácido perclórico 70% (Laboratorios Cicarelli), en relación 500:500:20 v/v/v, utilizada para la desproteización de las muestras de tejido muscular.

3.2 Metodología

3.2.1 Estudio cinético y de disposición tisular

Luego de una semana de ambientación, las aves fueron pesadas y medicadas con el antibiótico según la asignación aleatoria al grupo correspondiente a la vía de administración endovenosa, grupo 1 y aplicación oral, grupo 2.

Grupo 1: conformado por 50 aves, recibieron una dosis endovenosa única de 2 mg/kg de la solución comercial de marbofloxacina en la vena subclavia. Posteriormente, 5 aves en cada uno de los tiempos: 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas, se sacrificaron por exanguinación siguiendo un procedimiento similar al realizado en los establecimientos

comerciales autorizados para la faena de aves, y se obtuvieron muestras de sangre y tejido muscular. Idéntico procedimiento fue realizado en cada estación del año.

Grupo 2: compuesto por 65 aves que, previo ayuno de 12 horas, recibieron mediante cánula una dosis oral única de 2 mg/kg de la solución comercial; igual que en el grupo anterior cinco aves se sacrificaron por exanguinación en distintos tiempos post-tratamientos: 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas. El mismo diseño se aplicó en cada época del año.

Las muestras de sangre (5 ml) de cada animal se colocaron en tubos heparinizados y fueron centrifugadas inmediatamente durante 10 minutos a 2.500 rpm. También se tomó una muestra de 5 g de músculo pectoral de cada animal. El plasma obtenido y las muestras de tejido se identificaron y conservaron hasta su análisis a -20 °C. Durante la experiencia se registró cada 8 horas la temperatura ambiental del recinto donde se alojaron las aves.

3.2.2 Tratamiento de las muestras

Para la cuantificación de marbofloxacin se realizó una extracción según con la metodología descrita por Böttcher y colaboradores (2001) con modificaciones, utilizando 150 µl de plasma o 150 µg de músculo, según corresponda, 150 µl de agua deionizada, 600 µl de solución de homogenización para las muestras tisulares o metanol para las muestras de plasma, con el propósito de desproteinizar, y 40 µl de una solución de enrofloxacin de 2,5 µg/ml, que se utilizó como estándar interno.

Para la extracción a partir del plasma el conjunto se sometió a agitación por vortex durante 30 segundos, más tarde se mantuvo en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugaron a 13.500 rpm a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante fue filtrado por membrana de nylon de 0,22 µm y 50 µl del mismo se utilizó como volumen de inyección de la muestra para su separación y cuantificación por HPLC.

Para las muestras tisulares el preparado fue homogeneizado mecánicamente durante 1 minuto, se dejó en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente, se almacenó por 12 horas en heladera a 4 °C y se centrifugó durante 25 minutos a 13.500 rpm a 4°C. El sobrenadante

fue filtrado por membranas de nylon de 0,22 μm , y se utilizaron 50 μL para inyectar en el cromatógrafo.

3.2.3 Separación y cuantificación

La separación y cuantificación se realizó a temperatura ambiente por HPLC mediante una elusión isocrática en fase reversa con flujo de 0,8 ml/minuto utilizando columna Agilent octadecilsilano (C_{18} , 5 μm , 4,6 mm, 25 cm), precolumna Phenomenex, jeringas de inyección Hamilton de 100 μl y lectura en detector de fluorescencia establecido a 295 nm de excitación y 490 nm de emisión, según Böttcher y colaboradores (2001). La elusión generó picos en cromatograma correspondientes a enrofloxacin, estándar interno, y al analito en estudio, marbofloxacin.

3.2.4 Validación del método analítico

Previo al análisis de las muestras problemas, se validó la metodología cromatográfica efectuando ensayos de linealidad, recuperabilidad, límites de detección y cuantificación, y ensayos de precisión (reproducibilidad y repetitividad).

Para la determinación de las concentraciones del analito en las muestras problemas y el desarrollo de los distintos ensayos, se utilizó un cociente de índices de áreas, producto de la división de las áreas bajo la curva del analito en estudio (marbofloxacin) por el estándar interno (enrofloxacin).

La validación de la metodología cromatográfica se efectuó según lo citado por *Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods* (CCRVDF), perteneciente a la Agencia Europea de Medicamentos EMEA/2002/657/EC (EMEA, 2002), mediante las repeticiones y los ensayos necesarios para determinar la confiabilidad del método. Los ensayos fueron los siguientes:

1) Curva de calibración

Se concretó con diferentes concentraciones de marbofloxacin entre los intervalos de 0,0097- 2,5 $\mu\text{g/ml}$ en plasma y 0,0048-1,25 $\mu\text{g/g}$ en músculo, según corresponda. Estas

concentraciones se obtuvieron de la solución madre compuesta de 100 µg/ml de marbofloxacina en metanol.

Para la linealidad se realizó una regresión lineal mediante el programa Graph Pad Prism versión 6.01, utilizando el cociente del índice de área obtenido de la división de las áreas de bajo la curva del analito y el estándar interno en cada una de las concentraciones conocidas trabajadas.

Con este propósito se utilizaron los valores de intercepto y pendiente de la curva de calibración en la siguiente función lineal (ecuación 1) y transformada (ecuación 2), donde (y) corresponde al índice de área, (a) al intercepto, (b) a la pendiente y (x) a la concentración:

$$y = a + bx \tag{1}$$

$$x = \frac{y - a}{b} \tag{2}$$

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 del analito de estudio (x), además del coeficiente de regresión.

2) Los límites de detección y de cuantificación

El ensayo de límite de detección (LD) se realizó aplicando la fórmula recomendada por la EMEA (2000), que contempla la superficie de área en el cromatograma originadas tras la elusión de las concentraciones más pequeñas de marbofloxacina mediante las cuales se estableció una curva de calibración y se obtuvo el valor de β (pendiente de la recta de la curva de calibración de las concentraciones más pequeñas) y la desviación estándar del ruido (σ). En la ecuación (3):

$$LD = \frac{\sigma \times 3.3}{\beta}$$

(3)

El límite de cuantificación (LQ) se calculó con la misma fórmula y valores, sólo que se multiplica el promedio de áreas obtenidas por 10 en ecuación (4):

$$LQ = \frac{\sigma \times 10}{\beta}$$

(4)

3) Ensayos de precisión y de recuperabilidad

Para la precisión se utilizaron los ensayos intradía, que se refiere a la elusión de estándares de calibración (0,039 a 1,25 µg/ml o µg/g, según corresponda) en plasma y músculo por sextuplicado. Se consideró aceptable cuando el coeficiente de variación (CV) entre elusiones, en cuanto el índice de áreas de los cromatogramas fue ≤ 1,5%.

Por otro lado, el ensayo interdía consistió en eluir los estándares de calibración 0,039 a 1,25 µg/ml o µg/g de plasma y músculo en ensayos efectuados en 6 días diferentes. Se consideró aceptable cuando el CV% de los índices de áreas de los cromatogramas fue ≤ 3%.

Con la finalidad de establecer la recuperabilidad “relativa”, se utilizaron estándares de calibración marbofloxacina en plasma y músculo de idéntica concentración de (0,039 a 1,25 µg/ml o µg/g, según corresponda) y muestras fortificadas con iguales concentraciones, por triplicado, observando las diferencias entre las muestras estándares/fortificadas, calculando el porcentaje de recuperabilidad (% R) en la ecuación (5):

$$\%R = \left(\frac{\text{índice de área calibración}}{\text{índice área recuperabilidad}} \right) \times 100$$

(5)

3.2.5 Análisis farmacocinético

A partir de las concentraciones plasmáticas y tisulares de marbofloxacina obtenidas de los cinco animales sacrificados por cada tiempo de muestreo se obtuvieron valores promedios en plasma y en músculo que se utilizaron para establecer la concentración final para cada uno de los tiempos de faena. Este procedimiento se aplicó para cada una de las vías de administración.

El programa cinético no compartimental PK Solution 2.0 (Farrier, 1999) se aplicó para el análisis farmacocinético en plasma y músculo, incorporando los promedios de concentraciones de marbofloxacina establecidas en cada tiempo de faena, la dosis utilizada, la vía de administración y los pesos promedios en cada estación, tal como se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Pesos promedio (kg) por cada estación del año (Media \pm DE)

Estación del año	Grupo 1	Grupo 2
Primavera	1,120 \pm 0,22	1,060 \pm 0,23
Verano	1,090 \pm 0,27	1,060 \pm 0,27
Invierno	1,006 \pm 0,18	1,030 \pm 0,20

La determinación de la biodisponibilidad oral absoluta (F) se realizó mediante la comparación de las ABC plasmáticas generadas por vía oral respecto a la administración intravenosa (Baggot, 2002; Toutain y Bousquet-Melou, 2004a).

3.2.6 Construcción del modelo predictivo de residuos de marbofloxacina en pollos parrilleros

La experiencia cinética se desarrolló mediante la aplicación de un modelo poblacional, en reemplazo del diseño cinético tradicional que contempla la toma de muestras seriadas en una cantidad reducida de animales, habitualmente seis. Según Martín-Giménez y Riviere (1998), Lees y colaboradores (2008), este modelo permite eludir variaciones adjudicadas al

sexo, tamaño, patologías y/o estado nutricional de los animales, y aportar información más próxima a situaciones reales.

Para la construcción del modelo predictivo se realizó una estadística descriptiva con las concentraciones tisulares obtenidas de marbofloxacina por aplicación oral en cada una de las épocas estudiadas. Además, se utilizaron los parámetros de la cinética de eliminación obtenidos (C_0 , $t_{1/2\gamma}$) en cada época de año (Baggot *et. al*, 2002; Riviere *et. al*, 2009).

En la estimación en el período de carencia se consideró el límite máximo de residuos (LMRs) establecido por la FDA y la EMEA para marbofloxacina en músculo de cerdo (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (EMEA, 2000), debido que este valor aún no ha sido determinado en aves.

Los promedios de concentraciones de marbofloxacina conseguidas hasta las 120 horas en músculo por vía oral en cada una de las estaciones del año, la fase de eliminación diferida ($t_{1/2\gamma}$) y el intercepto de la fase de eliminación (C_0) para músculo y la tolerancia o el límite máximo de residuos, se incorporarán para establecer el período de carencia (P_c) a la faena mediante la ecuación (6), propuesta por Riviere y Sunlof (2009) y mejorada por Riviere (2011):

$$P_c = 1,44 * \ln\left(\frac{C_0}{\text{tolerancia}}\right) * t_{1/2\gamma} \quad (6)$$

3.2.7 Estimación del período de carencia por el programa wt 1.4

El análisis de las concentraciones residuales en músculo versus tiempo se realizó utilizando el programa de la EMEA (WT 1.4) (Hekman, 1996), con un intervalo de confianza del 99%.

3.2.8 Análisis estadístico

Con las concentraciones por cada vía de administración y por cada matriz estudiada, en cada una de las estaciones del año asumiendo como control el determinado en primavera, se realizó un ANOVA de una vía y test de Tukey, para observar si existen diferencias

significativas ($p < 0,05$). Los análisis se realizaron en el Software IBM SPSS Statistic 21 (IBM, 2012).

CAPÍTULO 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Producción de aves de engorde en argentina

En el año 2013, la producción mundial de carne alcanzó un total de 308,3 millones de toneladas, lo que implica un incremento de 1,4% respecto a la producción anual del año anterior, según estimaciones realizadas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (Errecat, 2015). En este contexto, la carne de pollo es la más importante, por cuanto representa entre el 43,8 al 46,5% del volumen total de la producción mundial en los últimos años, debido no sólo a su efectividad productiva en cortos periodos de tiempo, sino también por la demanda del consumidor, el cual requiere alimentos económicos y abundantes en proteínas (Echávarri y De la Fuente, 2012; Boletín Avícola, 2017).

En el año 2016 el continente americano fue el más importante en cuanto a la producción de pollos de engorde, alcanzó el 44% de la producción total. En Sudamérica se destacan países como Brasil y Argentina por sus óptimas condiciones sanitarias, la incorporación de nuevas tecnologías y la elevada producción de cereales que contribuyen a incrementar la rentabilidad en la avicultura (Bueno *et. al*, 2016; MAG, 2016).

En Argentina, la producción de pollos parrilleros desde el 2010 ha tenido un crecimiento aproximado del 20%. En el año 2015, alcanzó una producción total de 2,0 millones de toneladas, con una tasa de crecimiento entre los meses de enero - abril (2016-2017) del 6,8%, incitado por el consumo interno (45,8 kg per cápita), y la incorporación del país en el mercado internacional como uno de los principales exportadores y productores de carne aviar, ubicado en el 7° y 8° puestos del ranking, respectivamente (MAG, 2016; Boletín Avícola, 2017).

Del total de las producciones avícolas en el país, el 82% comprende granjas de engorde de pollos parrilleros, que en el año 2013, alcanzaron un total de 5600 establecimientos distribuidos principalmente en las provincias de Entre Ríos, Buenos Aires, Santa Fe, San Luis y Córdoba (Figura 1), y ubicadas habitualmente en proximidades de los grandes centros urbanos (Keiddine, 2015). En el país, predominan las explotaciones avícolas intensivas, es decir gran cantidad de animales en espacios reducidos; en su mayoría son granjas familiares, con una capacidad de entre 10.000 y 30.000 aves (figura 2), localizadas principalmente en las

provincias de Entre Ríos, Santa Fe, San Luis y Córdoba, mientras que en la provincia de Buenos Aires prevalecen las granjas de mayor tamaño, que superan las 100.000 aves (figura 3), lo que evidencia entre ambos sistemas una heterogeneidad significativa en sus estructuras productivas (García 2011; MAG, 2016)

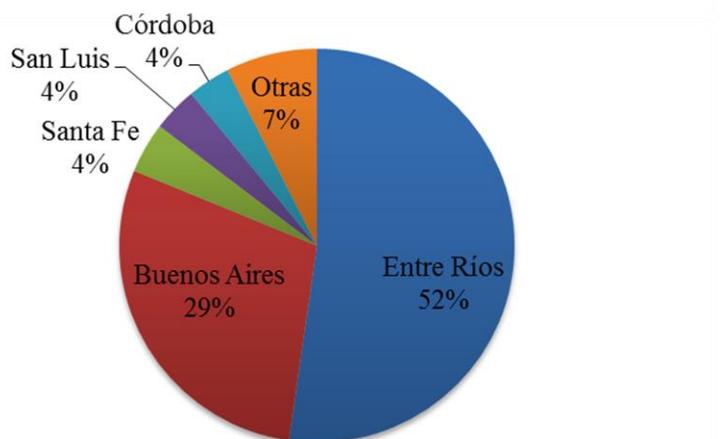


Figura 1. Distribución de granjas por provincias. Fuente: SIGSA. Dirección de Control de Gestión y Programas Especiales. Servicio Nacional de Sanidad Animal. SENASA.

En estas granjas productivas existen dos niveles de tecnologías adoptadas, el primero corresponde a las granjas familiares de media-baja tecnología, en general compuestas por estructuras de madera, ventilación natural con ventiladores, comederos manuales, campanas de calefacción, cortinas manuales y aislamiento en base cortinas plastificadas con filtro ultravioleta, en las cuales se observa mayor interacción con los factores ambientales (MAG, 2016). Mientras que el segundo nivel, comprende a las granjas industriales, que incorporan tecnología media-alta que incluye una estructura cerrada, generalmente de chapa galvanizada y aislamiento con cielorraso de poliuretano expandido, con sistemas de control de temperatura y ventilación automatizados a través de extractores, paneles evaporativos, aspersores, calefacción, además de comederos y bebederos automáticos, todos estos, en muchos casos funcionando bajo sistemas de control computarizado y automatizado, manteniendo las condiciones ambientales ideales completamente controladas, para una mayor producción y bienestar animal (MAG, 2016). A pesar de las diferencias expresadas en ambos sistemas tecnológicos de producción las aves se destinan a faena entre los 49 a 52 días de vida, con un peso aproximado de 2,3 a 2,7 kg (MAG, 2016).



Figura 2. Granjas familiares



Figura 3. Granjas industriales

Los niveles tecnológicos incorporados en las granjas de engorde poseen fuerte impacto productivo, además de afectar el bienestar animal, debido que las líneas genéticas de las aves de engorde son muy sensibles a las variables del entorno no controladas, puesto que fueron seleccionadas para que su metabolismo se enfoque en un crecimiento intensivo con mayor tasa de conversión alimentaria, y perdiendo rusticidad y adaptabilidad a las variaciones de las condiciones ambientales (Castelló Llobet *et. al*, 2002; Lisboa, 2012).

4.1.1 Interferencia ambiental en la producción avícola

Los factores ambientales más relevantes en la avicultura son temperatura, humedad relativa, radiación solar y velocidad del aire, ya que interfieren directamente con el comportamiento, la productividad, la reproducción, la expresión del potencial genético, la eficiencia de la utilización de nutrientes y los aspectos sanitarios de las aves (Lahoz, 2003; Estrada *et. al*, 2007; Olanrewaju *et. al*, 2010; Cunha, 2011; Lisboa 2012; Yahav, 2015), a pesar que la avicultura moderna procura mantener estos factores controlados, en Latinoamérica aún existe un déficit significativo en la incorporación de tecnologías de vanguardia en el sector avícola regional, de modo que las condiciones ambientales en algunos casos constituyen limitantes. Por ello, el factor que más impacta es la temperatura ambiente, a pesar que las aves por su condición de animales homeotermos, es decir mantienen la temperatura corporal constante independientemente de la temperatura ambiental, las modificaciones genéticas incorporadas en el último tiempo en las líneas de pollos parrilleros, han disminuido su adaptabilidad al entorno, por ello requieren temperaturas ambientales de

rango muy estrecho, denominado “temperatura confort” que oscila entre los 18 a 24 °C en la etapa de terminación o engorda, es decir entre los 21 a 56 días de vida, dependiendo del país de producción (De Basilio *et. al*, 2003; Estrada y Márquez, 2005; Lisboa, 2012).

Según Requena y colaboradores (2004), los mecanismos de autorregulación de la temperatura corporal comienzan a funcionar de manera efectiva a partir de los 8 a 10 días de vida, lo cual permite la producción y/o la pérdida de calor, con el propósito de preservar la temperatura corporal en valores fisiológicos, de 41 a 42 °C en el ave adulta (Estrada y Márquez 2005; Lisboa, 2012; Yahav, 2015). Mientras que Whittow (1968) y Yahav (2015), establecen que en las aves la cantidad de calor generada en situaciones de ejercicio o por actividad metabólica es igual a la cantidad de calor que disipa generalmente por evaporación de agua hacia el medio que lo rodea, logrando así el equilibrio o la homeostasis térmica. Si el equilibrio no se consigue, la temperatura somática puede aumentar cuando la producción excede las pérdidas calóricas, e inversamente, podría disminuir cuando las pérdidas de calor fuesen mayores a la producción (Tolentino *et. al*, 2008; Yahav, 2015), este desequilibrio se observa cuando las aves se alojan fuera del rango de “temperatura de confort”, lo que determina cambios de comportamiento, productivos y fisiológicos (Estrada y Márquez 2005).

Las modificaciones en el comportamiento de las aves, se observa al exponerse a situaciones de temperaturas elevadas, reducen su actividad y extienden las alas para aumentar la capacidad de pérdida de calor, ya que el plumaje que recubre gran parte de su cuerpo funciona como aislante y sólo pueden liberar calor por la cresta y los miembros posteriores. Mientras que en ambientes fríos las aves mantienen su temperatura corporal mediante la reducción del área superficial, adoptando posturas encorvadas, con el propósito de proteger sus áreas de mayor pérdida térmica (Estrada y Márquez, 2005).

Además, fuera del rango de termoneutralidad, el animal modifica el consumo de agua y alimento (Figura. 4), por cada grado centígrado mayor a 20 °C, el consumo de agua se incrementa un 6% y paralelamente, disminuye la ingesta de alimento un 1,5 %, además de alterar su rutina alimenticia a horarios nocturnos. En cambio, en situaciones de frío, con temperaturas ambiente menores a 15° C, la ingesta de alimento es estimulada un 9% (Estrada y Márquez, 2005; Furlán, 2006; Lisboa, 2012). Es por ellos, que en ambas condiciones, se observa un deterioro en el índice de la conversión alimenticia y en la tasa de crecimiento, más

significativa en situaciones de calor, donde a 35 °C la diferencia entre la relación de consumo de agua y alimento puede alcanzar el valor 6:1, según indica la figura 4. (Estrada y Márquez 2005).

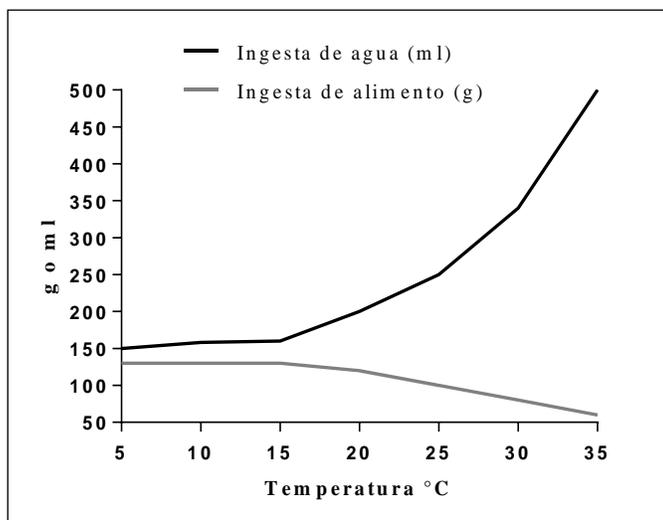


Figura 4. Efectos de la temperatura ambiente en el gallinero sobre el consumo de agua y de alimento (modificado de Estrada y Márquez 2005).

Una de las consecuencias inmediatas del menor consumo de alimento, es la reducción en la ganancia de peso, mientras que Olivera y colaboradores (2006), señalan que se relaciona con una disminución del tamaño de algunos órganos, tales como el corazón o el hígado, donde en temperaturas de estrés térmico (30 – 32 °C) observaron reducciones que alcanzan hasta el 41% del corazón y el 24% del hígado. Por otro lado, el incremento del consumo de agua en ambientes con temperaturas elevadas obedece a que sólo pueden liberar calor por evaporación en las zonas sin plumas y a través del jadeo, debido a la ausencia de glándulas sudoríparas (Pedersen y Thomsen, 2000; Estrada y Márquez, 2005; Cahaner *et. al*, 2008)

Fisiológicamente, las aves poseen el centro termorregulador en la zona pre-óptica del hipotálamo, que recibe la información a través de los receptores térmicos presentes en la piel (Yahav, 2015). Los mecanismos fisiológicos más importantes en la regulación de la temperatura corporal son ejercidos por el sistema neuroendocrino, que produce un efecto vasomotor que se relaciona a la temperatura ambiente; en situaciones fuera de la termoneutralidad se activan las respuestas del eje hipotalámico-pituitario-adrenal y tiroideo que regulan la tasa metabólica del animal (Furlán, 2006; Lara y Rostagno, 2013).

Cuando las aves se encuentran en ambientes calurosos se incrementa el flujo sanguíneo a los tejidos periféricos libres de plumas con el propósito de favorecer la pérdida de calor, además se incrementa el flujo sanguíneo a nivel pulmonar, necesario para el jadeo, mecanismo que permite liberar aproximadamente el 25% del calor (Yahav, 2015). Además determinaron un incremento hasta del 83% del flujo sanguíneo en las anastomosis arteriovenosas (Furlán, 2006), reduciéndose el flujo de sangre a ciertos órganos tales como hígado, riñón e intestino (Bucher y Miles, 2003), aumentando el volumen plasmático y la tasa de filtración renal como resultado del mayor consumo de agua (Castelló Llobet, 1993).

En épocas de bajas temperaturas las aves minimizan la pérdida de calor mediante vasoconstricción cutánea, mecanismo iniciado por una acción neuronal simpática, en paralelo con la dirección de mayor flujo sanguíneo a las vísceras para mejorar la producción de calor (Yahav, 2015). Además, se observa un aumento del volumen de glóbulos rojos que determina un incremento de la viscosidad sanguínea e implica una mayor carga cardíaca, hipertensión arterial y mayor resistencia del flujo sanguíneo, lo cual explica ciertos cambios morfológicos observados en animales expuestos al frío, por ejemplo, el engrosamiento del músculo cardíaco (Brake y Yahav, 2012).

Por otro lado, la digestión en los pollos parrilleros también es afectada por la temperatura ambiental. La velocidad de transporte del quimo a través del sistema digestivo desciende significativamente con temperaturas elevadas (32 °C) y se incrementa con bajas temperaturas (5 °C), debido a la influencia que ejercen los sistemas nervioso y endocrino sobre los movimientos peristálticos y la digestión, que se reducen en condiciones de altas temperaturas y determinan mayor permanencia del alimento en el buche e intestino delgado (Hai *et. al*, 2000). Además, existe menor digestión de aminoácidos en los pollos parrilleros expuestos al calor, debido a la disminución significativa en la secreción de las enzimas, tales como tripsina, quimotripsina y amilasa. En cambio, en situaciones de frío sucede lo inverso (Virden y Kidd, 2009), sumándose a esto que toda situación estresante provoca una disminución de la respuesta inmune, lo cual adicionado al deterioro de la morfología intestinal observada en pollos expuestos a temperaturas superiores de 26 °C (Quinteiro-Filho *et. al*, 2010; Calefi *et. al*, 2014), promueven mayor predisposición del ave a padecer enfermedades, tales como las infecciones bacterianas (Quinteiro-Filho *et. al*, 2012; Lara y Rostagno, 2013).

4.2 Utilización de antimicrobianos en la avicultura

Esta mayor predisposición a padecer enfermedades, muchas de ellas de etiología bacteriana, como colibacilosis, micoplasmosis, coriza, cólera y tifoidea aviar, entre otras (Houriet, 2007) demanda el empleo masivo de agentes antimicrobianos ya sea como tratamiento terapéutico, metafiláctico o incluso en forma preventiva transformando al conjunto de estas sustancias en herramientas indispensables en la producción aviar (Sumano López *et. al*, 2000; Hofacre *et. al*, 2013; Talero-Pérez *et. al*, 2014; Landoni y Albarellos, 2015). La principales herramientas antimicrobianas utilizadas en la avicultura, son los fármacos pertenecientes a la familia de betalactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas, fluoroquinolonas, macrólidos, aminoglucósidos, polipéptidos y fenicoles (Landoni y Albarellos, 2015).

La antibioticoterapia en pollos parrilleros, al igual que en otras especies, no sólo tiene como objetivo principal proveer la curación clínica, sino también procura la curación bacteriológica, por lo que la eficacia terapéutica dependerá de la compleja interacción fármaco, patógeno, y animal (figura 5), condicionando así el esquema posológico que consiga concentraciones farmacológicas en el sitio de infección durante el tiempo suficiente para controlar la carga bacteriana (Beltran, 2004; Mc Kinnon y Davis, 2004). De no lograr el éxito terapéutico puede derivar en efectos indeseables como el desarrollo de cepas bacterianas resistentes, que pueden originar una recolonización bacteriana, e incluso ser diseminadas a otros animales, al hombre y al medio ambiente, con todas las consecuencias que trae aparejado (Baggot, 2002; Talero-Pérez *et. al*, 2014; Lorenzutti, 2017).

La producción avícola también condiciona el modo de administración de los antimicrobianos, debido a que por la gran cantidad de animales que enferman a consecuencia del hacinamiento, no es factible ni rentable la aplicación individual por la complejidad del manejo y el escaso valor económico unitario, además, el estrés que significa la aplicación parenteral puede resultar en una progresión más rápida de la enfermedad (Vermeulen *et. al*, 2002; Hofacre *et. al*, 2013). Es por ello, que el modo de aplicación de estas herramientas terapéuticas más práctico y habitual es la administración oral, adicionado al alimento en los tratamientos de periodos más extensos y de carácter preventivo, o en al agua de bebida durante periodos breves de tiempo y con propósitos curativos (Vermeulen *et. al*, 2002; Sumano y Gutiérrez, 2004; Sánchez, 2005).

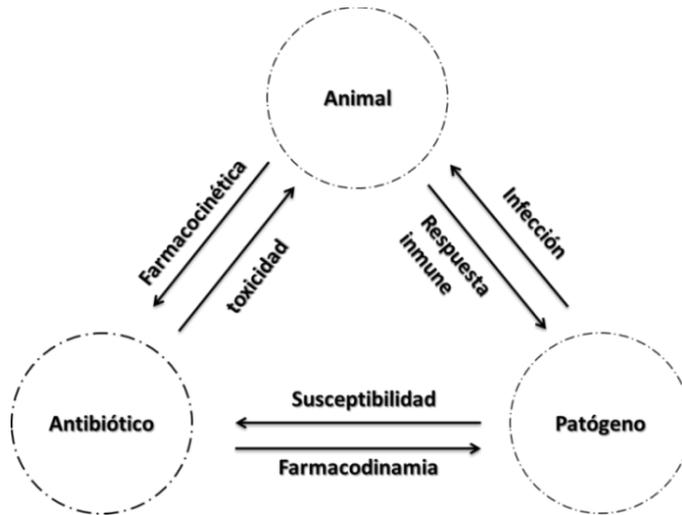


Figura 5. Representación esquemática de la complejidad de las interacciones entre animal, patógeno (bacteria) y antibiótico modificado de McKinnon y Davis (2004).

En las explotaciones avícolas la utilización de estas herramientas terapéuticas se desarrolla en varias etapas durante la crianza con el propósito de proteger el plantel o reducir las pérdidas causadas por la enfermedad, sobre todo cuando la sanidad o el manejo del plantel son inadecuados, en estos casos los fármacos suelen aplicarse como sustitutos de las buenas prácticas de manejo (Hofacre *et. al*, 2013), donde generalmente la terapia antimicrobiana se realiza dependiente de criterios económicos y productivos (Löhren *et. al*, 2008). Es por ello que hoy en día esta situación genera debates continuos, tanto científicos como políticos respecto a los riesgos del uso irracional de los antimicrobianos en animales de consumo, por los peligros potenciales para la salud pública, como la eventual toxicidad, y la expresión de resistencias bacterianas que determinan menor efectividad de estas herramientas terapéuticas (Turnidge, 2004; Löhren *et. al*, 2008; Hao *et. al*, 2014, Landoni y Albarellos, 2015). En este contexto, es vital comprender las interrelaciones entre las bacterias, los agentes antimicrobianos, el huésped y el consumidor, y diseñando programas racionales de aplicación de antimicrobianos en animales de consumo, acreditando así la eficacia terapéutica e inocuidad alimentaria (Landoni y Albarellos, 2015).

La situación planteada implica conocer más allá de la sensibilidad del agente causal frente a los antimicrobianos, sino también diseñar modelos de uso racional de administración de fármacos, mediante investigaciones precisas en la especie de aplicación, contemplando características fisiológicas propias de la especie animal, fisiopatológicas en casos de enfermedad, con los objetivos de analizar el comportamiento del fármaco dentro del organismo y las concentraciones de estos en los distintos tejidos (Houin, 1990; Lees y Toutain, 2012; Baynes y Riviere, 2014).

4.2.1 Farmacocinética de antimicrobianos y consideraciones anatomo-fisiológicas de las aves

4.2.1.1 Farmacocinética

La farmacocinética (PK) estudia el comportamiento del fármaco dentro del organismo, determinando las variaciones en las concentraciones de los fármacos y sus metabolitos en función del tiempo en los diferentes fluidos, tejidos y excretas del organismo, mediante relaciones matemáticas necesarias para desarrollar modelos que permitan interpretar tales datos (Gibaldi y Perrier, 1975; Houin, 1990; Riviere, 2009; 2011).

A grandes rasgos se pueden definir dos tipos de modelos para el tratamiento de los datos obtenidos, esto es un análisis compartimental o bien uno no compartimental. Ambos tratamientos de datos son válidos y complementarios, y en muchas ocasiones se realiza primero un tratamiento no compartimental como punto de partida para el análisis compartimental. En los modelos farmacocinéticos que poseen enfoque compartimental se considera al organismo compuesto por una serie de compartimentos en equilibrio. Los compartimentos se agrupan sobre la base de tasas similares de movimiento de fármacos dentro de un grupo de tejidos homogéneos cinéticamente, pero anatómicamente y fisiológicamente heterogéneos (Riviere, 2009)

Estos compartimentos son entidades teóricas que permiten la formulación de modelos matemáticos para describir el comportamiento de un fármaco en el tiempo con respecto al movimiento intra e inter compartimentos; ya que la sangre es la matriz biológica común y

accesible para evaluar el destino de los fármacos, la mayoría de los modelos farmacocinéticos se construyen con concentraciones de fármaco en sangre o plasma como referencia central a la que están relacionados otros procesos (Riviere, 2009; 2011; Lees y Toutain, 2012)

Existen, el modelo monocompartimental - alguna de las ecuaciones mostradas en este capítulo se describen bajo este contexto- el organismo es considerado como si fuese un solo compartimento, donde el fármaco ingresa en la circulación general se distribuye y se elimina simultáneamente. Mientras que el modelo bicompartimental inicialmente se observa una distribución rápida, seguida de un punto de pseudoequilibrio y posteriormente una pendiente de eliminación (Riviere 2009; 2011).

En la actualidad la tendencia es la aplicación de modelos no compartimentales, con el propósito de establecer parámetros cinéticos robustos de utilidad clínica que pueden aplicarse en cualquier vía de administración (Houin, 1990; Modric, 2014). El término “modelo no compartimental”, puede dar lugar a confusiones, ya que en realidad, cuando se determinan concentraciones plasmáticas, se asume que la dosis del fármaco administrado se encuentra disuelta en un volumen aparente, lo que da origen a las concentraciones plasmáticas, asumiendo entonces que al menos un compartimiento está siendo operativo; convendría entonces ser más objetivo en la definición y hablar de análisis modelo independiente. Si bien para el análisis farmacocinético modelo independiente, se necesita asumir que la farmacocinética de la droga es lineal dentro del margen de concentraciones plasmáticas observadas, este tipo de análisis presenta como principal ventaja que se trabaja con los datos experimentales observados y no con los valores estimados (Riviere, 2011).

El empleo de modelos matemáticos para cuantificar el curso en el tiempo de la absorción y disposición del fármaco en el organismo se describe en procesos fisiológicos claves que se desarrollan simultáneamente, tales como la absorción, distribución y eliminación (figura 6), descritas a continuación (Riviere, 2009; 2011):

a) Absorción

Corresponde al ingreso del fármaco desde su lugar de aplicación hasta el torrente sanguíneo. La absorción está influenciada por las características del fármaco, como la

liposolubilidad, el grado de ionización y las características del organismo, tales como las particularidades de las membranas celulares y el flujo sanguíneo regional (Baggot, 2002; Martín-Jiménez, 2015a).

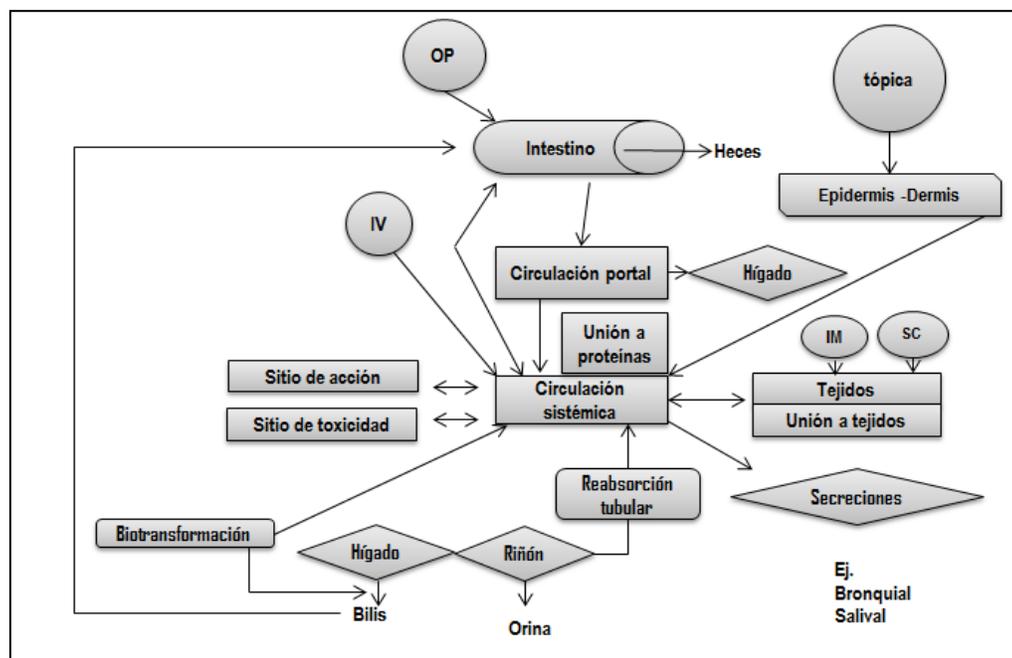


Figura 6. Esquema básico por el cual el fármaco es absorbido, distribuido, metabolizado y excretado del cuerpo. Estos procesos son los que forman la base para el desarrollo de modelos farmacocinéticos. (Riviere, 2009).

La absorción de los fármacos aplicados por vía oral está condicionada por las características del sistema digestivo, como el pH gastrointestinal, el riego sanguíneo, la tasa de vaciado gástrico, la motilidad intestinal, además de la biotransformación intestinal y/o hepática y de la presencia de transportadores gastrointestinales (Houin, 1990; Baggot, 2002; Martín-Jiménez, 2015a). Para estimar la cantidad de fármaco que ingresa a la circulación general y la velocidad de este ingreso se emplean parámetros farmacocinéticos tales como la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$), el tiempo al cual se alcanza dicha concentración ($T_{m\acute{a}x}$) y el área bajo la curva (ABC), representados en la figura 7.

La $C_{m\acute{a}x}$ y el $T_{m\acute{a}x}$ no reflejan realmente las características de absorción de un fármaco, pero sí su capacidad para alcanzar la circulación sistémica; resultan del equilibrio dinámico establecido entre los diferentes procesos cinéticos que regulan la disposición del fármaco en el organismo, según la dosis administrada y la relación entre las constantes de

velocidad de absorción (K_a) y de eliminación (K_e) (Baggot, 2002; Toutain y Bousquet-Mélou, 2004a).

Cuando se aplica una dosis constante en el tiempo, estas concentraciones se incrementan progresivamente en el transcurso del tratamiento hasta alcanzar un estado estacionario, las cuales se mantienen si no se modifican las pautas de dosificación. Cuando este perfil varía, es la principal causa de los cambios en la respuesta a un tratamiento farmacológico que transita desde la ineficacia a la toxicidad severa (Martín-Jiménez, 2015a)

El parámetro área bajo la curva integra la sumatoria de todas las posibles infinitas concentraciones plasmáticas, pero sólo se puede disponer de un número limitado de concentraciones, por lo tanto el parámetro se calcula con el método trapezoidal que consiste en la unión por rectas de las concentraciones encontradas y estas rectas estarían formadas por infinitas concentraciones estimadas (Baggot, 2002; Lees y Toutain, 2012; Martín-Jiménez, 2015a). La proyección imaginaria de una recta desde cada concentración experimental a la abscisa (tiempo) divide el área que se halla por debajo de la curva en una sumatoria de trapecios que equivalen a las ABC parciales. El procedimiento algebraico para integrar las concentraciones estimadas es equivalente al cálculo de un área de superficie (ABC parcial), y la suma de las ABC parciales da lugar al ABC total (Baggot, 2002).

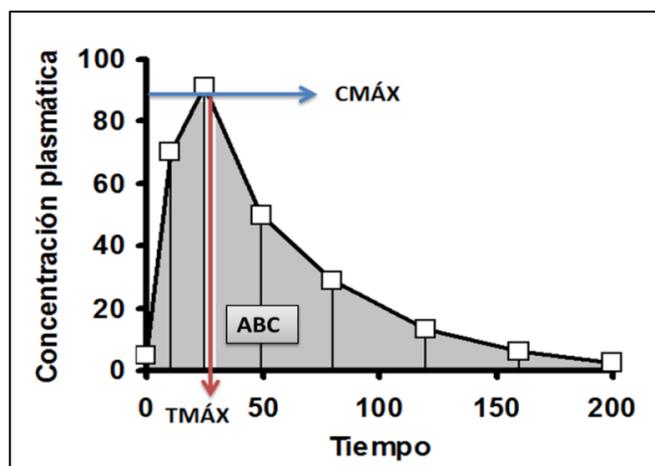


Figura 7. Representación gráfica de los parámetros cinéticos $C_{máx}$, $T_{máx}$ y ABC.

Cuando los fármacos son administrados por otras vías diferentes a la intravenosa, se determina la vida media de absorción ($t^{1/2}_{abs}$) (Baggot, 2002), que corresponde al tiempo que demanda la absorción del 50% del fármaco, y se establece con la constante de velocidad de absorción (K_a), a partir de la siguiente ecuación (7):

$$t^{1/2}_{abs} = \ln 2 / k_a \quad (7)$$

Además la velocidad de absorción de un fármaco se determina por la pendiente en relación entre el logaritmo de la cantidad de fármaco absorbido y el tiempo. En la absorción, la mayoría de los fármacos presentan un comportamiento farmacocinético de orden 1, donde la velocidad de absorción es proporcional a la concentración del fármaco, y el proceso es lineal. Por el contrario, cuando existe una saturación de los mecanismos de absorción el comportamiento farmacocinético se traspa a una cinética de orden 0, donde la velocidad de absorción es independiente de la concentración (Modric, 2014).

La biodisponibilidad (F) describe la extensión y la tasa de absorción del fármaco inalterado desde su sitio de aplicación. Cuando el fármaco se administra por vía intravenosa el valor de F es del 100%, mientras que por vía oral la tasa de absorción está condicionada por los eventos que disminuyen su exposición sistémica, inclusive el metabolismo pre-sistémico (Baggot, 2002; Lees y Toutain, 2012); la ecuación para determinarla es la siguiente (8):

$$F\% = \frac{ABC_{oral}}{ABC_{iv}} * 100 \quad (8)$$

Cuando la dosis intravenosa es distinta de la dosis extravascular, o las constantes de eliminación (β) son diferentes, la fórmula debe corregirse introduciendo los valores correspondientes en la siguiente ecuación (9):

$$F = \frac{ABC_{EV} * D_{IV} * \beta_{IV}}{ABC_{EV} * D_{EV} * \beta_{EV}} \quad (9)$$

b) Distribución

Es el proceso mediante el cual el fármaco se incorpora desde la circulación sanguínea a los diferentes tejidos. La transferencia se produce por procesos a favor de gradiente y depende de propiedades fisicoquímicas del fármaco (peso molecular, coeficiente de partición, pKa), de la unión a proteínas plasmáticas o tisulares, ya que la proporción del fármaco que permanece libre en el plasma difunde a los espacios extravasculares (Beltrán, 2004; Lees y Toutain, 2012; Modric, 2014).

El volumen aparente de distribución (Vd) es un parámetro matemático utilizado para caracterizar la distribución, el cual expresa la extensión de la distribución, sin un verdadero significado fisiológico en términos de espacio real puesto que refiere al tamaño de un compartimiento hipotético requerido para contener la cantidad de fármaco existente en el organismo si éste presentara igual concentración que en el plasma (Toutain y Bousquet-Melou, 2004b; Riviere, 2011).

El parámetro Vd se expresa en L/kg de peso corporal, y tal como se mencionó anteriormente, constituye sólo una estimación sobre el grado de distribución, sin revelar el patrón de distribución que únicamente se describe midiendo su nivel en distintos órganos y tejidos (Baggot, 2002), finalmente implica un factor de proporcionalidad que relaciona la dosis total suministrada con la concentración sanguínea o plasmática. Se estima el volumen teórico en el que el fármaco se ha distribuido, con la relación entre dosis (D) y la concentración del fármaco en el tiempo cero (C₀), representado en la siguiente ecuación (10):

$$Vd = \frac{D}{C_0} \quad (10)$$

El término Vd puede expresarse como Vdc, Vd_{área} y Vd_{ss}. El volumen de distribución del compartimento central (Vdc), refleja el volumen de este compartimento, antes de que haya tenido lugar cualquier distribución, y relaciona la concentración del fármaco en el tiempo 0.

El volumen aparente de distribución o Vd_{área}, se basa en el ABC total, relacionando la concentración plasmática con la cantidad del fármaco en el cuerpo en todo momento después de alcanzar el equilibrio de distribución y después de la aplicación de una dosis única o múltiple; se calcula con la siguiente ecuación, donde β es la pendiente de la porción terminal de la curva de concentración plasmática-tiempo (representada como un logaritmo natural de concentración en función del tiempo), se calcula con la siguiente ecuación:

$$V_{d\text{area}} = \frac{\text{Dosis} * F}{ABC * \beta} \quad (11)$$

El volumen de distribución en estado estacionario (Vd_{ss}), proporciona la estimación de distribución independiente de los procesos de eliminación del fármaco. Este se alcanza cuando la concentración libre del fármaco es igual a la de los tejidos, siendo una medida utilizada para una infusión continua intravenosa, cuando la tasa de eliminación es igual a la de distribución. Se utiliza para su cálculo el área bajo la curva en el momento (ABCM), que es la integral de la curva que representa el producto de la concentración y el tiempo en el momento que se observó la concentración. La ecuación (12), utilizada para el cálculo de Vd_{ss} es la siguiente:

$$V_{d\text{ss}} = \frac{\text{Dosis} * F * \text{ABCM}}{ABC^2} \quad (12)$$

Otro de los parámetros empleados para caracterizar la distribución es la vida media de distribución ($t_{1/2\alpha}$), que se calcula con la constante aparente de distribución (α) y la ecuación es (13):

$$t_{1/2\alpha} = \ln 2 / \alpha$$

(13)

Los parámetros de distribución son de importancia farmacológica en el ingreso y la acumulación del fármaco en los órganos, por lo que cobran importancia en la depleción del fármaco y por ende en la presencia de residuos en animales de consumo (Modric, 2014).

c) **Eliminación**

La concentración activa del fármaco en el organismo disminuye como consecuencia de dos mecanismos: la metabolización y la excreción. Los fármacos liposolubles, aunque se filtren por el riñón, se reabsorben y deben biotransformarse a metabolitos más polares. Estos metabolitos, junto con los fármacos hidrosolubles, se excretan principalmente por el riñón y la bilis (Martín-Jiménez 2015b; Modric, 2014).

El metabolismo comprende los cambios bioquímicos verificados en el organismo mediante los cuales las sustancias extrañas se convierten en otras más ionizadas, más polares, más hidrosolubles, menos difusibles y más fáciles de eliminar que la sustancia original (Aerts *et al.*, 1995). La disposición hepática desempeña un rol importante en el metabolismo y eliminación de los xenobióticos y puede afectar la biodisponibilidad de un fármaco.

Los procesos metabólicos hepáticos tradicionalmente comprenden reacciones de Fase I y Fase II; sin embargo, recientemente se han incluido las reacciones de Fase III (Coleman, 2007; Modric, 2014). La Fase I incluye principalmente las reacciones oxidativas del citocromo P450 (CYP450) así como las reacciones de reducción e hidrólisis: en general, estas reacciones implican la introducción de grupos funcionales al fármaco, lo que puede conducir a la formación de metabolitos activos y / o tóxicos (Modric, 2014). En los procesos de Fase II, que incluye reacciones de glucuronidación / glucosidación, sulfonación, metilación y acetilación, las enzimas hepáticas conjugan azúcares endógenos solubles en agua, sales o aminoácidos con xenobióticos. Los conjugados también pueden secretarse de nuevo en los intestinos, donde las bacterias desconjugan el fármaco, lo que permite la reabsorción de la molécula original (Modric, 2014).

En muchos casos, los procesos de Fase I ocurren primero, seguidos de reacciones conjugativas; sin embargo, se debe tener en cuenta que aunque esta secuencia ocurre a menudo, la conjugación también puede ocurrir directamente sin una "preparación" previa de la Fase I (Coleman, 2007). Finalmente, el metabolismo de Fase III implica un procesamiento adicional de los conjugados, incluyó el sistema de bombas de eflujo que excluyen los productos del metabolismo hidrosoluble de las células, la sangre y, en última instancia, el organismo (Modric, 2014).

La principal ruta de excreción de fármacos y sus metabolitos es la renal. El fármaco libre en plasma, es decir aquel no unido a proteínas, alcanza la luz tubular por filtración glomerular, y en el caso de bases y ácidos débiles por secreción tubular. La cantidad final de fármaco eliminado en la orina está gobernada por el grado de reabsorción tubular que acontece en la nefrona distal. Esto se ve afectado por factores tales como la concentración de orina, el pH urinario y pK del fármaco (Baggot, 2002).

La cinética de eliminación cuantifica la velocidad con que los fármacos se eliminan del organismo y se expresa mediante dos constantes farmacocinéticas: el aclaramiento y la constante de eliminación. Generalmente, ocurre una eliminación de primer orden cuando una proporción constante de la dosis se depura por unidad de tiempo. La tasa de eliminación es constante (k_e), pero la velocidad real del proceso varía en proporción directa a la dosis, por lo tanto la concentración (C) en cualquier momento (t) después de una sola dosis intravenosa administrada se puede calcular con la siguiente ecuación (14):

$$C_t = \frac{\text{Dosis}}{V_d} * e^{-k_e t} \tag{14}$$

donde e es la base del logaritmo natural ($e = 2,713$), y la constante de eliminación (k_e) está representada por la relación de separación respecto al volumen de distribución y se expresa usualmente en unidades de $1/h$, la cual se calcula con la siguiente fórmula (15):

$$k_e = \frac{Cl_t}{V_d}$$

(15)

La eliminación se expresa mediante el aclaramiento o clearance total (Cl_t), permanece constante para cada fármaco y expresando el volumen de plasma depurado del fármaco por unidad de tiempo. Este parámetro cinético evalúa la eliminación aun cuando no indica el tiempo que demora un fármaco en eliminarse del organismo (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004c).

El Cl_t se calcula como la relación entre la dosis administrada por vía intravascular (D_{IV}) y el ABC resultante (ABC_{IV}) (Patel y Kirkpatrick, 2011), expuesta en la siguiente ecuación (16):

$$Cl_t = \frac{D_{IV}}{ABC_{IV}}$$

(16)

El aclaramiento corporal total (Cl_t) se expresa como volumen de sangre o plasma que es depurado del fármaco por unidad de tiempo por kg de peso vivo (volumen/tiempo x peso). El Cl_t es la suma de todos los aclaramientos parciales, aclaramiento hepático (Cl_H), aclaramiento renal (Cl_R) y otros aclaramientos, presenta en la siguiente ecuación (17):

$$Cl_t = Cl_H + Cl_R + Cl_{otros}$$

(17)

Otro parámetro cinético relevante es la semivida de eliminación (t_{1/2β}), que refiere al tiempo requerido para que cualquier concentración medida en la fase de eliminación de la curva de disposición decline hasta la mitad. El t_{1/2β} permite valorar la permanencia del fármaco en el organismo (Toutain y Bousquet-Mélou 2004d), y se establece con la constante o velocidad de eliminación (K_{el} o β) con la siguiente ecuación (18):

$$t^{1/2}\beta = \ln 2/\beta$$

(18)

También se puede obtener a través de la ecuación (19), que involucra dependencia de la constante de velocidad de eliminación y así como del Clt y el Vd. Se puede calcular como:

$$t^{1/2}\beta = \frac{0.693}{Clt/Vd}$$

(19)

El concepto de semivida es práctico porque nos permite tener una idea concreta de la magnitud de la velocidad con que el medicamento es eliminado del organismo. También se utiliza para estimar los intervalos entre administraciones o los periodos de carencia para la eliminación de residuos en tejidos comestibles de animales, debido que refleja la extensión de la distribución de la droga y la velocidad de depuración, a pesar que para determinar el periodo de carencia generalmente se utilizan la determinación de este parámetro en el tejido de estudio. Además, diversos factores pueden influir en el Clt y el Vd, y por ende afectar la vida media del fármaco lo cual trae como resultado un impacto en la eliminación, por lo tanto si la vida media se duplica, lo mismo acontece con el periodo de agotamiento del fármaco (Modric, 2014).

En lugar de determinar las constantes de velocidad o semividas, se pueden describir procesos en términos de momentos estadísticos; el más utilizado es el tiempo medio de residencia (TMR). Estos se basan en los datos de concentración plasmática y se determinan calculando áreas bajo curvas de concentración versus tiempo, este representa el tiempo medio que un fármaco reside 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 variar con la vía de administración, y generalmente es el tiempo que transcurre para que se elimine el 63,2 % del fármaco luego de la administración (Baggot, 2002; Riviere, 2009). Se calcula con el ABC, y el ABCM (área bajo la curva en el primer momento de la curva y el tiempo versus el tiempo de cero a infinito) representado en la siguiente ecuación (20):

$$TMR = \frac{ABCM}{ABC}$$

(20)

En la actualidad existen programas informáticos que grafican los datos en curvas y efectúan los cálculos de los parámetros farmacocinéticos utilizando fórmulas ya establecidas, tal el caso del programa farmacocinético no compartimental PK Solution (Farrier, 1999).

El programa farmacocinético no compartimental PK Solution, permite estimar parámetros farmacocinéticos a través del área bajo la curva (ABC), asociada a las concentraciones y tiempo. Por ende, emplea la regla trapezoidal clásica que se utiliza para el cálculo de ABC; aplica también el método de los residuos, donde divide la curva en una serie de tres términos exponenciales correspondientes a las fases de absorción, distribución y eliminación del fármaco en el organismo, estos términos exponenciales, se utilizan para calcular los diversos parámetros farmacocinéticos, de dosis únicas o múltiples. Este programa, responde a la fase de eliminación de la curva de disposición del fármaco, con un modelo de primer orden, lo que se evidencia en la porción terminal de la gráfica semi-logarítmica (Santosh, 2010).

Los parámetros cinéticos obtenidos en el programa son: concentración a tiempo cero (C_0), $C_{máx}$, $T_{máx}$, ABC, volumen inicial del compartimiento central (V_c), V_d área basada en el ABC y V_d área basado en el peso del animal, V_{ss} , semividas y constantes de velocidades de las distintas fases, TMR y biodisponibilidad (F) (Santosh, 2010).

Algunos parámetros en los modelos no compartimentales, modifican su ecuación para calcularlos, entre ellos el clearance sistémico (Cl_t) y el volumen de distribución de área, expresados en las siguientes ecuaciones (21) y (22):

$$Cl_t = F \frac{D}{ABC}$$

(21)

$$VD_{\text{área}} = F \frac{D}{ABC * \beta}$$

(22)

Finalmente, la determinación e interpretación correcta de los parámetros farmacocinéticos, permite tomar decisiones terapéuticas racionales en animales de consumo incluyendo a los pollos parrilleros (figura. 8), es por ello que la farmacocinética aporta elementos para proporcionar una terapia antimicrobiana eficaz, ya que determina las dosis necesarias para llegar a las concentraciones adecuadas a los distintos tejidos diana para las diferentes bacterias patógenas en aves, además proporciona los fundamentos conceptuales para prevenir residuos de fármacos en los tejidos comestibles y/o la inducción de resistencias bacterianas (Lees y Toutain, 2012; Baynes y Riviere, 2014).

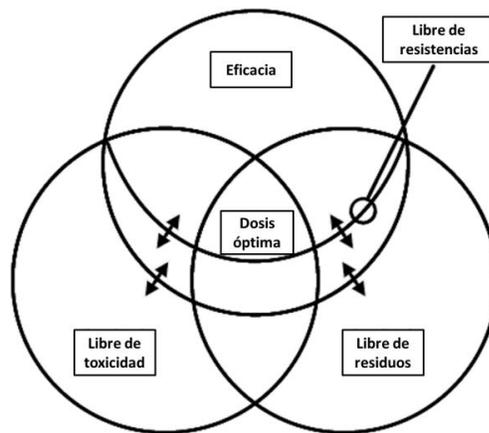


Figura 8. Ilustración del dilema del veterinario, en animales productores de alimentos en la optimización de la dosis terapéutica en un fármaco (Riviere, 2011).

4.2.1.2 Características anatómo-fisiológicas de las aves

Cada especie animal posee características anatómicas y fisiológicas particulares que hacen diferir el comportamiento cinético de los fármacos con influencia notable en los patrones de distribución. Estas diferencias, también se encuentran presentes en los pollos parrilleros, fundamentales de conocer para el uso racional de las herramientas terapéuticas

(Vermeulen *et. al*, 2002; Toutain *et. al*, 2010), siendo dos procesos farmacocinéticos los que presentan mayores particularidades:

1) La absorción oral de fármacos

Por un lado las aves carecen de labios y dientes, siendo incapaces de moler el alimento, tampoco poseen paladar blando y no se observa una distinción clara entre la faringe y la boca (orofaringe), aunque disponen de glándulas salivales desarrolladas en el techo y suelo de la boca, con reducida secreción de amilasa (Denbow, 2000; Lorenzoni, 2010). En el esófago aviar se encuentra un divertículo vertical, en la porción cervical del esófago llamado buche, este posee un pH de 4,5 en pollos y actúa como acumulador de alimento, aunque la absorción allí es mínima, su influencia en la disposición temporal de un fármaco es importante (Lorenzoni, 2010; Landoni y Albarellos, 2015). El periodo de retención de alimentos en el buche oscila entre 3 y 20 horas; en general, los alimentos secos persisten mayor tiempo que los húmedos, ya que éste se encarga de humedecerlos (Vermeulen *et. al*, 2002). Además, el buche es rico en microflora bacteriana, particularmente *Lactobacillus* spp, que interfieren en la absorción de algunos antimicrobianos, tales como los macrólidos (Hilmi *et. al*, 2007).

El estómago de las aves está conformado por el proventrículo o *pars glandularis*, responsable de la secreción ácida y por la molleja o *pars muscularis*, que participa en la digestión mecánica y la proteólisis gástrica. El pH del proventrículo y molleja es próximo a 4 y 2,5, respectivamente, y el tiempo de retención media del alimento en el estómago es de 40-71 minutos (Van Der Klis *et. al*, 1990; Lorenzoni, 2010; Svihus, 2011; Landoni y Albarellos, 2015).

Similar a los mamíferos, el jugo pancreático de pH alcalino, neutraliza el contenido ácido alimentario que recibe de la molleja previo a su paso a segmentos intestinales posteriores (Toutain *et. al*, 2010). El intestino no posee cambios histológicos en cada una de sus porciones, pero si presenta alteraciones del pH; es cercano a 6 en íleon y yeyuno (Landoni y Albarellos, 2015).

En pollos adultos, el intestino posee una alta cantidad de flora intestinal, que tiene la capacidad para metabolizar ciertos antimicrobianos (Lorenzoni, 2017; Landoni y Albarellos, 2015). En los enterocitos aviares abundan las enzimas citocromo P-450, especialmente

CYP3A, con capacidad para metabolizar algunos fármacos antimicrobianos como macrólidos y lincosamidas y afectar la biodisponibilidad sistémica (Antonovic y Martínez, 2011). Además, Guo y colaboradores (2013), informaron que la expresión de bombas de eflujo (P-glicoproteína), en los enterocitos depende de la edad del ave. Estas bombas de eflujo, en la zona apical del intestino pueden interferir en la absorción de algunos agentes antimicrobianos tales como fluoroquinolonas, oxitetraciclina, doxiciclina y en menor grado, macrólidos, cuando se administran por vía oral (Haritova *et. al*, 2010). Por otra parte, la porción distal del tracto digestivo presenta limitado desarrollo en relación con otras especies (Toutain *et. al*, 2010).

2) Eliminación de fármacos en pollos parrilleros

Como en los mamíferos, la eliminación de los fármacos comprende la combinación de la biotransformación hepática y la excreción renal, como se describió anteriormente. El citocromo es la superfamilia enzimática más involucrada en el proceso de biotransformación (Nelson, 2009). En el caso de las reacciones de fase II, las aves de corral utilizan principalmente a la ornitina para la conjugación, mientras que en los mamíferos la reacción de glucuronidación es más importante (Vermeulen *et. al*, 2002).

En aves el proceso de excreción renal exhibe diferencias anatómo-funcionales respecto a los mamíferos; las nefronas aviares se asemejan a las de reptiles debido que sólo el 20-30% poseen asa de Henle, y solo el 50% del flujo sanguíneo renal puede derivar del flujo arterial y el resto del sistema portal renal (Toutain *et. al*, 2010; Landoni y Albarellos, 2015). La sangre de la vena ilíaca externa ofrece la particularidad que puede fluir directamente en la vena cava cuando la válvula del sistema porta y renal está abierta, o en contraste, puede ser forzada a ingresar en la vena porta renal cuando la válvula está cerrada. Este mecanismo de paso es inexistente en los mamíferos. Como resultado, se elimina una gran cantidad de fármaco directa y rápidamente a través del riñón de las aves (Vermeulen *et. al*, 2002). Además, la filtración glomerular no es constante en las aves y las variaciones en la presión de perfusión puede tener gran impacto en la farmacocinética del compuesto (Toutain *et. al*, 2010; Landoni y Albarellos, 2015).

La reabsorción tubular parece muy poco probable o incluso ausente en las aves. Por lo tanto, las sustancias polares tales como los aminoglucósidos, que se excretan totalmente sin cambios, muestran poca diferencia en la tasa de excreción y la semivida de eliminación entre las aves y las especies de mamíferos, en contraste con las amplias variaciones interespecíficas que normalmente se reportan para fármacos muy metabolizados (Vermeulen *et. al*, 2002).

Debido a lo expuesto anteriormente, es importante tener en cuenta todas las particularidades anatómicas y fisiológicas que influyen directamente en la absorción, metabolización y eliminación fármacos, principalmente al momento de administrar antibióticos en las producciones avícolas, ya que influyen en el uso racional y correcto, de estas herramientas terapéuticas.

4.2.2 Fluoroquinolonas

Como se nombro en el capítulo anterior, se describió que una de las familias de antimicrobianos de mayor uso en la avicultura son las fluoroquinolonas. Estas poseen una estructura básica que consiste en un núcleo aromático heterocíclico, un grupo ácido carboxílico y un grupo cetona en posición para el nitrógeno heterocíclico. En la década del ochenta, con la introducción de un átomo de flúor en el núcleo básico de la molécula en posición C₆ y un sustituyente piperazínico o pirrolidínico en posición C₇, se dio origen a las fluoroquinolonas (Marin Carrillo, 2008; Díaz David, 2012; Giguère y Dowling, 2013), quienes constituyen una de las familias de antimicrobianos de mayor expansión en Medicina Veterinaria. Las modificaciones introducidas en el núcleo básico son determinantes en la actividad biológica e influyen en las características farmacocinéticas de las distintas moléculas (figura 9) (Díaz David, 2012; Gouvêa *et. al*, 2015).

Las fluoroquinolonas desempeñan acciones bactericidas. Inhiben la actividad catalítica de la ADN girasa (Topoisomerasa II) y la Topoisomerasa IV, esenciales para la replicación y transcripción de ADN bacteriano (Sharma *et. al*, 2009). Estas enzimas catalizan reacciones en la bacteria que permiten el superenrollamiento, relajación, separación y su reintegración del ADN durante los procesos de transcripción y traducción (Gouvêa *et. al*, 2015). Estas sustancias desarrollan actividad contra la mayoría de las bacterias gram negativas y

especialmente contra enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., y *Enterobacter* spp) (Marin Carrillo, 2008; Giguère y Dowling, 2013). Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y las bacterias gram positivas ofrecen susceptibilidad variable. Por ejemplo, cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius* y otros *Staphylococcus* suelen ser muy susceptibles, pero los valores de CMI (concentración mínima inhibitoria) son mayores que las necesarias para gram negativos y micoplasmas (Papich y Riviere, 2009; Díaz David, 2012; Giguère y Dowling, 2013).

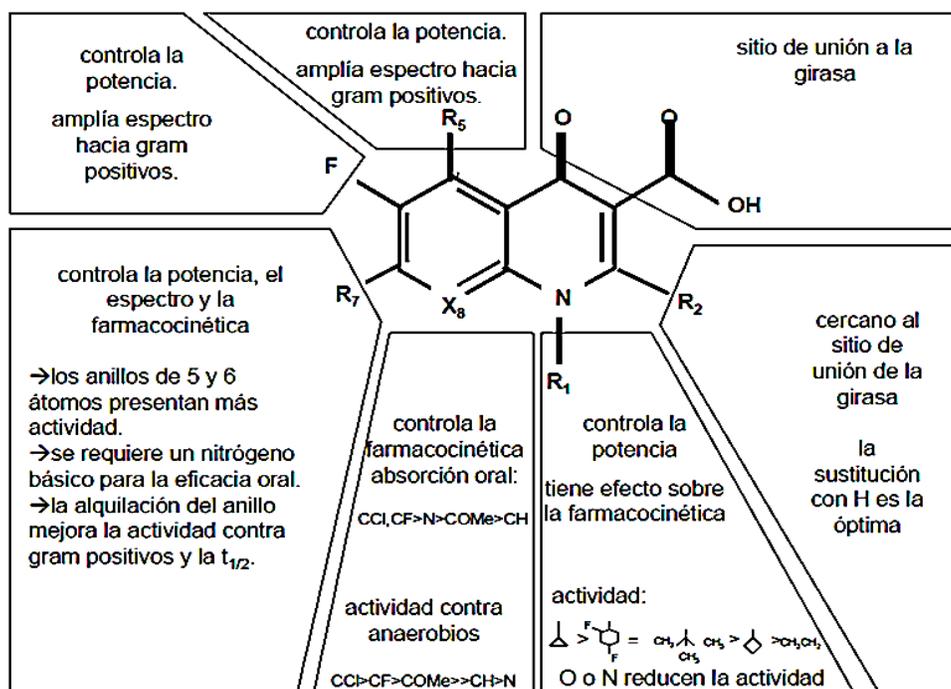


Figura 9. Modificaciones del núcleo básico de las quinolonas (Boswell y Wise, 1998; Diaz David, 2012).

Se agrupan en “generaciones” según la cantidad de átomos de flúor; las de segunda generación son monofluoradas como enrofloxacin, norfloxacin, danofloxacin y marbofloxacin, siendo utilizadas principalmente en Medicina Veterinaria, en tanto las fluoroquinolonas de tercera generación son multifuoradas, tal es el caso de levofloxacin y generalmente se aplican en humanos para el tratamiento de patógenos multi-resistentes (Martínez *et. al*, 2006; Escudero y Marín Carrillo, 2015). También se clasifican según su actividad biológica, es decir según sus espectros y propiedades farmacocinéticas. Las quinolonas sin la adición del átomo flúor tienen biodisponibilidad oral pobre y limitada

distribución tisular, además de un espectro limitado a gérmenes gram negativos (Martínez *et. al*, 2006; Giguère y Dowling, 2013).

Los agentes de segunda generación se caracterizan por su mayor espectro bacteriano, las bacterias gram negativas, incluyendo enterobacterias, algunos cocos gram positivos y micoplasmas son susceptibles, y brindan ventajas cinéticas: mejora la biodisponibilidad oral y la distribución tisular, se consiguen altos niveles terapéuticos en pulmón, hígado y huesos (Martínez *et. al*, 2006; Escudero y Marín Carrillo, 2015). La primera fluoroquinolona de segunda generación fue enrofloxacin, introducida en la década de 1980, fue la primera aprobada para uso en Medicina Veterinaria (Martínez *et. al*, 2006; Díaz David, 2012). Mientras que las fluoroquinolonas de tercera generación, mantienen las propiedades cinéticas de la segunda generación, pero son de amplio espectro y causan menor toxicidad y generalmente son herramientas terapéuticas reservadas para aplicación en humanos (Martínez *et. al*, 2006; Díaz David, 2012).

Y la última clasificación, es la que tiene en cuenta su estructura química, agrupandolas de acuerdo a su núcleo básico en naftiridinas (ácido nalidíxico, enoxacina), cinolinas (cinoxacina), pirido-pirimidinas (ácidos pipemidínico y piromídico) y quinolonas (flumequina, ácido oxolínico y las fluoroquinolonas) (Díaz David, 2012; Escudero y Marín Carrillo, 2015).

Además, es de conocimiento que un antibacteriano es clínicamente efectivo cuando obtiene concentraciones superiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI) del microorganismo que se pretende combatir en el sitio de infección (Beltrán, 2004; Lees *et. al*, 2008). Estudios experimentales y clínicos avalan la integración de parámetros farmacocinéticos - farmacodinámicos o PK-PD, con el propósito de maximizar la eficacia antimicrobiana (McKinnon y Davis, 2004). En este contexto las fluoroquinolonas ejercen actividad concentración dependiente. El parámetro predictor de respuesta antimicrobiana y de éxito clínico es el cociente entre la concentración máxima en suero ($C_{m\acute{a}x}$) y la concentración mínima inhibitoria. El cociente $C_{m\acute{a}x}/CMI$ debe ser ≥ 10 para lograr máxima eficacia clínica e inducir la menor selección de resistencia (Čonkova *et. al*, 2009; Giguère y Dowling, 2013). Otro parámetro predictor adoptado para las fluoroquinolonas es el cociente del área bajo la curva de la concentración sérica-tiempo y la CMI (ABC/CMI), que debe ser ≥ 125 (Lees y Shojaee AliAbadi, 2002).

Poseen un efecto post-antibiótico prolongado, donde Lecoecur Bitchatchi y Kolf Clauw, (1998), observaron *in vitro* un efecto inhibitor sobre bacterias durante 3 a 5 horas luego que la concentración del antibiótico descendiera por debajo de la CMI. Este efecto post-antibiótico, que favorecería la aplicación con intervalos entre dosis más prolongados, se observó en bacterias gram negativas y en menor medida en gram positivas, siendo una particularidad beneficiosa para este grupo de fármacos, en su utilización en la avicultura.

Las fluoroquinolonas son liposolubles, admiten la aplicación parenteral y poseen alta biodisponibilidad oral respecto otros grupos de antibióticos. La absorción por el tracto gastrointestinal puede ser afectada por la presencia de iones bivalentes de origen alimentario o por la administración simultánea de fármacos que contienen Al, Mg, Ca, Fe y Zn debido a la formación de quelatos insolubles (Čonkova *et. al*, 2009). Además, exhiben rápida y extensa distribución tisular ($V_d = 1-5$ L/kg), por su naturaleza lipófila, bajo grado de ionización y limitada unión a proteínas plasmáticas ($\leq 45\%$) (Papich y Riviere, 2009; Escudero y Marín Carrillo, 2015). Estos fármacos ingresan a una variedad de tejidos, entre ellos pulmones, hueso, próstata, cartílago, hasta humor acuoso, donde alcanzan concentraciones 2 a 3 veces mayores que las plasmáticas (Papich y Riviere 2009; Čonkova *et. al*, 2009; Escudero y Marín Carrillo, 2015).

Según la especie animal, los valores de $t_{1/2\beta}$ o semivida de eliminación oscilan entre 2 a 4 horas. Son parcialmente metabolizadas en el hígado según la fluoroquinolona y la especie animal, generalmente por hidroxilación y oxidación, dando origen a las oxoquinolonas, que luego son conjugadas en la fase II con ácido glucurónico. La excreción es biliar y renal, la mayoría de los compuestos en forma activa (Papich y Riviere 2009; Escudero y Marín Carrillo 2015).

Las fluoroquinolonas exhiben amplio margen de seguridad en mamíferos y aves; en el hombre solo se describen reacciones adversas como mareos, cefaleas, náuseas y vómitos y como efecto nocivo relevante la erosión de cartílagos en individuos en crecimiento (Martínez *et. al*, 2006; Gupta *et. al*, 2012; Giguère y Dowling, 2013). La artropatía afecta especialmente a las articulaciones que soportan peso. Aunque sólo fue documentada en caninos, la toxicidad fue extrapolada a humanos y por este motivo no se administran en sujetos inmaduros o mujeres gestantes (Rosanova *et. al*, 2010).

Las principales fluoroquinolonas con formulaciones para aplicación en el agua de bebida para pollos hoy en día son danofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacino, sarafloxacin, norfloxacina y nicotinato de norfloxacina, y actualmente se incorporo levofloxacin en Perú y países asiáticos, mientras que marbofloxacina es un herramienta terapeutica relativamente nueva que esta autorizada su uso en mascotas y animales productivos, tales como cerdos y bovinos.

4.2.2.1 Antecedentes farmacocinéticos de fluoroquinolonas en pollos parrilleros

Dentro las fluoroquinolonas de segunda generación formuladas para pollos parrilleros, se han realizados estudios que determinan luego de la aplicación oral una absorción inmediata (Anadón *et. al*, 1993; Anjum y Rizvi, 1998). Por ejemplo danofloxacin exhibe $t_{1/2abs}$ de 0,48 horas (Errecalde *et. al*, 2017), norfloxacina de 0,9 horas (Laczay *et. al*, 1998) y enrofloxacin de 1,4 horas, (Anadón *et. al*, 1995) y donde difiere la magnitud de la absorción según el compuesto (Anadón *et. al*, 1993; Chen *et. al*, 1994; Lees y Shojaee AliAbadi, 2002), posiblemente por diferencias relativas al transporte activo (Haritova y Lashev, 2009) y en algunos casos, la absorción puede ser afectada por la presencia de cationes bivalentes de origen alimentario (Lees y Shojaee AliAbadi, 2002; Hofacre, 2013). Mientras que la absorción de difloxacin y norfloxacina fue ligeramente superior al 50 % (Anadón *et. al*, 2011; Ding *et. al*, 2008); en tanto que enrofloxacin y ciprofloxacina oscila entre el 64 y 89 % , lo cual difiere según el estudio (Anadón *et. al*, 1995; Anadón *et. al*, 2001; Bugyei *et. al*, 1999; Knoll *et. al*, 1999), siendo prácticamente completa para danofloxacin (Lynch *et. al*, 1994; Knoll *et. al*, 1999; Haritova *et. al*, 2006) y ofloxacin (Kalaiselvi *et. al*, 2006).

Luego de la aplicación endovenosa en pollos parrilleros, los antecedentes disponibles refieren rápida distribución desde el compartimento central para norfloxacina, ciprofloxacina, enrofloxacin y difloxacin, según las vidas medias de distribución ($t_{1/2\alpha}$) informadas que oscilan entre 0,14 y 0,69 horas (Anadón *et. al*, 1992; Anadón *et. al*, 2001; Bugyei *et. al*, 1999; Ding *et. al*, 2008). Estos compuestos se distribuyen extensamente en el organismo (Anjum y Rizvi, 1998; Lees y Shojaee AliAbadi, 2002), exhibiendo valores de volumen de distribución superiores a 1,5 L/kg en aves (Anadón *et. al*, 1993; Lees y Shojaee AliAbadi, 2002). Mientras

que se reportan valores de Vd de 1,7 L/kg con ofloxacin (Kalaiselvi *et. al*, 2006), 3,1 L/kg con difloxacin (Ding *et. al*, 2008), 3,4 L/kg con norfloxacin (Anad3n *et. al*, 1992), 4,3 con enrofloxacin L/kg (Anad3n *et. al*, 1995), 6,0 L/kg con ciprofloxacin (Anad3n *et. al*, 2001) y 13,7 L/kg con danofloxacin (Knoll *et. al*, 1999).

Con distintas fluoroquinolonas administradas por v3a oral se describen niveles tisulares m3s significativos que los plasm3ticos, tal el caso de danofloxacin (Knoll *et. al*, 1999; Errecalde *et. al*, 2017), enrofloxacin (Knoll *et. al*, 1999), norfloxacin (Anad3n *et. al*, 2002) y ciprofloxacin (Anad3n *et. al*, 2001). En general los niveles son muy importantes en h3gado o ri3n, pero suelen ser menos significativos en el tejido muscular; las concentraciones s3ricas de enrofloxacin fueron superiores (0,36 $\mu\text{g/ml}$) a las musculares (0,06 $\mu\text{g/mg}$), tejido en que se determin3 hasta 24 horas post-aplicaci3n (El-Aziz *et. al*, 1997).

La disposici3n tisular de las fluoroquinolonas es significativa desde el enfoque terap3utico, acorde la necesidad de obtener niveles que excedan la CMI en el sitio de infecci3n (Lees *et. al*, 2008), pero tambi3n se asocia con la magnitud de los residuos tisulares, que resultan de sus propiedades lipof3licas y es facilitada por la escasa uni3n a prote3nas plasm3ticas, estimada en animales dom3sticos en el 15 al 20% (Anad3n *et. al*, 1992; Papich y Riviere, 2009; Haritova y Lashev, 2009) y la permanencia en el organismo exhibi3 variaciones, se comunicaron $t_{1/2\beta}$ de entre 5,5 a 10,2 horas con enrofloxacin (Anad3n *et. al*, 1995; Knoll *et. al*, 1999), 6,1 horas con difloxacin (Ding *et.al.*, 2008), 6,7 horas con danofloxacin (Knoll *et. al*, 1999), 8,0 horas con norfloxacin (Anad3n *et. al*, 1992) y 8,8 horas con ciprofloxacin (Anad3n *et. al*, 2001). Mientras que los valores de TMR comunicados fueron de 8,7 horas para norfloxacin (Anad3n *et. al*, 1992) y 9,6 horas para enrofloxacin (Anad3n *et. al*, 1995).

Como se mencion3 anteriormente, la eliminaci3n de fluoroquinolonas se realiza por orina y de forma menos significativa, por bilis (Anjum y Rizvi, 1998). El Clt ofrece fluctuaciones importantes seg3n el agente (Haritova y Lashev, 2009); as3 se reportan valores de entre 3,0 a 4,8 ml/h/kg para enrofloxacin (Anad3n *et. al*, 1995; Bugyei *et. al*, 1999); 4,5 ml/h/kg para ofloxacin (Kalaiselvi *et. al*, 2006), 7,5 ml/h/kg para ciprofloxacin (Anad3n *et. al*, 2001) y 16,6 ml/h/kg para norfloxacin (Laczay *et. al*, 1998).

En general, luego de la aplicación oral la permanencia plasmática de fluoroquinolonas en pollos es moderada (Anadón *et. al.*, 1993); se informaron valores de $t_{1/2\beta}$ de 5,8 horas con enrofloxacin (Knoll *et. al.*, 1999) y ofloxacin (Kalaiselvi *et. al.*, 2006), 6,9 a 7,6 horas con danofloxacin (Knoll *et. al.*, 1999; Errecalde *et. al.*, 2017), 8,6 horas con difloxacin (Ding *et. al.*, 2008) y 11,8 horas con norfloxacin (Laczay *et. al.*, 1998) y ciprofloxacina (Anadón *et. al.*, 2001). Knoll y colaboradores (1999), adjudicaron un TMR de 7,5 y 8,6 horas a enrofloxacin y danofloxacin, respectivamente. Otros estudios, indicaron 8,8 horas con norfloxacin (Laczay *et. al.*, 1998) y 13,3 horas con ciprofloxacina (Anadón *et. al.*, 2001). Generalmente en la mayoría de las investigaciones referidas a las particularidades farmacocinéticas de estos fármacos se desarrollan en pollos clínicamente sanos y en condiciones productivas ideales.

Por otro lado, Soliman (2000) estudió el comportamiento farmacocinético de enrofloxacin con una dosis oral e intravenosa en pollos sanos e infectados con *E. coli*. Por aplicación endovenosa, en las aves enfermas se observó una reducción de las concentraciones plasmáticas y menor permanencia, según los valores obtenidos en animales sanos y enfermos en el $t_{1/2\beta}$ de 4,7 y 3,6 horas y el TMR de 6,7 y 4,9 horas, respectivamente. La vía oral determinó biodisponibilidad de 69,7 y 72,5%, en pollos sanos y enfermos, respectivamente. Al igual que Li y colaboradores (2017), investigaron la cinética de enrofloxacin luego de la aplicación oral durante 7 días en aves sanas e infectadas con *Salmonella typhimurium*. Estos autores determinaron un $C_{m\acute{a}x}$ de 1,8 $\mu\text{g/ml}$, un $T_{m\acute{a}x}$ de 1 hora, y una semivida de eliminación de 9,05 horas, mientras que en los animales enfermos comprobaron una mayor distribución tisular y menor semivida de eliminación, con un $C_{m\acute{a}x}$ de 2,1 $\mu\text{g/ml}$ a las 0,75 horas y un $t_{1/2\beta}$ de 8.8 horas.

4.2.2.2 Resistencias bacterianas a fluoroquinolonas

Uno de las desventajas de la utilización de estos antimicrobianos en animales productores de alimentos, es lo expuesto por diversas organizaciones internacionales, tales como la Organización mundial de la salud (OMS), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), y entidades reguladoras, donde expresan su preocupación con el desarrollo de resistencia en

microorganismos patógenos para los seres humanos y algunos que también afectan a los animales domésticos, incluidos los agentes zoonóticos, como *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp., en particular a algunos antimicrobianos, donde se encuentran incluidas las fluoroquinolonas (EMEA, 2006; Gouvêa *et. al.*, 2015).

En la mayoría de las especies bacterianas, la resistencia a las fluoroquinolonas deriva de mutaciones en los sitios dianas de acción de las fluoroquinolonas, en las enzimas ADN girasa y Topoisomerasa IV o por mutaciones que alteran la permeabilidad de la membrana externa, haciendo que el fármaco sea expulsado por transporte activo (Jacoby, 2005; Gouvêa *et. al.*, 2015). Por ejemplo *Campylobacter jejuni*, la cual es una bacteria encontrada en el tracto intestinal de las aves de corral y su resistencia a las quinolonas es causada principalmente por mutaciones individuales en ADN girasa (gen *gyrA*), y ocasionalmente, en Topoisomerasa IV (gen *gyrA*) (Gouvêa *et. al.*, 2015). También hay evidencias de resistencia por eflujo, con la consiguiente resistencia cruzada a varios agentes antimicrobianos (Gouvêa *et. al.*, 2015). Al ser un habitante habitual de la microflora intestinal del pollo, la higiene inadecuada de la carne puede diseminar estos microorganismos resistentes a los consumidores y causar problemas gastrointestinales en los mismos, por lo que las fluoroquinolonas ya no constituyen el tratamiento de elección de estas patologías en el hombre (Nelson *et. al.*, 2007).

Otro patógeno, que ha presentado cepa resistente es *Salmonella* spp. la cual puede desarrollar resistencia a fluoroquinolonas mediada por cromosomas y por plásmidos (PMRQ). La resistencia mediada por cromosomas ocurre bajo presión antimicrobiana para mutaciones específicas que originan sustituciones de aminoácidos dentro de ADN girasa y Topoisomerasa IV en las subunidades *gyrA*, *gyrB*, *parC* o *parE*, reducen la expresión de poros de la membrana externa o lipopolisacárido (LPS), o producen una manifestación exagerada de bombas de eflujo (Gouvêa *et. al.*, 2015).

A pesar de las limitaciones implementadas por las instituciones internacionales respecto al uso de marbofloxacin en animales de consumo, sobre todo en la Unión Europea, debido a las resistencias bacterianas observadas en otros miembros del grupo, Silva y Sousa (2017), recomiendan el uso de marbofloxacin en explotaciones porcinas en Europa, debido a su eliminación casi completa por orina, siempre que se utilice a las dosis recomendadas y se

respeten los periodos de carencia. Por su parte, El Garch y colaboradores (2017), consideran que marbofloxacin constituye una herramienta útil frente a las infecciones bacterianas que afectan a cerdos, con bajo índice de resistencia.

4.2.2.3 Marbofloxacin en aves

Marbofloxacin es un integrante de la segunda generaci3n de fluoroquinolonas sintetizada por Aoki y colaboradores en el a1o 1986 y desarrollada para uso exclusivo en Medicina Veterinaria en el a1o 1995 (Gupta *et. al*, 2012; Fern1ndez Palacios O'Connor, 2013; Papich, 2016). Esta sustancia comparte el modo de acci3n de fluoroquinolonas: desarrolla actividad bactericida concentraci3n dependiente sobre bacterias gramnegativas y gram positivas, incluyendo algunos pat3genos anaer3bicos. Su acci3n se estableci3 en presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus*, *Klebsiella* spp., *Mycoplasma* spp, *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp, y *Streptococcus* spp. (Spreng *et. al*, 1995; Papich, 2016). Siendo la f3rmula qu1mica de la marbofloxacin 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-6-1cido carbox1lico, su f3rmula molecular es C₁₇H₁₉FN₄O₄ y su peso molecular 362,4 g.mol⁻¹.

Marbofloxacin (figura 10), exhibe propiedades anf3teras, posee un punto isoel3ctrico de 6,85 que permite su solubilidad tanto en soluciones 1cidas como b1sicas (pKa= 5,7; pKb= 8). El car1cter 1cido d3bil es provisto por el 1cido carbox1lico en C₆, mientras el car1cter b1sico d3bil lo aporta el ciclo piperazina (Fern1ndez Palacios O'Connor, 2013), la cual experimenta m1nima ionizaci3n a pH fisiol3gico de 7,4, atributo que facilita la distribuci3n tisular (S3rgel y Kinzig, 1993). Adem1s la estructura qu1mica posee caracter1sticas superadoras respecto al conjunto de fluoroquinolonas; incorpora un 1tomo de fl3or en posici3n C₆, un anillo piperac1nico en C₁₀ y un 1tomo de ox1geno en posici3n 1 (anillo oxadiazinico), este anillo promueve el ingreso en la c3lula bacteriana, la interacci3n con la enzima ADN girasa y amplia el espectro hacia *Mycoplasma* spp y *Pseudomonas* spp. El grupo carboxilo permite la fijaci3n de la mol3cula sobre la ADN girasa. El 1tomo de fl3or incrementa la actividad antibacteriana y extiende el espectro hacia microorganismos gram positivos.

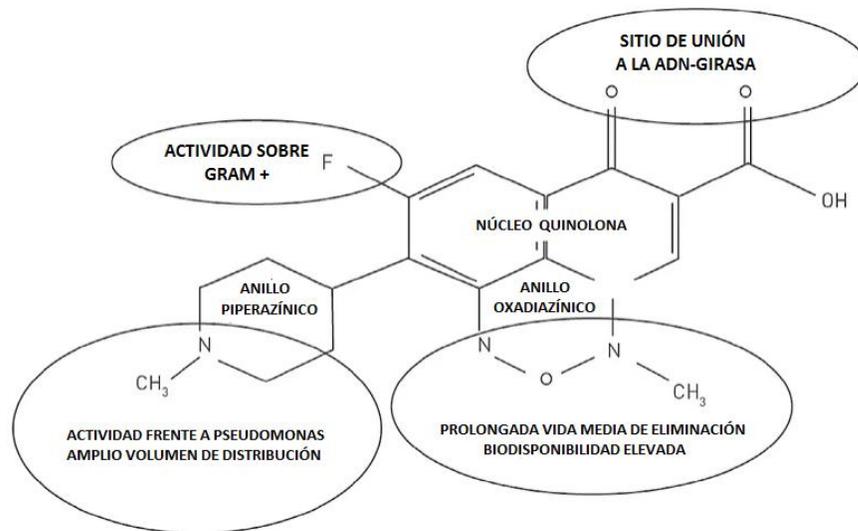


Figura 10. Estructura química de marbofloxacina

En cuanto a la cinética, el anillo piperacínico redunda en más liposolubilidad que le confiere también mayor distribución tisular (Fernández Palacios O'Connor, 2013). Se observa también un aumento en la semivida de eliminación (Rubio Langre, 2011) y una buena biodisponibilidad correspondido con la incorporación del anillo oxadiazínico (Marín Carrillo, 2008). En la práctica, estas características permiten la administración cada 24 horas manteniendo concentraciones por encima de la CMI durante más de 12 horas (Haritova *et. al*, 2006).

Marbofloxacina es un fármaco seguro: excepto las posibles anomalías observadas en cartílagos cuando se administra en de animales jóvenes, el perfil de efectos adversos se limita la mayoría de las veces, a la disfunción gastrointestinal, que comprende vómitos, náuseas, deposiciones blandas e hipersalivación. (Fernández Palacios O'Connor, 2013; Papich, 2016), el cual carece de actividad teratogénica y sólo después de posologías de dosis muy elevadas y reiteradas durante varias semanas se observó disminución testicular, oligospermia y atrofia tubular testicular (Rubio Langre, 2011), es por ello que tanto las características y el perfil de seguridad promueven el uso en animales domésticos, recomendado para patologías de infecciosas del aparato respiratorio, de las vías urinarias y de la piel (Fernández Palacios O'Connor, 2013; Papich, 2016).

En aves, se han realizado variados estudios farmacocinéticos de marbofloxacin debido a que lo hacen una herramienta posiblemente útil en especies tales como pavos, patos, patos silvestres, codornices faisanes y pollos parrilleros (Anadón *et. al.*, 2002; Huang *et. al.*, 2003; Haritova *et. al.*, 2006; Goudah y Hasabelnaby, 2010; Yuan *et. al.*, 2011; Ding *et.al.*, 2013; Haritova *et. al.*, 2013; Yang *et. al.*, 2014; Aboubakr y Abdelazem, 2015; Lashev *et. al.*, 2015; El-Komy *et al.*, (2016), debido a sus propiedades farmacológicas sobre patógenos aviares de importancia, tales como Mycoplasma

Por aplicación endovenosa de una dosis única de 2 mg/kg de marbofloxacin, establecieron una amplia distribución, registrando en patos y pollos $V_d \text{área} \leq 0,6$ L/kg (Goudah y Hasabelnaby, 2010; El-Komy *et. al.*, 2016), mientras que otros autores observaron un $V_d \text{área}$ de 1,6 y 2,6 L/kg en codornices y pollos parrilleros (Lashev *et. al.*, 2015; Huang *et. al.*, 2003). Corroborándose la rápida distribución de marbofloxacin por aplicación endovenosa por los acortados $t_{1/2\alpha} \leq 0,3$ horas en pavos, pollos y patos (Haritova *et. al.*, 2006; Anadón *et. al.*, 2002; Goudah y Hasabelnaby, 2010; Aboubakr y Abdelazem, 2015)

La eliminación de marbofloxacin con la misma dosis difiere según la especie aviar, en pavos y faisanes registraron el $t_{1/2\beta}$ y TMR más extenso de 7,3-8,4 y 7,5 horas, respectivamente, reportando Clt de 2,6 a 3,1 ml/min/kg (Haritova *et. al.*, 2006; Lashev *et. al.*, 2015). Mientras que en patos y codornices registraron las semividas de eliminación más acortadas entre 2,1 a 4,03 horas, con Clt desde 3,1 a 7,6 ml/min/kg y TMR de 4,1 a 5,8 horas (Goudah y Hasabelnaby, 2010; Yuan *et. al.*, 2011; Haritova *et. al.*, 2013; Aboubakr y Abdelazem, 2015), y en pollos los parámetros de eliminación son intermedios, con $t_{1/2\beta}$ entre 5,2 a 6,5 horas, TMR entre 4,3 a 5,6 horas y con Clt similares a los observados a faisanes y pavos, entre 1,5 a 3,1 ml/min/kg (Anadón *et. al.*, 2002; Huang *et. al.*, 2003; El-Komy *et. al.*, 2016). A pesar de estas diferencias existentes de la eliminación de marbofloxacin por aplicación endovenosa en aves demuestra una eliminación moderada, al igual que en los mamíferos.

Con la misma dosis (2 mg/kg) por vía oral en las distintas especies aviares, determinaron una rápida y amplia absorción, registrando la $C_{\text{máx}}$ plasmática de marbofloxacin más alta en faisanes de 3 $\mu\text{g/ml}$ (Lashev *et. al.*, 2015), mientras que en patos, codornices y pollos, las $C_{\text{máx}}$ varían entre 1,1 a 1,9 $\mu\text{g/ml}$ y todos con un $T_{\text{máx}} \leq 2$ horas

(Anadón *et. al*, 2002; Huang *et. al*, 2003; Yuan *et. al*, 2011; Haritova *et. al*, 2013; Yang *et. al*, 2014; El-Komy *et. al*, 2016), mientras que en pavos la $C_{m\acute{a}x}$ reportada fue la más baja de 0,67 $\mu\text{g/ml}$ a las 6 horas (Haritova *et. al*, 2006). Los $t_{1/2abs}$ variaron en las distintas especies entre 0,36 a 0,6 horas, determinando su rápida absorción.

Se ha reportado que la biodisponibilidad oral de marbofloxacina difiere entre especies y entre los distintos estudios realizados, por ejemplo en faisanes fue de 118,8% (Lashev *et. al*, 2015), en patos entre 72,3 a 96,9% (Goudah y Hasabelnaby, 2010; Yuan *et. al*, 2011), en pollos entre 56,8 a 95% (Anadón *et. al*, 2002; Huang *et. al*, 2003; El-Komy *et. al*, 2016), mientras que las más bajas fueron registradas en codornices $\leq 56,2$ (Haritova *et. al*, 2013; Aboubakr y Abdelazem, 2015). Mientras que la eliminación igual que por vía endovenosa, es moderada en las distintas especies, siendo más rápida en patos con un $t_{1/2\beta}$ entre 2,6 a 4,6 horas y TMR de 3, 8 horas (Goudah y Hasabelnaby, 2010; Yuan *et. al*, 2011), mientras que en pavos, codornices, faisanes y pollos fueron similares entre 6,1 a 8,6 horas y TMR 7,9 a 14 horas (Anadón *et. al*, 2002; Huang *et. al*, 2003; Haritova *et. al*, 2013; Aboubakr y Abdelazem, 2015; Lashev *et. al*, 2015; El-Komy *et. al*, 2016)

Además, sólo en algunos estudios se informó la disposición muscular de marbofloxacina en pollos, determinando la mayor concentración a las 24 horas post-aplicación y detectando marbofloxacina solo hasta las 48 horas (Anadón *et. al*, 2002), mientras que Yang y colaboradores (2014), con una dosis de 5 mg/kg estableció una $C_{m\acute{a}x}$ en músculo de 2,86 $\mu\text{g/g}$ a las 2 horas, con una eliminación moderada $t_{1/2\beta}$ de 4,7 horas y TMR 5,68 horas.

Otros estudios en pollos, se ha determinado el comportamiento cinético de marbofloxacina en animales sanos e infectados con *Pasteurella multocida* determinando una disminución de la biodisponibilidad en un 8,8% y un aumento significativo del $t_{1/2\beta}$ de 7,9 horas en comparación con los animales sanos de 6,4 horas (Huang *et. al*, 2003), Ding y colaboradores (2013) utilizaron sólo animales infectados con *Mycoplasma gallisepticum* y *E. coli*, con la aplicación de una dosis de 5 mg/kg de marbofloxacina, describieron que se mantiene la relación de mayor persistencia del fármaco en músculo en comparación al plasma, con una $C_{m\acute{a}x}$ plasmática de 1,8 $\mu\text{g/ml}$ y muscular de 2,9 $\mu\text{g/g}$, al igual que la presencia de diferencias en el $t_{1/2\beta}$ plasmático y muscular de 6,8 y 11,5 horas. Mientras que El-Komy y colaboradores (2016), informaron que en las aves infectadas con *E.coli* y tratadas con una

dosis de 2mg/kg de marbofloxacin, registraron una disminuci3n significativa del C_{máx}, el ABC y la semivida de eliminaci3n. En todos los estudios reportados con animales infectados, proponen a marbofloxacin como una herramienta terapéutica y eficaz.

Se ha descrito que existe variada informaci3n de marbofloxacin en diferentes especies de aves, además del comportamiento cinético en diferentes dosis y en animales con ciertas patologías bacterianas, pero es nula la informaci3n en el ambito de las variaciones cinéticas presentes en marbofloxacin en pollos parrilleros expuestos a diferentes condiciones ambientales dependientes de las estaciones del ańo.

4.3 Factores fisiol3gicos que interaccionan con la farmacocinética

El comportamiento cinético de un determinado fármaco difiere en las diversas especies animales, incluso aquellas muy cercanas filogenéticamente debido a diferencias morfológicas y fisiológicas: aparato digestivo, funcionalidad hepática y renal, ritmo cardíaco, entre otros. (Escudero *et. al*, 1999). Estas circunstancias determinan que se deban evitar las extrapolaciones posológicas de una especie a otra, y establecen que se requiere estudiar el comportamiento farmacocinético de cada fármaco en la especie en que se pretende aplicar. Es por ello que uno de los dilemas observados es que se obtienen de datos farmacocinético derivado generalmente de estudios un número reducido de animales jóvenes y sanos, y a partir de aquellos datos a menudo se generan las predicciones o extrapolaciones para su uso clínico y productivo, lo que hace dificultoso encontrar covariable tales como las ambientales que puedan tener influencia sobre la farmacocinética del fármaco (De Backer, 2006; Modric, 2014).

Es de suma importancia conocer e interpretar los factores intrínsecos y extrínsecos que pueden alterar el resultado de los estudios de disposici3n y, por tanto, que potencialmente puedan modificar la respuesta farmacológica o tener un impacto en la depleci3n o agotamiento del fármaco (Modric y Martínez, 2011; Lees y Toutain, 2012; Modric, 2014). Algunos de estos factores son fácilmente identificables, como la raza, el sexo y la edad. Otros como enfermedades, rasgos hereditarios, composici3n corporal y/o factores ambientales, son menos evidentes y más difíciles de predecir (Martínez y Modric, 2010, Modric y Martínez, 2011;

Modric, 2014). En cualquier caso, no reconocer el posible impacto de estos factores en el comportamiento de los fármacos en el organismo puede conducir a un error sustancial en la predicción de la relación dosis-exposición-respuesta. En Medicina Veterinaria, por su parte existe una escasa información disponible sobre el impacto de las variables fisiológicas y de la variabilidad de la población en la relación dosis-exposición-respuesta, y lo cual se observa reflejado en la avicultura, ya que se espera una respuesta terapéutica poblacional por sobre la individual, desconociendo la variabilidad (Lees y Toutain, 2012; Modric, 2014).

Dentro de los estudios realizados sobre los factores ambientales que ejercen cambios significativos sobre la farmacocinética de antibióticos en animales productivos en distintas épocas del año, se detalla en el estudio desarrollado por Nawaz y Nawaz (1983), quienes determinaron diferencias farmacocinéticas tras la aplicación intravenosa de sulfadimidina en ovejas en época de verano e invierno. En este estudio, el volumen de distribución aparente fue menor en verano que en invierno, pero el aclaramiento fue al revés, lo cual determina una mayor eliminación del fármaco en verano, esto demuestra que si se observan diferencias cinéticas dependientes de las condiciones ambientales que el animal este expuesto, a pesar de ser animales homeotermos.

La situación más próxima a las variaciones ambientales y su impacto sobre la disposición de un fármaco en el organismo, la representan los animales con hipertermia debido a que existen cambios fisiológicos a las altas temperatura corporal, lo cual puede reemplazarse a lo que sucede en situaciones de calor. Sajid y colaboradores (2008), enfatizan en la necesidad de ajustar el régimen posológico en animales en condiciones febriles, por cuanto determinaron un aumento significativo de las concentraciones plasmáticas de ciprofloxacina en conejos inducidos experimentalmente a situación de fiebre en contraste con los animales sanos, además de un incremento del 25% en la vida media de absorción, una disminución del 21% en la vida media de eliminación y valores superiores de $C_{m\acute{a}x}$ (42.3%) y ABC (11.5%).

Zulfiqar-Ul-Hassan & Naseer (2008), establecieron diferencias en el comportamiento cinético de amoxicilina en conejos sanos versus los afectados con cuadro febril, donde tras la aplicación oral comprueban significativa reducción del $C_{m\acute{a}x}$ y del ABC, se extiende el tiempo medio de distribución, se reduce el Clt y la biodisponibilidad oral disminuye del 90 al 57% en los animales afectados mientras que por aplicación endovenosa no se presentan

diferencias significativas. Los autores sugieren que ante la situación clínica, debe existir una modificación en el régimen de dosificación. En terneros mestizos, Rajput y colaboradores (2011) determinaron el comportamiento cinético de cefpirome después de una única dosis de 10 mg/kg por inyección intravenosa, reportando que en individuos con cuadro febriles se presentaba una rápida eliminación respecto a los animales sanos. Ahangar y Srivastava (2000) aplicaron enrofloxacin en terneros sanos y con fiebre, y comprobaron niveles séricos inferiores y un aumento del 10% en la eliminación del fármaco en animales con fiebre. En cabras se realizaron investigaciones con amikacina sin y con inducción de cuadros febriles y se observaron diferencias en el perfil farmacocinético: en los animales febriles son superiores el ABC, el $t_{1/2\beta}$, el V_d área y el TMR, mientras se redujo el Clt (Agrawal *et. al*, 2002). En la misma especie, la aplicación parenteral de danofloxacin en animales con fiebre redujo significativamente el Clt, las concentraciones plasmáticas, el ABC y el TMR (Ismail, 2006). Todo lo expuesto anteriormente indica que la presencia de cambios fisiopatológicos importantes observados en las diferentes especies animales estudiadas con hipertermia, denotan que es importante modificar la dosificación en aquellas situaciones, para garantizar una respuesta clínica deseada.

Por otro lado, entre los factores ambientales también podemos contemplar las situaciones estresantes, en los cuales animales o humanos producen importantes cambios fisiológicos a nivel del sistema endócrino, cardiovascular, inmunológico y nervioso, que pueden alterar el comportamiento cinético de los fármacos (McLean y Graham, 2002; Saranteas *et. al*, 2004). El fracaso al identificar estos factores puede generar errores al predecir la relación de dosis-exposición dentro de una población (Martínez y Modric, 2010). En humanos, la exposición a ambientes calurosos induce a cambios hemodinámicos en el volumen del fluido corporal y distribución del flujo sanguíneo, modificaciones que afectan la cinética de un fármaco y la respuesta terapéutica, sin embargo esta información es insuficiente (Vanakoski y Seppälä, 1998). En sujetos sometidos a golpes de calor agudo, se reduce la excreción renal de tetraciclina por menor flujo sanguíneo consecuencia de la deshidratación, disminuyendo las concentraciones plasmáticas y el aclaramiento renal, durante las primeras 2 horas de exposición, luego de eso se estabilizaron (Vanakoski y Seppälä, 1998)

Por otro lado en peces los cuales son animales poiquiloterms, los cuales según sus respuestas fisiológicas frente a distintas temperaturas de agua hacen difereir el comportamiento cinético de un fármaco, lo cual se puede observar en el estudio realizado por Sun y colaboradores (2013) en *Paralichthys olivaceus*, donde evaluaron el comportamiento cinético de difloxacina en diferentes temperaturas del agua. Los peces expuestos a 24 °C poseen tiempos de absorción y eliminación reducidos y superior Vd y aclaramiento del fármaco respecto a temperaturas de 14 °C. La biodisponibilidad oral fue del 53% en bajas temperaturas, mientras que en altas es de un 68%.

Y en pollos, sólo se han investigado los componentes fisiológicos, tales como edad y rápido crecimiento, respecto el comportamiento cinético. El primer trabajo es el desarrollado en pollos de 4 semanas y 8 semanas de edad por Guo y colaboradores (2013), que tras la aplicación de una dosis única oral de 10 mg/kg de enrofloxacina evalúan la expresión intestinal de una proteína transportadora de membrana, P-glicoproteína, que según su localización específica posee un importante rol en la regulación del transporte de fármacos a través de membranas celulares, participando en los procesos de absorción, distribución y excreción de diferentes xenobióticos. Estos autores encontraron que los pollos de 8 semanas presentaban una mayor C_{máx}, la cual se alcanzaba en menor tiempo, con un t_{1/2β} reducido en un 64% y un incremento del 15,9% en la biodisponibilidad oral, la cual paso del 33% al 49%. Estos resultados se explicarían por la mayor expresión de P-glicoproteínas en hígado, yeyuno e ileon en los pollos más jóvenes y justifican el ajuste posológico acorde la edad de los animales (Guo *et. al*, 2013). Además, en el estudio derivado del rápido crecimiento de los pollos parrilleros, se analizó el comportamiento cinético de florfenicol según la tasa de crecimiento (Pozniak *et. al*, 2017), donde determinaron luego de la aplicación intravenosa que a medida que aumenta el peso, son mayores el ABC (29%), el TMR (26%) y el t_{1/2β} (32%), mientras que el Clt se reduce un 10%.

Estos antecedentes fundamentan la necesidad de reconocer los factores fisiológicos que pueden tener implicancia en la farmacocinética de medicamentos utilizados en animales de consumo humano, no sólo para optimizar el manejo terapéutico, garantizar el bienestar animal y la protección del medio ambiente, sino también para avalar un alimento inocuo para el consumidor (Toutain *et. al*, 2010).

4.4 Residuos de antimicrobianos

El uso de antibióticos en los animales productores de alimentos genera residuos en tejidos comestibles que pueden llegar a producir efectos tóxicos directos o indirectos al consumidor, estos constituyen una variedad de riesgos para la salud humana, los cuales dependen de la frecuencia y grado de exposición. Los principales riesgos están relacionados con: (1) las reacciones de hipersensibilidad que puedan ser inducidas en personas alérgicas, y (2) la adquisición de cepas de microorganismos patógenos resistentes a ciertos antibióticos (Anadón, 2007; Talero-Pérez *et. al*, 2014).

A nivel mundial existen varios organismos oficiales encargados del evaluar los problemas que generan estos residuos en alimentos de origen animal entre ellos, la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, la European Medicines Evaluation Agency (EMA) a través del Comité for Veterinary Medicine Products (CVMP) en el continente europeo y el Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) de la Comisión *Codex Alimentarius* de la Food and Agriculture Organization (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999; Baynes y Riviere, 2014).

La comisión del *Codex alimentario* interpreta por "*residuos de medicamentos veterinarios*" a los productos originales y sus metabolitos en cualquier porción comestible del producto animal, así como los residuos de impurezas relacionadas con el medicamento veterinario correspondiente. Para la regulación de estos y establecer un alimento inocuo, se establecieron los límites máximos de residuos (LMRs) para los diferentes medicamentos veterinarios (Talero-Pérez *et. al*, 2014). Los LMRs refieren a concentraciones máximas de residuos de uso de un medicamento veterinario (expresada en mg/kg o µg/kg del peso del producto fresco), que recomienda como legalmente permisible o aceptable dentro de un alimento o en la superficie del mismo (Lees y Toutain, 2012; Talero-Pérez *et. al*, 2014).

Al respecto, los organismos internacionales de control estipulan para cada fármaco y cada tejido comestible de una especie animal un límite máximo de residuos, establecidos mediante estudios de toxicidad crónica en animales de laboratorio que determinan la dosis máxima que en todos los estudios realizados no haya dado lugar a ninguna reacción adversa (NOEL) (Miller y Flynn, 2002; Palermo Neto, 2006; Anadón, 2007; Talero-Pérez *et. al*,

2014). Es por ello que desde un punto de vista de seguridad, debido al riesgo inherente a la presencia de residuos, se deben generar metodologías analíticas altamente sensibles para detectar y cuantificar concentraciones muy bajas, debiendo ser además confiables, rápidas y de bajo costo. (Pereira, 2009; Talero-Pérez *et. al*, 2014).

La guía para procedimientos de metodologías analíticas para la detección y cuantificación de residuos farmacológicos en alimentos de origen animal es la desarrollada por la Guía de la EMEA/2002/657/EC (EMEA, 2002), en la cual se describen una serie de ensayos que se deben realizar para la validación de las metodologías: ensayos de linealidad, recuperabilidad, repetitividad, reproducibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, entre otros.

4.4.1 Métodos analíticos para determinar residuos de fluoroquinolonas en tejidos de pollo

Las técnicas empleadas para cuantificar fluoroquinolonas en matrices biológicas son variadas. Una técnica habitual es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), asociada a detección ultravioleta o de fluorescencia (Verdón *et. al*, 2005; Zhao *et. al*, 2007; Talero-Pérez *et. al*, 2014) (Gigosos *et. al*, 2000; Moema *et. al*, 2012) y espectrometría de masas (Aerts *et. al*, 1995; Hernández-Arteseros *et. al*, 2002; Idowu y Peggins, 2004; Reig y Toldrá, 2009; Rocha *et. al*, 2015).

El inconveniente que se advierte en el análisis de estas moléculas es la naturaleza compleja de la matriz en la que se encuentran; ciertos tejidos contienen sustancias que dificultan la extracción del analito (Aerts *et. al*, 1995; Posyniak *et. al*, 2001; Reig y Toldrá, 2009). El tratamiento de la muestra problema comprende acciones que tienen el objetivo de remover sustancias incorporadas en la matriz que puedan afectar adversamente la detección, procedimiento llamado *clean up* que contempla diferentes alternativas: homogeneización, digestión enzimática, purificación y/o enriquecimiento, filtración, centrifugación y derivatización (Aerts *et. al*, 1995), no obstante, cada fluoroquinolona posee características físico-químicas específicas, que definen con precisión el procedimiento de análisis necesario para detectarlo y cuantificarlo y permiten que la sustancia progresivamente sea separada y

aislada de otros compuestos mediante diferentes etapas en su extracción y análisis (Andreu *et. al*, 2007). Y el proceso de extracción constituye el mayor desafío. A consecuencia de su naturaleza anfótera, las fluoroquinolonas generan posibles residuos químicos que interactúan con componentes de la matriz que pueden obstaculizar la extracción; el efecto es pH dependiente, y puede diferir con la matriz (Marzo y Dal Bo, 1998; Maraschiello *et. al*, 2001).

Algunos métodos aplicados para la extracción de fluoroquinolonas son complejos y demandan gran cantidad de solventes orgánicos como diclorometano (Bailac *et. al*, 2004; Idowu *et. al*, 2004), acetonitrilo (Posyniak *et. al*, 2001, Bailac *et. al*, 2004; Idowu y Peggins, 2004), metanol (Böttcher *et. al*, 2001) o ácido tricloroacético (Posyniak *et. al*, 2001; Verdon *et. al*, 2005), seguido de extracción líquida o en fase sólida y mediante la desnaturalización de las proteínas de las matrices trabajadas con ácido perclórico (Marzo y Dal Bo, 1998; Bailac *et. al*, 2004).

Generalmente, para la separación se emplean columnas de sílica C₁₈ ó C₈ y fase móvil que incorpore acetonitrilo o metanol (Carlucchi, 1998; Yorke y Froc, 2002; Bailac *et. al*, 2004; Verdón *et. al*, 2005) y debido que las fluoroquinolonas fluorescen por la incorporación del grupo piperacínil, la fluorescencia suele emplearse para su determinación (Carlucchi, 1998; Marzo y Dal Bo, 1998); debido que ésta depende del pH del medio, los mejores resultados se obtienen entre rangos de pH de 2,5 a 4,5 (Carlucchi, 1998).

En músculo de pollo, Bailac y colaboradores (2004), lograron buenos resultados en la determinación de diferentes fluoroquinolonas utilizando cartuchos para la extracción y separación con fase móvil integrada por acetonitrilo-agua 88:12 v/v ajustado a pH 4,5. La incorporación de acetonitrilo en la fase móvil mejora la selectividad mientras que trietilamina y el pH ácido modulan la retención de ofloxacina y evitan interferencias de la fase móvil en el cromatograma (Maraschiello *et. al*, 2001).

El análisis de fluoroquinolonas en muestras alimentarias, y por tanto de matrices biológicas complejas como el músculo de pollo requiere una etapa de extracción del analito seguida de una o varias etapas de limpieza en las que se intenta eliminar la máxima cantidad posible de sustancias co-extraídas de la matriz, tales como lípidos o proteínas, y pre-

concentrar los analitos, para finalmente determinarlos mediante una técnica analítica adecuada (Aerts *et. al*, 1995; Hassouan, 2006).

Anadón y colaboradores (2002), con detector ultravioleta, identifican niveles de marbofloxacina en músculo y otros tejidos mediante un procedimiento de extracción que requiere de cloroformo, un buffer como el fosfato de sodio, evaporación de líquidos con nitrógeno a 30 °C y disolución del remanente con la fase móvil compuesta de metanol, acetonitrilo, buffer, trietilamina y ácido acético; determinaron coeficientes de variación para los ensayos intra e interdía < 5,7%, límites de cuantificación 0,01 µg/g y recuperabilidad del 84 %, en plasma y tejidos. Por otro lado, Ding y colaboradores (2013), utilizando el mismo detector para establecer marbofloxacina en tejido muscular de pollo, reportan linealidad del 99%, límites de cuantificación de 0,02 a 0,05 µg/g, recuperabilidad en plasma entre un 91 a 98% y en tejidos del 75 a 85% y coeficientes de variación inferiores al 9%. Mientras que Yang y colaboradores (2014), a través del mismo detector, determinaron para marbofloxacina un límite de cuantificación para plasma de 0,02 µg/ml.

Verdón y colaboradores (2005), aplicaron una metodología de extracción poco compleja en la cual agrega tricloroacético al 8% en músculo de pollo y emplean un detector de fluorescencia con longitudes de onda de excitación de λ : 294 nm y de emisión λ de 514 nm para la determinación de marbofloxacina con una recuperabilidad del 68%. Otro estudio que determina marbofloxacina en músculo de pollo por detector de fluorescencia es el realizado por Yorke y Froc (2000), el cual requiere varios procedimientos dentro de la extracción. Ellos obtuvieron un límite de detección de 0,035 µg/g y límite de cuantificación de 0,075 µg/g, recuperabilidad del 64% y coeficientes de variación de los ensayos de intra e interdía de 4,2 y 15,5%.

4.4.2 Período de carencia y farmacocinética

La FDA en Estados Unidos, la EMEA en Europa y SENASA en Argentina, son las entidades encargadas de establecer tolerancias para un medicamento, pesticida u otro químico en tejidos comestibles de animales. Esta se refiere a la concentración del residuo marcador en el tejido (leche, huevo, carne) que debe caer antes de ser consumidos, para considerarlos seguros para su consumo. El residuo marcador puede ser el compuesto original o un

metabolito, y refleja una relación de los residuos totales, generalmente los tejidos “target” se consideran hígado y riñón, cuando el compuesto se ha agotado por debajo de la tolerancia se asegura que todos los tejidos comestibles son seguros e inocuos. Las tolerancias para diferentes tejidos se consideran puntos finales legales para los cuales se establecen tiempos de retiro de medicamentos (Baynes y Riviere, 2014).

El tiempo real de carencia que aparece en la etiqueta de un medicamento también es una función del diseño experimental que el fabricante utilizó en los estudios de investigación presentados a las distintas entidades fiscalizadoras encargadas para su aprobación. Por lo tanto, aunque la ciencia que rige el tiempo de carencia se basa en los principios farmacocinéticos que se describen a continuación, el tiempo de retiro se determina en realidad con base en datos experimentales. Generalmente, se administra una dosis específica del fármaco a animales sanos, se sacrifican a intervalos de tiempo secuenciales, y se analizan sus tejidos comestibles para determinar las concentraciones de fármaco (Riviere y Sundlof, 2009).

El tiempo de carencia es el período de tiempo desde el cese del tratamiento hasta el tiempo que tardan los residuos del fármaco en agotarse por debajo de la concentración segura. Se usa un método estadístico introducido a programas informáticos avalados por las entidades fiscalizadoras, como el que plantea la Unión Europea el programa propuesto por el *Committee for Veterinary Medicinal Products* (EMA/CVMP/036/96) llamado W.T versión 1.4 desarrollado por Hekman (1996), que aplica el método de regresión lineal de los datos logotransformados, para determinar el tiempo en que el residuo marcador se reduce por debajo a la tolerancia en el tejido “target”. El método determina el tiempo, que se demora la concentración del fármaco en el tejido “target” estar por debajo del LMRs (donde el límite superior se determina estadísticamente para representar con una confianza del 95% el 99º percentil de la población) (Riviere y Sundlof, 2009).

Estos tiempos de carencias para los medicamentos aprobados por las entidades fiscalizadoras para el uso en animales de consumo humano, son sólo validos en las especies especificadas, siempre que se respete la dosis, la vía de aplicación y frecuencia de administración. Por otra parte, son específicos para el producto y la formulación del fabricante, por ende el mismo principio activo puede tener diferentes tiempos de retiro si están formulados de forma diferente (Riviere y Sundlof, 2009).

Antes de identificar los parámetros farmacocinéticos que se utilizan para la estimación del periodo de carencia, es importante revisar algunos principios que sirven como base para comprenderlos. La forma en que se comporta el fármaco en el cuerpo después de una administración no solo es importante desde un punto terapéutico, sino que es de vital importancia para el ganadero y el veterinario para evitar residuos en tejidos comestibles después de ser sacrificado el animal (Modric, 2014).

Para la utilidad terapéutica y las determinaciones de residuos de fármacos, como se describió anteriormente se administra una cantidad conocida de fármaco a un animal sano. Se recogen los datos de concentración de suero y se crean modelos matemáticos para que la disposición general del fármaco en el cuerpo pueda evaluarse en relación con la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación. Los parámetros para estos modelos se estiman ajustando las líneas de regresión a los perfiles de concentración sérica versus tiempo (figura 11) (Riviere, 2009).

Las pendientes de las tres líneas que se muestran en la figura 11, cuando se trazan en un gráfico semilogarítmico, representan la distribución (λ_1), la eliminación a corto plazo (λ_2) y la eliminación a largo plazo (λ_3) del cuerpo. Las fases λ_1 (o α) y λ_2 (o β) del perfil de concentración sérica frente al tiempo son las únicas fases que generalmente están presentes cuando las concentraciones séricas se controlan durante un corto período de tiempo después de la dosificación y se usan típicamente para predecir concentraciones de fármacos terapéuticos (Riviere y Sundlof, 2009). Cuando se evalúan las concentraciones plasmáticas del fármaco por periodos posteriores a la aplicación del fármaco, con métodos más sensibles aparece la fase de eliminación tardía λ_3 (o γ) para ciertos compuestos; puede durar días o meses después de la última dosis administrada dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del medicamento, la cantidad de fármaco administrado y la especie en la que se administró. Esta fase λ_3 refleja la disposición del fármaco en los llamados "compartimentos profundos" (Riviere, 2011)

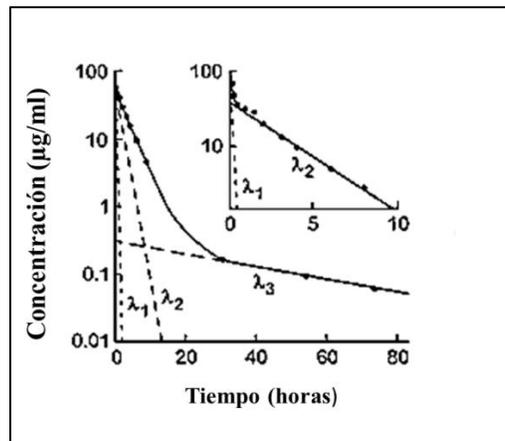


Figura 11. Esquema de un modelo farmacocinético de múltiple-compartimentos luego de una aplicación intravenosa. Curva semilogarítmica de concentraciones de un fármaco X en distintos tiempos (Riviere, 2009).

Para los propósitos de determinar los tiempos de carencia de los medicamentos que pueden usarse en animales productores de alimentos, enfocaremos nuestra discusión en la fase terminal de la eliminación del medicamento para determinar la vida media ($t_{1/2}$) del medicamento en el cuerpo, ya que este es la medida que es relevante para determinar los tiempos de carencia del medicamento (Riviere y Sundlof, 2009; Riviere, 2011; Modric, 2014).

La vida media de la droga o sustancia química en el cuerpo es la medida biológica principal utilizada para determinar los tiempos de espera de las drogas y productos químicos en los animales productores de alimentos; sin embargo, este parámetro puede verse influido por muchos factores biológicos. El $t_{1/2}$ y se basa en la pendiente final de la curva de eliminación utilizada para determinar el tiempo de abstinencia de un fármaco (Riviere y Sundlof, 2009; Modric, 2014). El $t_{1/2}$ se calcula usando la ecuación (23):

$$t_{1/2} = \ln 2 / \text{pendiente} \quad (23)$$

Como se indicó anteriormente la semivida de eliminación puede verse influida por muchos factores biológicos. Entre ellos depende de cómo se distribuye el fármaco en el cuerpo y que tan rápido se elimina. Es por ello que otros parámetros que influyen es el volumen de

distribución (Vd) estimación cuantitativa del alcance de la distribución del fármaco en el cuerpo, y cuando se aplica por vía endovenosa se calcula el Vd en la siguiente ecuación (24):

$$Vd = \frac{\textit{Cantidad del fármaco en el cuerpo}}{\textit{Concentración plasmática del fármaco}}$$

(24)

Cuanto mayor sea el Vd de un fármaco, mejor es su distribución tisular en todo el cuerpo, aunque a pesar que este parámetro nos da una idea de la distribución del fármaco, este puede distribuirse de forma no uniforme a través del cuerpo, ya que el fármaco puede adherirse a células específicas o ligado a macromoléculas tisulares específicas, y debido a esto algunos medicamentos pueden tener largos períodos de carencia por altos Vd.

Además de Vd, en la fase de eliminación otro parámetro de importancia para la estimación del periodo de retiro es la tasa de depuración de la droga (Cl_t), este cuantifica la eficiencia de los procesos de eliminación y se define como la tasa de droga eliminación del cuerpo en relación con la concentración de droga en el suero por la ecuación 25:

$$Cl_t = \frac{\textit{Velocidad de eliminación}}{\textit{Concentración plasmática}}$$

(25)

Las drogas que tienen una tasa lenta de eliminación del cuerpo tenderán a tener semividas prolongadas, mientras que aquellos que se eliminan rápidamente tendrán vidas medias más cortas.

El t_{1/2} depende de dos parámetros (Vd y Cl_t) derivando en la siguiente ecuación (26):

$$t_{1/2} = \ln 2 \frac{Vd}{Cl}$$

(26)

Por ende, si el balance de fluidos del animal cambia, en consecuencia el Vd puede cambiar. Por ello, los factores como la edad, estado nutricional, el porcentaje de grasa corporal, especie, presencia de otros medicamentos, porcentaje de unión a proteínas plasmática o cambios en las condiciones ambientales puede tener implicancia en la determinación correcta del período de carencia (Riviere y Sundlof, 2009; Riviere, 2011; Modric, 2014).

Si la aplicación del medicamento es por vía endovenosa, teóricamente se puede calcular el período de carencia con los parámetros cinéticos nombrados anteriormente, teniendo en cuenta la tolerancia del fármaco en el tejido y la dosis de la droga. Por otra parte, si el medicamento se da por vía oral se requiere conocer la fracción de la dosis administrada que se absorbe en el cuerpo (por ejemplo, biodisponibilidad). Esta cantidad, dividida por el Vd, es la concentración inicial (C_0). Suponiendo que el agotamiento del fármaco en el organismo sólo depende de la semivida terminal ($t_{1/2\gamma}$), ajustando la siguiente ecuación (27), como el periodo de carencia k como $1,44 t_{1/2\gamma}$, la siguiente relación deriva en:

$$Pc = 1,44 \ln \left(\frac{C_0}{tolerancia} \right) t_{1/2\gamma}$$

(27)

Claramente, esta ecuación propuesta por Riviere y Sundlof (2009), es una simplificación del proceso, pero la ecuación funciona si el C_0 fuera la concentración de la droga en el tejido diana en la etapa terminal posterior a la aplicación, dependiendo de la cantidad presente en la fase λ_2 , o en la modificación de esta fórmula propuesta por Riviere (2011), en la fase λ_3 ($t_{1/2\gamma}$) en el tejido diana y C_0 como la concentración máxima presente en el tejido diana, lo cual valida la ecuación anterior. Por otro lado, en la Guía para el cálculo del período de retiro en tejidos comestibles, desarrollado por PROSAIA (2013), avalada por el

SENASA, se propone el C_0 como el intercepto de la fase de eliminación en la curva de disposición del fármaco en el tejido diana.

Finalmente, la ecuación anterior es útil para obtener una perspectiva de cuál es el tiempo de extracción relativo a la vida media terminal ($t_{1/2\gamma}$). Por otro lado, se describe que el tiempo de carencia sería igual a 10 vidas medias, esta “regla de 10” puede derivarse suponiendo, que se requieren 10 vidas medias para que se elimine el 99,9% del fármaco, aunque esta regla es conservadora en relación con los objetivos finales de la seguridad alimentaria humana (Gehring *et. al*, 2004)

Se debe recalcar que la mayoría de las determinaciones de periodos de retiro aprobados para formulaciones de medicamento de uso de animales de consumo, se han realizado en animales sanos y en condiciones productivas optimas (Riviere y Sundlof, 2009), es por ello que se hace imperioso registrar las diferencias presentes en los período de carencia de un fármaco en animales enfermos, en situaciones estresantes o fuera de las condiciones productivas optimas, garantizando bajo todas las situaciones un alimento inocuo para el ser humano. Respecto a las fluoroquinolonas utilizadas en explotaciones avícolas, los períodos de carencia varían según el principio activo y/o tejido comestible y el límite máximo de residuo establecido para el principio activo en el tejido comestible (tabla 2).

Tabla 2. Período de carencia de fluoroquinolonas en músculo de aves según diferentes autores.

Fluoroquinolonas	Dosis	LMR_s (µg/kg)	Pc (días)	Referencias
Enrofloxacin	10 mg/kg	100	3 a 12	Anadón <i>et. al</i> , 1995; El Aziz <i>et. al</i> , 1997; Da Silva <i>et. al</i> , 2006
Ciprofloxacin	8 mg/kg	100	10	Anadón <i>et. al</i> , 2001
Danofloxacin	5mg/kg	200	4	Errecalde <i>et. al</i> , 2017
Norfloxacin	8 mg/kg	50	12	Anadón <i>et. al</i> , 1992
Difloxacin	10 mg/kg	300	5	Anadón <i>et. al</i> , 2011
Levofloxacin	10 mg/kg	N/D*	8	Kyuchukova <i>et. al</i> , 2013

*n/d: no determinado

Respecto a marbofloxacina y su aplicación en pollos parrilleros únicamente existen tres estudios para estimar el período de carencia, los cuales consideran para el músculo un LMRs de 150 µg/kg, el primero desarrollado por Anadón y colaboradores (2002), a partir de una dosis oral de 2 mg/kg durante 3 días, en pollos sanos y en condiciones productivas ideales, que propone 5 días para todos los tejidos comestibles.

El-Komy y colaboradores (2016), luego de la administración de 2 mg/kg de marbofloxacina cada 24 horas durante 3 días en animales infectados con *E. coli*, proponen un periodo de carencia de 4 días, mientras Yang y colaboradores (2014), propone una restricción de 4 días, luego de administrar 5 mg/kg cada 24 horas durante tres días en pollos de engorde sanos mediante un estudio cinético poblacional basado en la fisiología.

CAPITULO 5. RESULTADOS

5.1 Validación del método cromatográficos

Los resultados obtenidos en los ensayos de linealidad por regresión lineal se muestran en las Figuras 12 y 13. Se observan los cocientes de las áreas bajo de curva (ABC) del cromatograma de marbofloxacina y del estándar interno, y las concentraciones conocidas de marbofloxacina ($\mu\text{g/ml}$) agregadas a la matriz tanto plasma y músculo blanco.

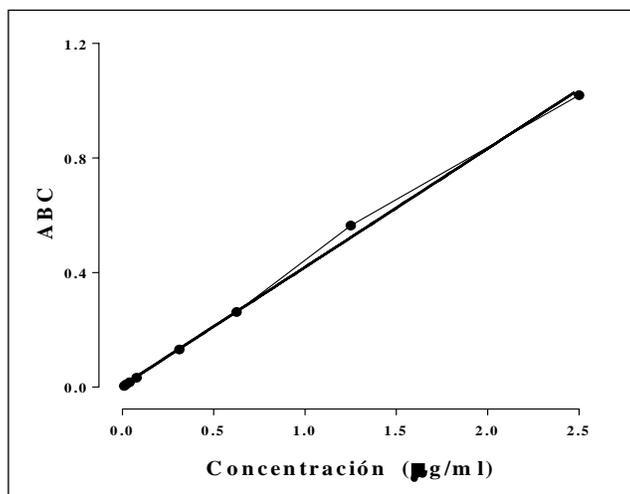


Figura 12. Gráfico del ensayo de linealidad del método analítico para la determinación de marbofloxacina en muestras de plasma de pollos.

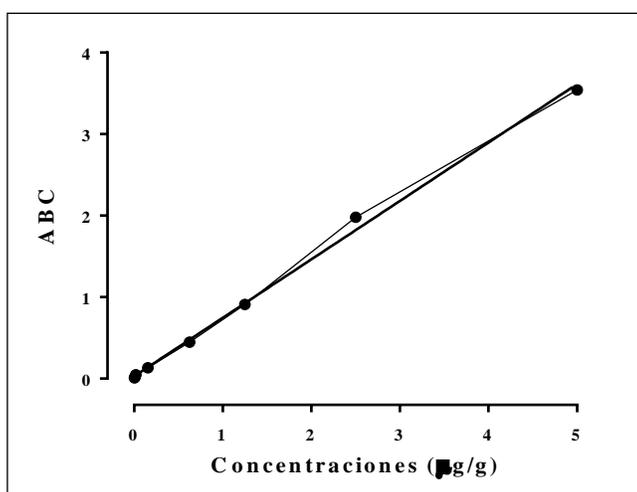


Figura 13. Gráfico del ensayo de linealidad del método analítico para la determinación de marbofloxacina en muestras de músculo de pollos.

Todos los resultados obtenidos en la validación se observan en las tablas 4, 5 y 6. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) para marbofloxacina fueron 0,002 y 0,006 µg/ml en plasma y de 0,003 y 0,007 µg/g para músculo, respectivamente.

Tabla 4. Resultados de los ensayos de linealidad para la cuantificación de marbofloxacina en plasma y musculo de pollo.

Matrices	Rango de concentración (*)	(a)	(b)	(c)
Plasma	0,0097 - 2,5	0,00812	0,4154	0,9928
Músculo	0,0048 - 5,0	0,771	0,7052	0,9999

(*) µg/ml o µg/g. (a) Intercepto (b) Pendiente (c) r²: Coeficiente de ajuste

Tabla 5. Recuperación y precisión del método analítico para la determinación de marbofloxacina en plasma de pollo parrillero.

Concentración (µg/ml)	Recuperación (%)	Precisión	
		Intradía (%CV)	Interdía (%CV)
0,039	88,3	1,24	2,61
0,156	89,7	2,02	1,73
0,625	85,5	1,72	1,53
1,250	81,3	0,60	1,05
Promedio ± DE	86,2 ± 3,75	1,39 ± 0,61	1,73 ± 0,65

Tabla 6. Recuperación y precisión del método analítico para la determinación de marbofloxacina en músculo de pollo parrillero.

Concentración (µg/ml)	Recuperación (%)	Precisión	
		intra-día (%CV)	Inter-día (%CV)
0,039	94,8	1,88	1,88
0,156	90,1	1,35	2,78
0,625	78,4	1,29	1,39
1,250	87,3	1,19	0,82
Promedio ± DE	87,6 ± 6,91	1,47 ± 0,54	1,71 ± 0,83

5.2 Ensayo farmacocinético y de disposición tisular

Los valores promedios de concentración plasmática de marbofloxacin obtenidos tras la administración de un preparado comercial al 2% (Marbocyl®) a la dosis de 2 mg/kg en pollos en cada una de las estaciones estudiadas se representan en las figuras 14 (primavera), 15 (verano) y 16 (invierno), y se comparan en las figuras 17 y 18.

Las concentraciones promedio de marbofloxacin ($X \pm DE$) se presentan en las tablas 6 (vía endovenosa) y 7 (vía oral), mientras los parámetros cinéticos determinados con el programa no compartimental PK Solution 2.0, para las aplicaciones por las vías endovenosa y oral se señalan en las tablas 8 y 9, respectivamente.

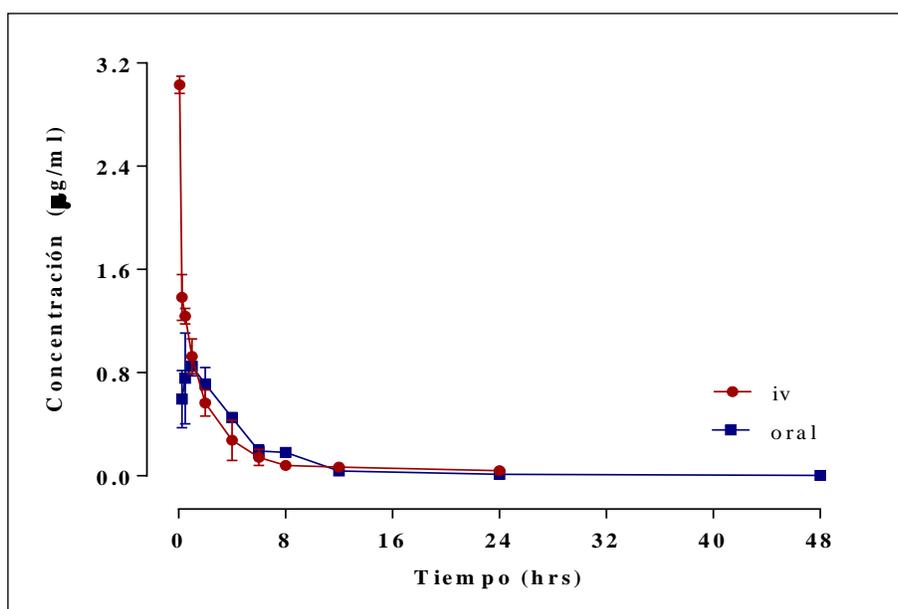


Figura 14. Gráfico de la disposición plasmática de marbofloxacin en pollos ($\mu\text{g/ml}$), luego de la administración endovenosa y oral (2 mg/kg), en época primaveral.

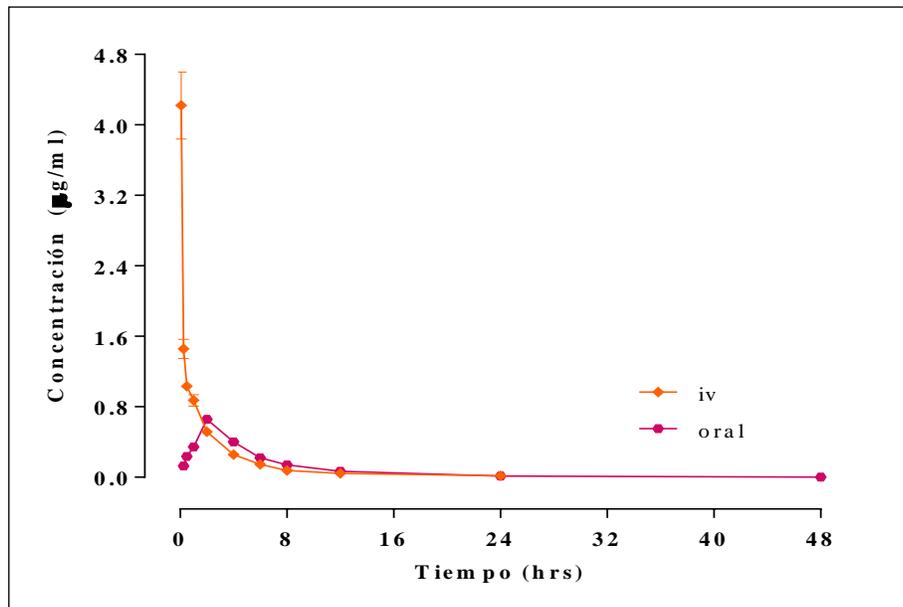


Figura 15. Gráfico de la disposición plasmática de marbofloxacin en pollos ($\mu\text{g/ml}$), luego de la administración endovenosa y oral (2 mg/kg), en época estival

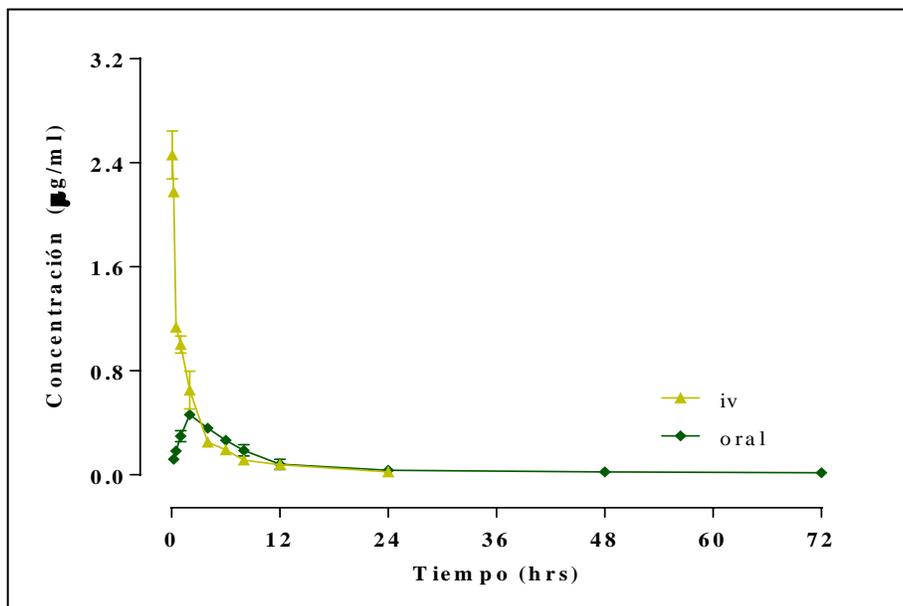


Figura 16. Gráfico de la disposición plasmática de marbofloxacin en pollos ($\mu\text{g/ml}$), luego de la administración endovenosa y oral (2 mg/kg), en época invernal.

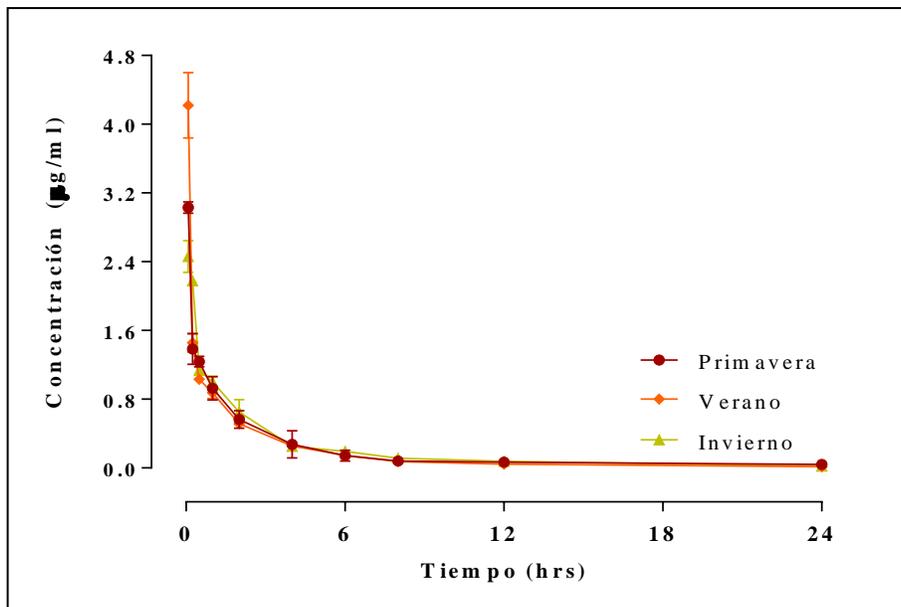


Figura 17. Gráfico de la disposición plasmática de marbofloxacin por aplicación intravenosa, en todas las épocas.

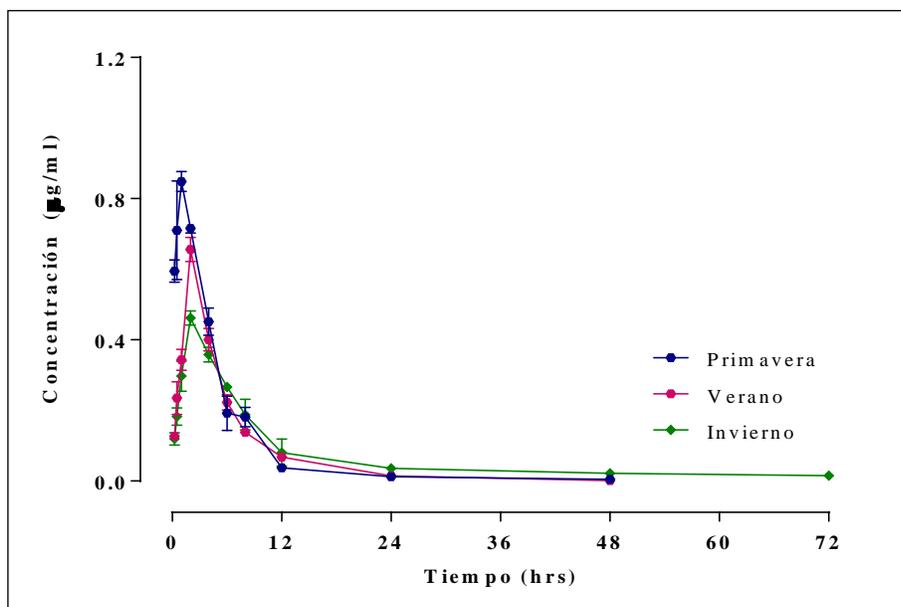


Figura 18. Gráfico de la disposición plasmática de marbofloxacin por aplicación oral en todas las épocas de estudio

Tabla 6. Promedio de concentraciones plasmáticas ($X \pm DE$) de marbofloxacina ($\mu\text{g/ml}$) luego de una dosis de 2 mg/kg por aplicación endovenosa.

Tiempo (horas)	Primavera	Verano	Invierno
0,08	3,031 \pm 0,067	4,220 \pm 0,341	2,460 \pm 0,165
0,25	1,383 \pm 0,178	1,457 \pm 0,098	2,177 \pm 0,027
0,5	1,238 \pm 0,061	1,033 \pm 0,041	1,136 \pm 0,008
1	0,926 \pm 0,134	0,873 \pm 0,059	1,002 \pm 0,059
2	0,564 \pm 0,161	0,516 \pm 0,019	0,651 \pm 0,130
4	0,275 \pm 0,157	0,256 \pm 0,003	0,251 \pm 0,023
6	0,143 \pm 0,062	0,146 \pm 0,016	0,192 \pm 0,020
8	0,080 \pm 0,008	0,075 \pm 0,006	0,113 \pm 0,018
12	0,068 \pm 0,004	0,044 \pm 0,002	0,077 \pm 0,006
24	0,040 \pm 0,011	0,016 \pm 0,001	0,022 \pm 0,001

Tabla 7. Promedio de concentraciones plasmáticas ($X \pm DE$) de marbofloxacina ($\mu\text{g/ml}$) en pollos luego de la administración oral (2 mg/kg).

Tiempo (horas)	Primavera	Verano	Invierno
0,25	0,595 \pm 0,220	0,127 \pm 0,009	0,119 \pm 0,016
0,5	0,755 \pm 0,350	0,235 \pm 0,032	0,183 \pm 0,038
1	0,848 \pm 0,069	0,343 \pm 0,030	0,297 \pm 0,038
2	0,712 \pm 0,119	0,656 \pm 0,031	0,462 \pm 0,028
4	0,452 \pm 0,038	0,400 \pm 0,029	0,358 \pm 0,018
6	0,322 \pm 0,049	0,222 \pm 0,019	0,267 \pm 0,013
8	0,181 \pm 0,058	0,137 \pm 0,008	0,188 \pm 0,039
12	0,037 \pm 0,006	0,068 \pm 0,008	0,086 \pm 0,034
24	0,012 \pm 0,004	0,014 \pm 0,003	0,036 \pm 0,003
48	0,005 \pm 0,002	0,001 \pm 0,000	0,022 \pm 0,006
72	-	-	0,015 \pm 0,001

Tabla 8. Parámetros cinéticos plasmáticos de marbofloxacina en pollos luego de la administración endovenosa de 2 mg/kg, en las diferentes estaciones del año.

Parámetros	Primavera	Verano	Invierno
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,5	0,7	0,5
$t_{1/2\beta}$ (h)	6,5	5,3	5,0
ABC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	5,0	4,3	5,2
Vd _{área} (L/kg)	3,7	3,6	2,8
TMR (h)	6,7	4,4	5,0
Cl _t (ml/min/kg)	6,6	7,6	6,3

$t_{1/2\alpha}$: vida media de distribución; $t_{1/2\beta}$: vida media de eliminación; ABC: area bajo la curva; Vd_{área}: volumen de distribución; TMR: tiempo medio de residencia; Cl_t: clearance total.

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos de marbofloxacina por vía oral, en pollos parrilleros en las diferentes épocas del año.

Parámetros	Primavera	Verano	Invierno
C _{máx} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0,8	0,7	0,5
T _{máx} (h)	1,0	2,0	2,0
$t_{1/2}$ abs (h)	0,2	0,8	0,7
$t_{1/2\alpha}$ (h)	2,8	1,4	3,2
$t_{1/2\beta}$ (h)	4,6	4,9	7,2
ABC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	4,7	3,7	4,1
F (%)	94	86	78
TMR (h)	4,8	6,2	9,4
Cl _t (ml/min/kg)	6,5	7,5	6,3

C_{máx}: concentración máxima; T_{máx}: momento en que se logra la C_{máx}; $t_{1/2}$ abs: vida media de absorción; $t_{1/2\alpha}$: vida media de distribución; $t_{1/2\beta}$: vida media de eliminación; ABC: área bajo la curva; F%: Biodisponibilidad; TMR: tiempo medio de residencia. Cl_t: clearance total.

Los valores promedios de concentración muscular de marbofloxacina obtenidos tras la administración de un preparado comercial al 2% (Marbocyl®) a la dosis de 2 mg/kg en pollos en cada una de las estaciones estudiadas se representan en las figuras 19 (primavera), 20 (verano) y 21 (invierno), en tanto que se las compara en las figuras 22 y 23. Se indican las concentraciones de marbofloxacina en musculo en las tablas 10 (vía endovenosa) y 11 (vía

oral), mientras los parámetros cinéticos determinados en el músculo con el programa no compartimental PK Solution 2.0, para las aplicaciones por las vías endovenosa y oral se señalan en las tablas 12 y 13, respectivamente.

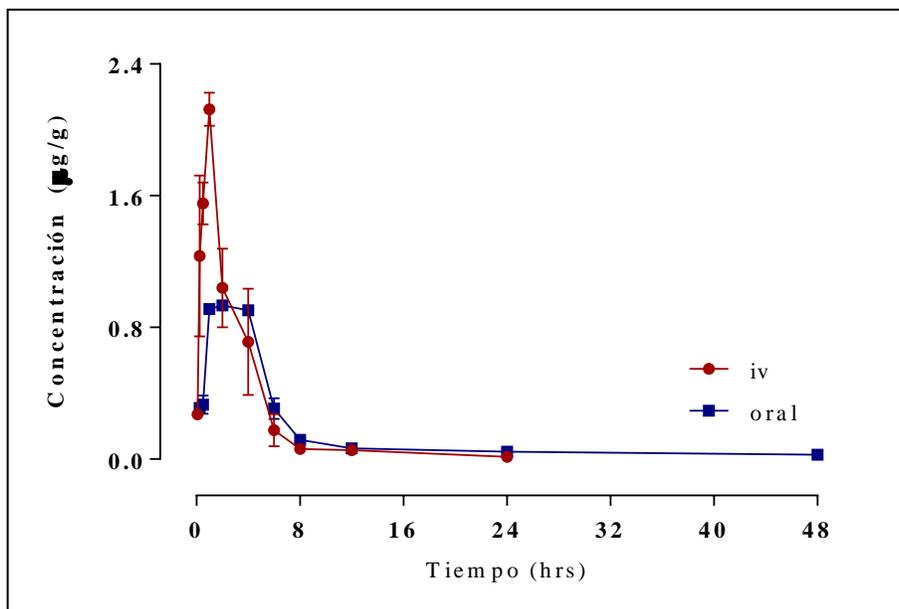


Figura 19. Gráfico de la disposición muscular de marbofloxacina ($\mu\text{g/g}$) en pollos parrilleros post-aplicación endovenosa y oral (2 mg/kg), en primavera.

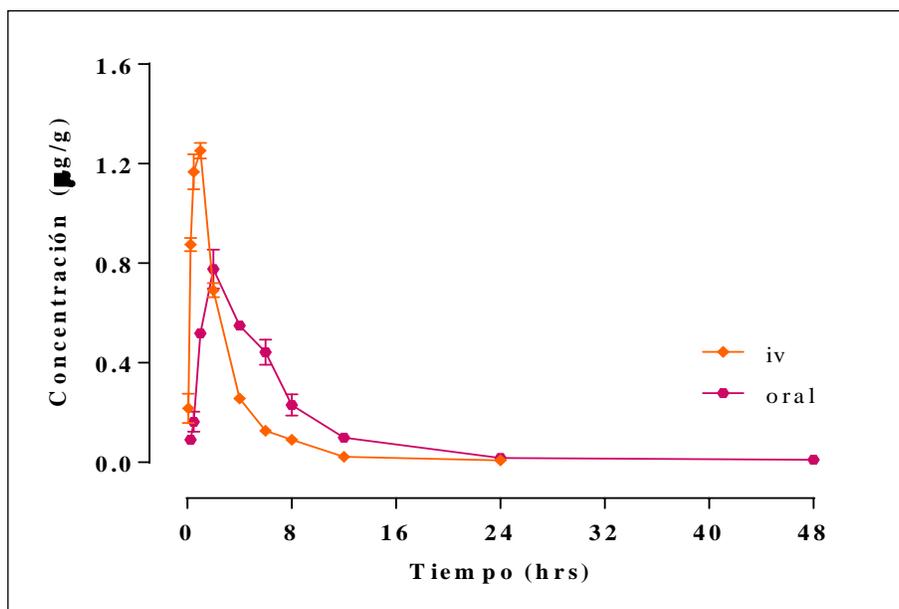


Figura 20. Gráfico de la disposición muscular de marbofloxacina ($\mu\text{g/g}$) en pollos parrilleros post-aplicación endovenosa y oral (2 mg/kg), en época estival.

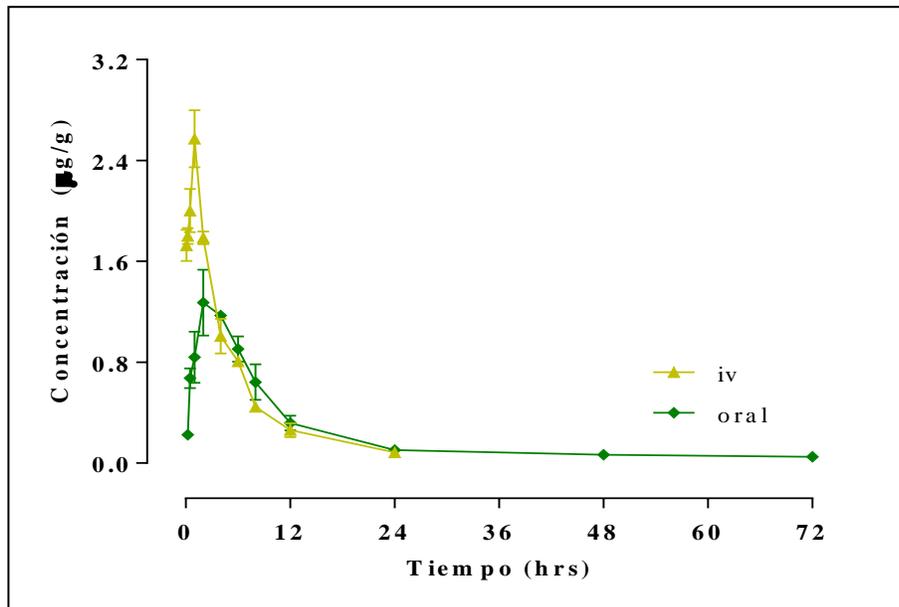


Figura 21. Gráfico de la disposición muscular de marbofloxacin ($\mu\text{g/g}$) en pollos parrilleros post-aplicación endovenosa y oral (2 mg/kg), en invierno.

Tabla 10. Concentraciones musculares promedio ($X \pm \text{DE}$) de marbofloxacin ($\mu\text{g/g}$), posterior a una dosis de 2 mg/kg por aplicación endovenosa en cada estación estudiada.

Tiempo (horas)	Primavera	Verano	Invierno
0,08	$0,272 \pm 0,007$	$0,217 \pm 0,058$	$1,552 \pm 0,123$
0,25	$1,234 \pm 0,488$	$0,876 \pm 0,026$	$1,801 \pm 0,066$
0,5	$1,553 \pm 0,128$	$1,167 \pm 0,070$	$2,002 \pm 0,171$
1	$2,125 \pm 0,100$	$1,252 \pm 0,031$	$2,573 \pm 0,226$
2	$1,040 \pm 0,238$	$0,692 \pm 0,028$	$1,787 \pm 0,050$
4	$0,712 \pm 0,290$	$0,257 \pm 0,016$	$1,007 \pm 0,137$
6	$0,176 \pm 0,097$	$0,127 \pm 0,008$	$0,808 \pm 0,007$
8	$0,062 \pm 0,003$	$0,090 \pm 0,006$	$0,446 \pm 0,014$
12	$0,054 \pm 0,001$	$0,023 \pm 0,001$	$0,261 \pm 0,054$
24	$0,013 \pm 0,002$	$0,007 \pm 0,000$	$0,086 \pm 0,025$

Tabla 11. Concentraciones musculares promedio ($X \pm DE$) de marbofloxacina ($\mu\text{g/g}$), posterior a una dosis de 2 mg/kg por aplicación oral en cada estación estudiada.

Tiempo (horas)	Primavera	Verano	Invierno
0,25	0,311 \pm 0,030	0,090 \pm 0,018	0,225 \pm 0,022
0,5	0,331 \pm 0,055	0,163 \pm 0,040	0,674 \pm 0,077
1	0,912 \pm 0,014	0,518 \pm 0,019	0,840 \pm 0,201
2	0,934 \pm 0,016	0,776 \pm 0,078	1,272 \pm 0,226
4	0,919 \pm 0,005	0,549 \pm 0,018	1,171 \pm 0,031
6	0,307 \pm 0,062	0,442 \pm 0,050	0,905 \pm 0,100
8	0,118 \pm 0,026	0,230 \pm 0,040	0,642 \pm 0,141
12	0,066 \pm 0,012	0,099 \pm 0,011	0,318 \pm 0,058
24	0,045 \pm 0,009	0,017 \pm 0,003	0,103 \pm 0,023
48	0,027 \pm 0,002	0,010 \pm 0,000	0,065 \pm 0,020
72	-	-	0,049 \pm 0,013

Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacina en músculo por vía intravenosa, en pollos parrilleros en las diferentes épocas del año.

Parámetro	Primavera	Verano	Invierno
C_{máx} ($\mu\text{g/g}$)	2,1	1,3	2,6
T_{máx} (h)	1,0	1,0	1,0
t_{1/2} ing (h)	0,2	0,2	0,5
t_{1/2} β (h)	6,8	5,1	7,0
ABC ($\mu\text{g-h/ml}$)	6,6	4,0	14,4
TMR (h)	3,9	3,6	7,3
ABC_{mus}/ABC_{plasma}	1,3	0,9	2,7

C_{máx}: concentración máxima; T_{máx}: momento en que se logra la C_{máx}; t_{1/2}ing: vida media ingreso al tejido t_{1/2} β : vida media de eliminación; ABC: área bajo la curva; TMR: tiempo medio de residencia; Cociente ABC_{mus}/ABC_{plasma}.

Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacina en músculo por vía oral, en pollos parrilleros en las diferentes épocas del año.

Parámetro	Primavera	Verano	Invierno
C_{máx} (µg/g)	0,9	0,8	1,3
T_{máx} (h)	2,0	2,0	2,0
t_{1/2} ing (h)	0,5	0,6	1,3
t_{1/2}β (h)	8,4	4,5	11,5
ABC (µg-h/ml)	7,3	5,4	13,1
TMR (h)	11,0	6,8	12,5
C₀ (µg/ml)	1,9	1,2	1,9
t_{1/2}γ (h)	15,9	9,5	22,2
ABC_{mus}/ABC_{plasma}	1,5	1,4	3,19
C_{máx}_{mus}/C_{máx}_{plasma}	1,2	1,1	2,6

C_{máx}: concentración máxima; T_{máx}: momento en que se logra la C_{máx}; t_{1/2}ing: vida media de ingreso al tejido t_{1/2}β: vida media de eliminación; ABC: área bajo la curva; TMR: tiempo medio de residencia; C₀: intercepto de la fase de eliminación; t_{1/2}γ: fase de eliminación diferida.: Cociente entre ABC_{mus}/ABC_{plasma} y C_{máx}_{mus}/C_{máx}_{plasma}

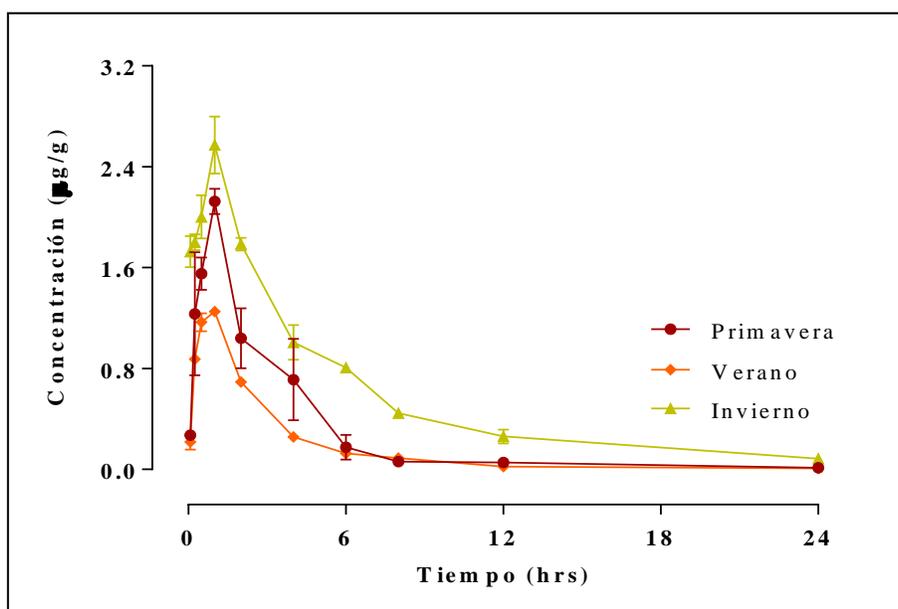


Figura 22. Gráfico de la disposición muscular de marbofloxacina por aplicación intravenosa en todas las épocas de estudio.

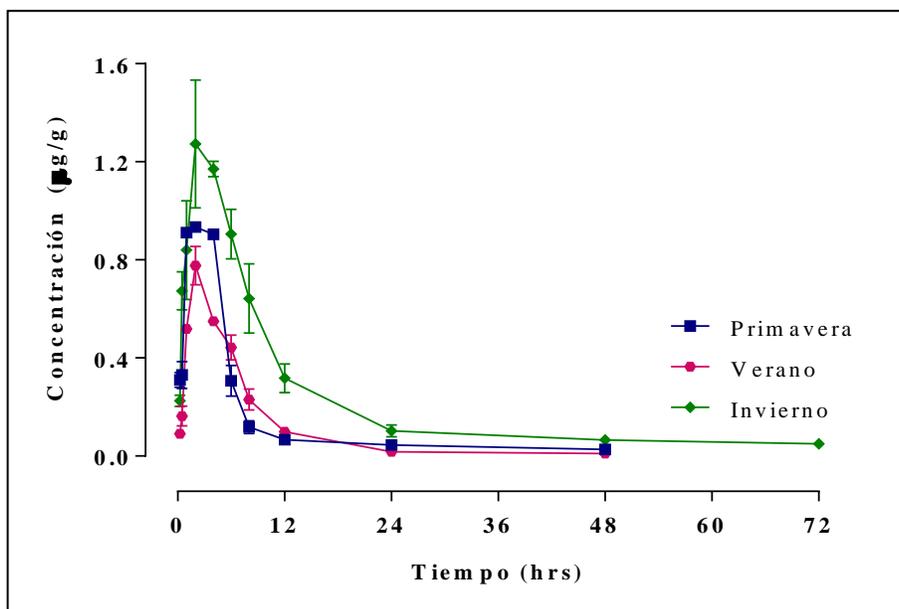


Figura 23. Gráfico de la disposición muscular de marbofloxacina por aplicación oral en todas las épocas de estudio.

Se observa que la disposición farmacocinética de la marbofloxacina aplicada por vía oral en época primaveral se caracteriza por una rápida absorción descrita por una semivida de absorción de 0,2 horas, alcanzándose la máxima concentración plasmática de 0,8 µg/ml a la hora post administración, además de presentar una eliminación moderada determinada por el $t_{1/2\beta}$ de 2,8 horas. Al igual que otras fluoroquinolonas de segunda generación presentó por vía endovenosa un alto volumen de distribución, obteniéndose un valor de 3,7 L/kg, con un $t_{1/2\alpha}$ de 0,5 horas. Esta amplia distribución tisular queda reflejada con los parámetros tisulares, ya que la máxima concentración plasmática en músculo fue de 2,1 µg/g a la hora post administración intravenosa y de 1,3 µg/g a las 2 horas post aplicación oral. El aclaramiento plasmático fue de 6,6 y 6,5 ml/min/kg para la administración intravenosa y oral, respectivamente. Por último, la biodisponibilidad tras la aplicación oral en animales ayunados fue de un 94%.

Las concentraciones plasmáticas de marbofloxacina por aplicación oral en época estival e invernal son significativamente menores ($p < 0,05$) que las de primavera,

observándose una reducción en las concentraciones presentes del 44% en verano y del 46% en invierno, mientras que por vía endovenosa no se presentan diferencias (Tabla 7).

Los parámetros cinéticos plasmáticos generados en diferentes épocas luego de la aplicación oral de marbofloxacin en pollos parrilleros, revelan una reducción del $C_{m\acute{a}x}$ invernol del 37,5%, respecto a la estación control (primavera) y un retraso en su expresión ($T_{m\acute{a}x}$) hasta las 2 horas.

La eliminación plasmática en invierno es más lenta, según revelan incrementos del $t_{1/2\beta}$ y el TMR del 56,5 y 91%, respectivamente, mientras que en época estival el Clt aumenta respecto a la estación primaveral un 15%. Dado que estas diferencias en la eliminación prácticamente no se presentan tras la administración endovenosa, las mismas posiblemente se deban a las diferencias en la absorción en función de la época.

El análisis del perfil de disposición que se obtuvo en el tejido muscular, revela diferencias significativas ($p < 0,05$) en las concentraciones de marbofloxacin, representadas en las figuras 22 y 23. En invierno los niveles fueron significativamente mayores que en la estación control, tanto por vía endovenosa (67%) u oral (37%). Por la vía endovenosa, también aumentaron el $C_{m\acute{a}x}$ muscular invernol un 23%, y 2 veces el ABC, respecto a los valores determinados en primavera (tabla 12). Además, por la aplicación oral el antimicrobiano se cuantificó hasta las 72 horas siguientes, mientras que en las otras dos estaciones solo se detectó hasta las 48 horas; cuando la administración fue por vía endovenosa, solo se detectó en músculo hasta las 24 horas.

En invierno, el ingreso del antimicrobiano al tejido luego de la aplicación intravenosa es más tardío aunque muy significativo y más persistente, según expresan los valores establecidos de ABC, $t_{1/2\beta}$, y TMR (tabla 12), mientras que por la vía oral acontece lo mismo donde ingreso es lento al tejido muscular ($t_{1/2_{ing}}$ de 1,3 horas); determinando una $C_{m\acute{a}x}$ mayor en un 31%, acorde el elevado ABC hallado respecto a los valores registrados en primavera. En esta época, marbofloxacin experimenta eliminación más lenta ya que posee mayor persistencia en músculo con una semivida diferida de casi 30 horas (Tabla 13).

En verano, en cambio se reducen las concentraciones de marbofloxacin; por aplicación endovenosa y oral la disminución alcanza el 35 y 27%, respectivamente en relación

a los valores de primavera. También decrece por vía endovenosa un 61% la $C_{m\acute{a}x}$ y por vía oral un 11%, con una rápida salida desde músculo, con un $t_{1/2\beta}$ no mayor a 5,1 horas, con ambas vías. Mientras que en verano, el ingreso del fármaco no presenta diferencias significativas con la estación primaveral pero aun así el ABC es significativamente menor y concuerda con el aumento en la velocidad de eliminación, según expresan la disminución en la vida media de eliminación y el TMR.

5.3 Período de carencia y construcción de modelo

A partir de las concentraciones marbofloxacina promedio obtenidas en músculo de pollos parrilleros por dosis oral, más los parámetros farmacocinéticos promedio por época, se llevó a cabo la determinación del periodo de carencia. Se efectuó una modificación del modelo propuesto por Riviere y Sundlof (2009) y Riviere (2011), ya que en vez de utilizar la concentración cero en músculo, utilizamos el intercepto de la fase de eliminación (C_0), mientras que los otros parámetros se determinaron tal cual lo propone la literatura.

Se calculó para la época control (primavera) el periodo de carencia para marbofloxacina en músculo reemplazando los parámetros obtenidos en esta época en la siguiente ecuación (28):

$$PC = 1,44 * \ln\left(\frac{1,9}{0,15}\right) * 15,27$$

(28)

Como resultado se obtuvo 56,28 horas, lo cual equivale a 2,3 días. Dado que FDA y EMEA proponen que debe establecerse en un número de días cerrado, es por ello que se estableció en 3 días como el periodo de carencia de marbofloxacina en pollos parrilleros en primavera.

En verano, al igual que la época anterior se reemplazaron los números en la siguiente ecuación (29):

$$Pc = 1,44 * \ln\left(\frac{1,2}{0,15}\right) * 9,54$$

(29)

Determinando un total de 29,56 horas, lo cual equivale a 1,23 días, estableciendo un periodo de carencia de 2 días.

En la temporada invernal, similar a a las otras estaciones, se reemplazaron los números en la ecuación (30):

$$PR = 1,44 * \ln\left(\frac{1,9}{0,15}\right) * 22,22$$

(30)

En invierno por su parte se obtuvo como resultado 81,89 horas, lo cual equivale a 3,4 días por ende el periodo de carencia es de 4 días.

Para verificar los resultados y determinar el período de carencia de marbofloxacina aplicada por vía oral en pollos parrilleros a una dosis de 2 mg/kg se utilizó el programa WT 1.4 de la EMEA, resultando que el periodo de retiro para verano fue de 2 días, para primavera de 3 y para invierno de 4, lo que confirma que el modelo predictivo a partir de la modificación de la ecuación de Riviere y Sundlof (2009), es confiable y seguro para establecer un alimento inocuo para el consumidor.

CAPITULO 6. DISCUSIÓN

6.1 Validación del método de extracción y cuantificación

La cromatografía líquida asociada a detección ultravioleta o fluorescencia está indicada para cuantificar fluoroquinolonas en plasma y tejidos de pollo (Aerts *et. al*, 1995; Hernández-Arteseros *et al*, 2002; Reig y Toldrá, 2009) debido que ofrece sensibilidad suficiente (Carlucci, 1998; Marzo y Dal Bo, 1998); en nuestro ensayo los límites de detección y cuantificación se situaron en 0,002 µg/ml y 0,003 µg/g (LD) y 0,006 µg/ml y 0,007 µg/g (LQ) en plasma y músculo, respectivamente, los cuales son inferiores a los comunicados por otros autores para LQ en plasma, que va entre 0,01 a 0,035 µg/ml (Yorke y Forc, 2000; Anadón *et. al*, 2002; Ding *et. al*, 2013).

Los resultados obtenidos en los ensayos de validación confirman la suficiencia de los procedimientos destinados a extraer el analito del plasma utilizando en la extracción metanol como solvente polar seguido de centrifugación (Marzo y Dal Bo, 1998; Bailac *et. al*, 2004).

En el tejido muscular, la extracción se materializó con una solución de homegeneización conformada por metanol como solvente polar, agua y ácido perclórico al 70% (500:500:20 v/v/v), modificando la solución sugerida por Böttcher y colaboradores (2001), integrada por agua, metanol, ácido perclórico y ácido fosfórico, debido que la primera ofreció mejores resultados en la elusión por HPLC, en concordancia a lo reportado por Marzo y Dal Bo (1998) y Maraschiello y colaboradores (2001). El conjunto fue homogenizado mecánicamente, estacionado en frío durante 12 horas, centrifugado a 4 °C, el sobrenadante filtrado y luego utilizado para la elusión por HPLC (Aerts *et. al*, 1995; Böttcher *et. al*, 2001).

Considerando la complejidad de las matrices estudiadas (Aerts *et. al*, 1995; Reig y Toldrá, 2009) y que la etapa de extracción representa un inconveniente importante cuando se pretende determinar fluoroquinolonas por su carácter anfótero (Marzo y Dal Bo, 1998), el procedimiento de extracción empleado para remover macromoléculas en muestras de plasma y/o músculo fue adecuado (Aerts *et. al*, 1995; Hassouan, 2006) por cuanto no requiere mucho tiempo, es poco complejo, no demanda equipamiento especial y evita procesos más complicados que requieren gran cantidad de solventes orgánicos (Aerts *et. al*, 1995; Idowu y Peggins, 2004; Verdón *et. al*, 2005).

Asumiendo que cada fluoroquinolona posee características particulares que condicionan los procedimientos para la extracción y cuantificación (Andreu *et. al*, 2007), en este estudio la separación de marbofloxacina en plasma y musculo de pollo por HPLC se desarrolló mediante una elusión isocrática en fase reversa utilizando columna C18 y lectura en detector de fluorescencia, estableciendo la longitud de onda de excitación a 295 nm y la de emisión a 490 nm, tal como lo reportan Böttcher y colaboradores (2001), debido a que se lograron mejores resultados frente a otras longitudes de onda sugeridas por Verdón y colaboradores (2005).

El procedimiento aplicado en esta experiencia fue adaptado de Böttcher y colaboradores (2001), modificando el contenido sugerido de la fase móvil: agua deionizada: metanol: trietilamina 75:25:4 v/v/v, por la composición 79:20:1 v/v/v. La fase móvil fue ajustada a pH 3.0, debido que la mejor respuesta a la fluorescencia de las fluoroquinolonas se observa en pH bajo (Carlucchi, 1998). La fase móvil fue conformada por agua, acetonitrilo, el cual e mejora la selectividad (Carlucchi, 1998; Yorke y Froc, 2000; Bailac *et. al*, 2004; Verdón *et. al*, 2005) y trietilamina, incorporada con el objetivo de modular la retención de los picos y evitar interferencias en el cromatograma que dificulten la determinación de marbofloxacina (Marzo y Dal Bo, 1998; Maraschiello *et. al*, 2001).

Según Aerts y colaboradores (1995), Pereira (2009) y Talero-Pérez y colaboradores (2014), el método de análisis utilizado, además de sensible, que es un factor crítico sobre todo cuando se pretende establecer residuos, debe ser específico y preciso; según indica la tabla 3, los coeficientes de regresión de las concentraciones de marbofloxacina establecidos en las matrices estudiadas ($r^2= 0,99$), avalan la confiabilidad de las curvas de calibración utilizadas en los cálculos de concentración del analito en las muestras problema.

En los ensayos de precisión de intradía e interdía en plasma y músculo (tablas 5 y 6), se estimaron coeficientes de variación menores a 1,71 y 1,73%, respectivamente. Los resultados obtenidos, muy inferiores a los 5,7 a 15,5% establecidos por Yorke y Froc (2000), Anadón y colaboradores (2002), Ding y colaboradores (2013) y Yang y colaboradores (2014) tras la aplicación de métodos de extracción más complejos que demandan gran cantidad de reactivos y procedimientos tales como evaporación con nitrógeno a 30 °C, confirman la precisión del método analítico implementado (Aerts *et. al*, 1995).

La recuperabilidad establecida en músculo ($87,6 \pm 6,9\%$), excede a la reportada por otros autores que oscila en un rango del 70 al 85% (Yorke y Forc, 2000; Anadón *et. al*, 2002; Ding *et. al*, 2013), mientras que en plasma ($86,2 \pm 3,7\%$) es inferior a la comunicada por Ding y colaboradores (2013) de 91,6 a 98,7% y por Yang y colaboradores (2014) de 88,5 a 95,1%, y mayor a la informada por Anadón y colaboradores (2002), que no excede el 84%.

El método de HPLC empleado en este trabajo para investigar la disposición de marbofloxacina en plasma y músculo de pollos es simple y económico, permite cuantificar el antimicrobiano hasta las 24 horas siguientes a la aplicación intravenosa y luego de la aplicación oral, desde los 15 minutos hasta las 48 (primavera y verano) y 72 horas (invierno) posteriores.

6.2 Disposición plasmática y muscular de marbofloxacina en “temperatura confort”

Aunque el perfil de disposición de marbofloxacina es bien conocido en los mamíferos domésticos (Schneider *et. al*, 2014; Karademir *et. al*, 2017; Lorenzutti *et. al*, 2017; Paulin *et. al*, 2017), en la literatura los antecedentes farmacocinéticos en pollos parrilleros son limitados; las únicas referencias disponibles provienen de estudios realizados en individuos sanos (Anadón *et. al*, 2002) y/o infectados por *Pasturella multocida* (Huang *et. al*, 2003), *Mycoplasma gallispticum* (Ding *et. al*, 2013) y *Escherichia coli* (El-Komy *et. al* 2016).

En las aves tratadas con marbofloxacina no se observaron reacciones adversas de ninguna naturaleza, en concordancia con el perfil de seguridad exhibido por el conjunto de fluoroquinolonas (Martínez *et. al*, 2006; Gupta *et. al*, 2012; Giguère y Dowling, 2013) y con los antecedentes toxicológicos de este antimicrobiano en los animales domésticos (Rubio Langre, 2011; Fernández Palacios O'Connor, 2013; Papich, 2016).

El diseño experimental implementado resultó adecuado; a partir de los promedios obtenidos de concentraciones temporales en plasma y/o músculo, fue posible estudiar la disposición de marbofloxacina en pollos luego de la aplicación única de 2 mg/kg por vía oral e intravenosa.

El modelo poblacional, en sustitución del diseño cinético tradicional que contempla la toma de muestras seriadas en una cantidad reducida de animales, habitualmente seis (De Backer, 2006; Modric, 2014), es valioso por cuanto el análisis de muestras temporales de plasma y músculo procedentes de diferentes animales permite eludir variaciones adjudicadas al sexo, tamaño, patologías y/o estado nutricional de los animales, y aportar información más próxima a situaciones reales (Martín-Jiménez y Riviere, 1998; Lees *et. al*, 2008).

El programa farmacocinético PK Solution versión 2.0 (Farrier, 1999) utilizado para procesar datos de concentraciones plasmáticas y musculares versus tiempo fue adecuado para interpretar las curvas de disposición plasmática y muscular de marbofloxacina en pollos mediante un modelo no compartimental (Houin, 1990; Santoch, 2010; Modric, 2014), ajustándose a una ecuación biexponencial en el análisis de la curva por aplicación intravenosa en plasma y triexponencial tras la administración oral en plasma y músculo y por aplicación endovenosa en músculo, con coeficientes de correlaciones (r^2) promedios 0,95 y 0,91 para los análisis de las curvas en plasma y músculo, respectivamente. Estos coeficientes de correlación son aceptables, según el modelo cinético poblacional implementado.

Tras la aplicación intravenosa de marbofloxacina en el grupo control (tabla 8, figura 20), se observa una rápida distribución desde el compartimento central similar a lo informado con varias fluoroquinolonas utilizadas en aves (Anadón *et. al*, 1992; Anadón *et. al*, 2001; Bugyei *et. al*, 1999; Ding *et. al*, 2008) y en estudios realizados con marbofloxacina en patos Muscovy (Yuan *et. al*, 2011), codornices (Aboubakr y Albelazem, 2015) y pollos (El Komy *et. al*, 2016).

La distribución tisular es relevante, según sugiere el valor de V_d área obtenido en primavera de 3,7 L/kg, superior al informado en pollos con ofloxacina (Kalaiselvi *et. al*, 2006), norfloxacina (Anadón *et. al*, 1992) y difloxacina (Ding *et. al*, 2008) y menor al reportado con enrofloxacina (Anadon *et. al*, 1995) y danofloxacina (Knoll *et. al*, 1999).

El valor de V_d establecido en primavera en pollos excede ampliamente el comunicado con marbofloxacina en pavos (Haritova *et. al.*, 2006), en patos (Goudah y Hasabelnaby, 2010; Yuan *et. al.*, 2011), en codornices (Haritova *et. al.*, 2013; Aboubakr y Albelazem, 2015; Lashev *et. al.*, 2015), faisanes (Lashev *et. al.*, 2015) y en pollos parrilleros (Anadón *et. al.*, 2002; Huang *et. al.*, 2003; El Komy *et. al.*, 2016).

Marbofloxacina experimenta moderada permanencia en el organismo, con una semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) luego de la administración endovenosa de 6,5 horas, similar al conjunto de fluoroquinolonas utilizadas en pollos (Anadón *et. al.*, 1993; Anadón *et. al.*, 1992; Anadón *et. al.*, 1995; Knoll *et. al.*, 1999; Anadón *et. al.*, 2001; Ding *et. al.*, 2008). El $t_{1/2\beta}$ obtenido por aplicación endovenosa en época primaveral de 6,5 horas es igual al reportado por Huang y colaboradores (2003) en su estudio en pollos, además se encuentra entre el rango registrado por otros autores entre 5,2 a 7,6 horas, en pollos (Anadón *et. al.*, 2002; El-Komy *et. al.*, 2016), mientras que es menor a lo registrado en pavos y faisanes (Haritova *et. al.*, 2006; Lashev *et. al.*, 2015).

El TMR observado por vía EV en el ensayo de primavera fue de 6,7 horas, siendo menor al informado en pollos con norfloxacin (Anadón *et al.*, 1992) y enrofloxacin (Anadón *et. al.*, 1995). Por su parte, este valor fue superior al reportado para marbofloxacin en otros estudios realizados en pollos, donde el valor se encontraba entre 4,3 a 5,6 horas (Anadón *et. al.*, 2002; Huang *et. al.*, 2003; El-Komy *et. al.*, 2016), así como en patos y codornices, con valores de entre 1,5 a 3,1 horas (Goudah y Hasabelnaby, 2010; Aboubakr y Albelazem, 2015), mientras que fue menor al registrado en faisanes, donde alcanzó 7,5 horas (Lashev *et. al.*, 2015)

El valor de Cl_t establecido por vía intravenosa fue de 6,6 ml/min/kg, menor al hallado con marbofloxacin en codornices (Haritova *et. al.*, 2013; Lashev *et. al.*, 2015), faisanes (Lashev *et. al.*, 2015), pero superior al determinado en pavos (Haritova *et. al.*, 2006), patos Moscovy (Goudah y Hasabelnaby, 2010; Yuan *et. al.*, 2011), y pollos, donde osciló entre 1,5 a 3,1 ml/min/kg (Anadón *et. al.*, 2002, Huang *et. al.*, 2003; El-Komy *et. al.*, 2016).

La aplicación oral de 2 mg/kg marbofloxacina en pollos durante la primavera en condiciones de ayuno previo de 12 horas determinó pronta absorción según revela el $t_{1/2abs}$ de 0,15 horas, inferior a los valores comunicados con otras fluoroquinolonas de uso avícola (Anadón *et. al.*, 1995; Laczay *et. al.*, 1998; Errecalde *et. al.*, 2017) y con marbofloxacina en pollos parrilleros de 0,4 a 0,6 horas (Anadón *et. al.*, 2002; Huang *et. al.*, 2003; El-Komy *et. al.*, 2016). El ayuno de 12 horas previo a la administración de marbofloxacina, con el propósito de evitar interferencias de iones bivalentes de origen alimentario que promueven la formación de quelatos insolubles (Čonkova *et. al.*, 2009), podría ser determinante en cuanto al breve $t_{1/2abs}$ establecido en este estudio. Conforme a la rápida disolución en el medio intestinal que caracteriza a las fluoroquinolonas (Giguère y Dowling, 2013), los inmediatos niveles plasmáticos de marbofloxacina establecidos tras la administración oral, similar a lo reportado en pollos parrilleros (Anadón *et. al.*, 2002; Huang *et. al.*, 2003), persisten hasta las 48 y 72 horas siguientes según la estación del año, en contraste a lo informado por Yang y colaboradores (2014), que sólo cuantificaron el antimicrobiano hasta las 16 horas post aplicación.

El $C_{m\acute{a}x}$ obtenido tras la administración oral de 2 mg/kg de marbofloxacina en pollos en primavera fue de 0,8 $\mu\text{g/ml}$ a la hora post-aplicación. Este valor es inferior al reportado en otros estudios realizados con este antimicrobiano a la misma dosis en otras especies, así en patos, codornices y faisanes los valores van desde 1,1 a 3 $\mu\text{g/ml}$ registrándose antes de las 2 horas (Goudah y Hasabelnaby, 2010; Yuan *et. al.*, 2011; Haritova *et. al.*, 2013; Lashev *et. al.*, 2015), pero superior al registrado en pavos, 0,6 $\mu\text{g/ml}$ a las 6 horas (Haritova *et. al.*, 2006). Si se compara este resultado con lo reportado en pollos parrilleros, tenemos que Anadón y colaboradores (2002) obtuvieron un valor de 1,05 $\mu\text{g/ml}$ a las 1,4 horas, mientras que otros autores reportaron entre 1,15 a 1,83 $\mu\text{g/ml}$ entre las 1,3 a 2,5 horas post administración (Huang *et. al.*, 2003; El-Komy *et. al.*, 2016).

El ABC establecido en pollos tras la aplicación oral en primavera alcanza a 4,7 $\mu\text{g-h/ml}$, un poco menor al reportado por Anadón y colaboradores (2002) en pollos de 6,7 $\mu\text{g-h/ml}$, mientras que es mucho menor al observado por Huang y colaboradores de 12,3 $\mu\text{g-h/ml}$ y El-Komy y colaboradores (2016) de 16,8 $\mu\text{g-h/ml}$, mientras que en codornices y faisanes son

mucho menores entre 1,5 a 2,8 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, respectivamente. La biodisponibilidad (F) oral en primavera fue del 94% es decir en situación ideal de producción, mayor a la reportada por la mayoría de los estudios desarrollados bajo estas condiciones con marbofloxacin en pollos que oscilan entre 56,8 y 73,5 % (Anadón *et. al*, 2002; El-Komy *et. al*, 2016), excepto el 95% reportados por Huang y colaboradores (2003). Mientras en patos, pavos, codornices fluctúan entre 84,3 y 118,5% (Haritova *et. al*, 2006; Yuan *et. al*, 2011; Aboubakr y Abdelazem, 2015; Lashev *et. al*, 2015).

Luego de la aplicación oral de marbofloxacin en primavera exhibe pronta distribución ($t_{1/2\alpha}$ = 2,8 horas) y moderada permanencia en el organismo, según refiere el $t_{1/2\beta}$ de 4,6 horas, este valor es menor al informado en pavos de 7,7 horas (Haritova *et. al*, 2006), codornices de 6,7 horas (Aboubakr y Albelazem, 2015), faisanes de 6,6 horas (Lashev *et. al*, 2015), pollos entre 6,4 a 9,9 horas (Anadón *et. al*, 2002; Huang *et. al*, 2003; El-Komy *et. al*, 2016) y superior al comunicado en patos entre 2,6 a 2,8 horas (Goudah y Hasabelnaby, 2010, Yuan *et. al*, 2011) y codornices de 3,5 horas (Lashev *et. al*, 2015). El valor de TMR de marbofloxacin por aplicación oral en pollos en primavera es de 4,8 horas, similar al reportado por Yang y colaboradores (2014) de 5,3 horas en pollos, pero menor al informado por Anadón y colaboradores (2002) y Huang y colaboradores (2003) de 9,6 y 11,9 horas, respectivamente. Además, es menor al registrados en pavos de 9,01 horas (Haritova *et. al* 2006) y mayor al observado en patos de 3,8 (Goudah y Hasabelnaby, 2010), esto refiere que los datos cinéticos de eliminación del fármaco en este estudio, prosigue la misma descripción obtenidas por otros autores, tanto en pollos como otras especies aviares.

La disposición tisular de marbofloxacin es consistente con su liposolubilidad, favorecida por el anillo piperacínico incorporado en la molécula (Fernández Palacios O'Connor, 2013), el carácter anfótero (Marzo y Dal Bo, 1998; Lambert *et. al*, 2007) y el pKa que implican escasa ionización en el pH plasmático (Sörgel y Kinzig, 1993) y la reducida afinidad que exhibe por las proteínas plasmáticas (Papich y Riviere, 2009; Escudero y Marín Carrillo, 2015). Esta alta disponibilidad muscular por vía oral se ve reflejada en el índice $C_{\text{máx}_{\text{mus}}}/C_{\text{máx}_{\text{plasma}}}$, (1,2) y el índice de $ABC_{\text{mus}}/ABC_{\text{plasma}}$, (1,5), lo cual refleja el aumento de

las concentraciones musculares en comparación a las plasmáticas. Estos índices fueron similares a los observados por Ding y colaboradores (2013) entre músculo y plasma en pollos, los cuales informaron para $ABC_{\text{mus}}/ABC_{\text{plasma}}$ 2,1 y para $C_{\text{máx,mus}}/C_{\text{máx,plasma}}$ 1,06.

Se registraron $t_{1/2\beta}$ tisulares por vía endovenosa de 6,8 horas y por vía oral de 7,3 horas, esta última fue mayor a la registrada por Yang y colaboradores (2014), de 3,9 horas. Por otro lado, este autor determinó marbofloxacin en músculo hasta las 16 horas post aplicación y Anadón y colaboradores (2002) sólo hasta 24 horas post aplicación, mientras que en este estudio por vía endovenosa y vía oral se registraron concentraciones hasta 24 y 48 horas, respectivamente. En síntesis, marbofloxacin experimenta una lenta eliminación y notable disposición tisular, lo cual se debe a la reducida unión a proteínas plasmáticas, además de poseer características físico-químicas tales como liposolubilidad y carácter anfótero que determinan escasa ionización en sangre y facilitan el pasaje a través de membranas (Anadón *et. al*, 2002; Baggot, 2002; Giguère y Dowling 2013; Yang *et. al*, 2014).

6.3 Disposición plasmática y muscular de marbofloxacin en distinta época del año.

Luego de la aplicación intravenosa, marbofloxacin presenta menor distribución tisular en la estación invernal, según el V_d obtenido en esta época (2,7 l/kg), respecto al registrado en primavera (3,7 l/kg) y verano (3,5 l/kg). Estas diferencias podrían resultar de la vasoconstricción inducida en las aves a menor temperatura (Brake y Yahav, 2012). Asimismo, el aclaramiento de marbofloxacin por ambas vías fue superior en verano (+14%), respecto a las otras estaciones, como resultado de cambios fisiológicos inducidos para disipar el exceso de calor no evaporativo, como el aumento en el consumo de agua y mayor producción de orina (Estrada y Márquez, 2005; Yahav, 2015). El cotejo de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin obtenidas en pollos en distintas estaciones del año revela que la absorción por vía oral fue menor en época estival e invernal respecto a lo encontrado en primavera, con una disminución entre el 44 y 46 %.

Asimismo, la biodisponibilidad (F) decrece del 94, al 86 y 78% en primavera, verano e invierno, respectivamente. A pesar que no existen trabajos desarrollados que describan

variaciones farmacocinéticas en pollos parrilleros en distintas condiciones ambientales, en estudios en pollos infectados con *Pasteurella multocida*, se reporta menor biodisponibilidad oral de marbofloxacina, que decrece desde un 95 al 83% en animales sanos e infectados, respectivamente (Huang *et. al*, 2003), mientras que pollos infectados con *E. coli* obtuvieron el primer día de aplicación oral una biodisponibilidad del 55,3%, en cambio en los animales sanos asciende al 73,5 % (El-Komy *et. al*, 2016). Las diferencias conseguidas en la biodisponibilidad tanto en esta investigación como en otras, están estrechamente relacionadas con los valores reportados en el ABC plasmático de marbofloxacina aplicada por vía oral, observándose una disminución del ABC en un 25% en verano (3,7 µg-h/ml), respecto de primavera (4,7 µg-h/ml), esto se corresponde con experiencias realizadas con marbofloxacina en pollos infectados con *E. coli* que arrojaron una disminución del ABC (- 29,6 %), en el primer día de tratamiento, lo cual se puede deber a los cambios fisiológicos ejercidos en ambas situaciones de estrés para el ave (El-Komy *et. al*, 2016).

Los pollos en época estival y con aplicación oral del fármaco, registraron una $C_{m\acute{a}x}$ plasmática un 12,5% menor al provisto en primavera, mientras en invierno la disminución alcanzó el 37,5%, esta inferior magnitud y ritmo en el proceso de absorción, también se ve reflejada en los valores de $t_{1/2abs}$, que son mayores en la estación estival (0,8 horas) e invernal (0,7 horas) respect a primavera (0,2 horas), ello demuestra una absorción reducida o postergada, sumada a la menor biodisponibilidad oral de marbofloxacina observada fuera de la condición de neutralidad térmica, estos cambios en la absorción pueden deberse a la depresión de los movimientos peristálticos del buche, que provoca el acumulo de alimento en el divertículo digestivo, y también el peristaltismo del intestino delgado, por lo tanto la menor actividad digestiva podría determinar absorción mas lenta, tanto en épocas de calor como de frío (Whitton, 1968; Hai *et. al*, 2000). Además, se ha reportado daño en los enterocitos ejercido por el estrés térmico en los pollos parrilleros, que se evidencia a partir de los 24 °C y que progresa con alteraciones de la mucosa intestinal, y capacidad de absorción reducida de estas células (Quinteiro-Filho *et. al*, 2010; 2012).

La semivida de eliminación de marbofloxacina aplicada por vía oral es mayor en invierno (7,6 horas), respecto a la estación primaveral (4,7 horas), lo cual acuerda con el TMR

de 9,6 horas de invierno, situación que expresa mayor persistencia del fármaco en pollos expuestos a bajas temperaturas, coincidiendo con los cambios fisiológicos como marcada vasoconstricción periférica, mayor viscosidad sanguínea y aumento del flujo al compartimento central (corazón, pulmones, hígado) que se observan con temperatura ambiental reducida (Whitton, 1968; Brake y Yahav, 2012; Yahav, 2015). Dado que esto no acontece tras la administración endovenosa, estas diferencias térmicas posiblemente influyan en el proceso de absorción y condiciones de modo indirecto la eliminación.

Estos antecedentes semejan con los exhibidos en animales expuestos a situaciones que lo desplazan de su normotermia o estado fisiológico normal, tal como reportaron en ovejas luego de la aplicación de sulfadimidina en verano e invierno Nawaz y Nawaz (1983), en conejos y terneros febriles y afebriles tratados con ciprofloxacina (Ahangar y Srivastacva, 2000; Rajput *et. al*, 2011; Sajid *et. al*, 2008; Zulfiqar-Ul-Hassan y Naseer, 2008), en terneros en idéntica condición (Ahangar y Srivastacva, 2000; Rajput *et. al*, 2011), aun las respuestas cinéticas son dispares y de interpretación compleja, lo que es natural por cuanto los mecanismos fisiológicos involucrados varían cuali-cuantitivamente según la especie (De Backer, 2006).

En músculo, tanto por aplicación endovenosa y oral de marbofloxacina se observaron diferencias en las concentraciones tisulares totales, con reducción del 35% en verano, y en invierno aumento un 67% por vía endovenosa, mientras por vía oral, en verano disminuyó un 27 % y en invierno aumentaron un 37%. Tanto en primavera como en verano marbofloxacina se detectó en músculo hasta las 48 horas y en invierno hasta las 72 horas post-administración. Esto corresponde con la disminución del $C_{m\acute{a}x}$ en época estival por ambas vías (+11 al 39%), mientras que en invierno estos aumentan (+23 al 31%) y exhibe un $T_{m\acute{a}x}$ a las 2 horas en todas las estaciones, resultados que coincidan con lo determinado por Ding y colaboradores (2013), en animales infectados con *Mycoplasma gallisepticum* y *Escherichia coli*, que reportan un $T_{m\acute{a}x}$ de 2 horas.

En el músculo, tras la aplicación oral en época invernal se observa un importante acúmulo del antimicrobiano, siendo el cociente $ABC_{m\acute{u}s}/ABC_{plasma}$ de 3,1, el cuál es mayor al

determinado en primavera (1,5). También se observa un enlentecimiento en el ingreso y en la depleción del fármaco en el tejido estudiado, con vida media de ingreso de 1,3 horas y $t_{1/2\beta}$ de 13,1 horas, situación que se relaciona con lo descrito por Yahav (2015) y por Whitton (1968), quienes señalan que en épocas de frío para disminuir las pérdidas de calor innecesarias el organismo enlentece el sistema digestivo y menor velocidad del flujo sanguíneo. En situaciones estivales por esta misma vía sucede lo contrario, se observa un $t_{1/2\beta}$ de 4,5 horas, con reducción en los valores de ABC y TMR respecto a primavera e invierno, que se corresponden con aumento de la velocidad del flujo sanguíneo en situaciones de calor (Castelló Llobet, 1993) y posiblemente se vincule al daño sobre la morfología de las células intestinales que disminuyen la capacidad de absorción, según Quinteiro-Filho y colaboradores (2010; 2012).

Nawaz y Nawaz (1983), desarrollaron el único estudio sobre interacción del medio ambiente sobre la farmacocinética de antimicrobianos en animales en producción, quienes comunicaron mayor distribución y aclaramiento de sulfadimidina en ovejas en verano en comparación a invierno, que coinciden con los hallazgos expuestos tras la aplicación de marbofloxacin en verano. Vanakoski y Seppälä (1997) reportaron diferencias cinéticas con fármacos en humanos tras la exposición aguda a ambientes calurosos. En estas condiciones se produjo una reducción en el aclaramiento renal de tetraciclina en las primeras dos horas, sin otras diferencias significativas, en contraste a lo determinado en esta investigación en pollos parrilleros en época estival, posiblemente debido a que las personas fueron expuestas a un calor agudo sin ambientación previa, sin un ajuste de los sistemas fisiológicos para mantener la normotermia, con un proceso de deshidratación, que comienza a compensarse a las dos horas post-administración, mientras que los pollos no presentaron signos clínicos de deshidratación, ya que se les proporcionó agua *ad libitum*, pero como se describió anteriormente al ser una especie altamente productiva poseen baja capacidad de adaptabilidad lo que desencadena una cascada de respuestas fisiológicas, sobretudo en situaciones de calor crónico.

Las modificaciones fisiológicas inducidas en épocas estivales se pueden comparar con los animales con hipertermia: en mamíferos se observaron alteraciones cinéticas de diferentes

antibióticos, donde existen modificaciones del Clt, semivida de eliminación, de la persistencia del fármaco, de la C_{máx} y la biodisponibilidad, tanto en conejos como en terneros (Ahangar y Srivastava, 2000; Sajid *et. al*, 2008; Rajput *et. al*, 2010). Estos autores destacan la importancia de modificar el régimen de dosificación. Estos cambios concuerdan con los determinados en los pollos expuestos a altas temperaturas ambientales.

Mientras que en peces Sun y colaboradores (2013), administraron por vía endovenosa y oral difloxacina a *Paralichthys olivaceus* expuestos a temperaturas diferentes del agua (14 y 22 °C), donde observaron mayores diferencias por vía oral, con la temperatura mas elevada observaron valores de t_{1/2abs} de 1,51 horas y de t_{1/2β} de 3,09 horas, mientras que en la temperatura mas baja registraron tiempos mas extensos, un t_{1/2abs} de 2,38 horas y un t_{1/2β} de 4,41 horas, y una marcada disminución en la biodisponibilidad, al igual que nuestro estudio es mayor en altas temperaturas (68%) que en bajas (53%) y con una disminución del Vd en un 30%, en los peces expuestos a 14 °C, lo cual es similar a lo expuesto en esta investigación con una disminución del Vd en un 24%, en los pollos expuestos a bajas temperaturas. A pesar de que los peces son animales poiquilotermos, se observan cambios farmacocinéticos similares a los reportados en esta investigación dependientes de la temperatura a la que son expuestos los animales, lo cual estos investigadores lo relacionan a los cambios metabólicos observados en los peces durante las variaciones a las temperaturas del entorno.

El presente estudio es el primero que destaca los cambios farmacocinéticos en función de la temperatura ambiental y que redunda en la depleción muscular de pollos parrilleros en distintas épocas del año. Los resultados obtenidos en este estudio corroboran a la temperatura como factor ambiental crítico en avicultura (Estrada y Márquez, 2005; Lisboa, 2012), que no sólo condiciona aspectos ligados a la salud (Quinteiro-Filho *et. al*, 2010, 2012; Lara y Rostagno, 2013; Calefi *et. al*, 2014) y/o productividad animal (Lahoz, 2003; Estrada *et. al*, 2007; Olanrewaju *et. al*, 2010; Cunha, 2011; Lisboa 2012; Yahav, 2015) sino que induce adaptaciones fisiológicas en el organismo que influyen el perfil cinético de fármacos. Esta situación requiere profundizar el impacto de los factores ambiental sobre el perfil cinético de fluoroquinolonas, considerando que estas sustancias son recursos muy utilizados en aves (Gouvêa *et. al*, 2015) y que su empleo inadecuado se condice con la manifestación de resistencia bacteriana (Baggot, 2002; Lorenzutti, 2017).

6.4 Periodo de carencia

El periodo de carencia estimado con el modelo matemático de Riviere y Sundlof (2009) modificado, y validado por el programa WT 1.4 (Hekman, 1996), luego de la aplicación de una dosis oral única de 2 mg/kg de marbofloxacin fue en primavera de 3 días. Este valor es similar al estimado por Anadón y colaboradores (2002), también empleando el programa WT 1.4, mientras que Yang y colaboradores (2014) con el mismo programa obtuvieron como resultado 23,6 horas, pero al reestablecerlo con un modelo poblacional fisiológico farmacocinético (PBPK) fue igual al determinado en este estudio de 3 días.

En verano el periodo de carencia se redujo a 2 días, mientras que en invierno fue de 4 días. Aún cuando se presentan diferencias para garantizar un alimento inocuo al consumidor, en todos los casos son periodos de tiempo razonables y compatibles con la brevedad de los ciclos productivos de pollos parrilleros, ya que la duración del periodo de carencia prefaena es fundamental para escoger un antibiótico en la avicultura (Anadón *et. al*, 2009).

Los valores estimados en el periodo de carencia son inferiores a los comunicados con otras fluoroquinolonas de segunda generación en pollos, tales como enrofloxacin de 3 a 12 días (Anadón *et. al*, 1995; El Aziz *et. al*, 1997; Da Silva *et. al*, 2006), ciprofloxacin de 10 días (Anadón *et. al*, 2001), danofloxacin de 4 días (Errecalde *et. al*, 2017), norfloxacin de 12 días (Anadón *et. al*, 1992), difloxacin de 5 días (Anadón *et. al*, 2011) y levofloxacin de 8 días (Kyuchukova *et. al*, 2013).

Teniendo en cuenta las propiedades microbiológicas de marbofloxacin (Spreng *et. al*, 1995; Papich, 2016), el bajo índice de resistencias bacteriana (El Garch *et. al*, 2017) y el perfil cinético exhibido, este antimicrobiano constituye una alternativa terapéutica muy interesante en avicultura, en coincidencia con las recomendaciones para explotaciones porcinas europeas, según Silva y Sousa (2017).

Los resultados obtenidos convalidan a los estudios cinéticos en animales domésticos como herramienta que aporta información tendiente al uso racional de fármacos (Houin, 1990;

Baggot, 2002; Beltrán, 2004), permitiendo además establecer la depleción de residuos en tejidos comestibles y estimar el periodo de carencia con el propósito de favorecer la seguridad alimentaria y ofrecer un alimento inocuo para el consumidor (Anadón, 2007; Lees y Toutain, 2012; Baynes y Riviere, 2014).

CAPITULO 7. CONCLUSIONES

- El método utilizado para la extracción de marbofloxacin en plasma y músculo de pollos parrilleros, mediante la incorporación de una nueva solución de homogenización de metanol:agua:ácido perclórico (500:500:20), fue más simple y de menor costo respecto a los métodos propuestos por otros investigadores para este analito.
- El método cromatográfico aplicado fue suficientemente sensible para estudios de disposición plasmática y muscular, y constituye una alternativa en los planes de monitoreo de residuos.
- Las concentraciones de marbofloxacin alcanzaron niveles mayores en músculo que en plasma, con una rápida absorción, amplia distribución y moderada permanencia plasmática. La depleción del fármaco en el tejido muscular fue lenta.
- Los parámetros farmacocinéticos estimados en plasma y músculo de pollo corresponden con lo descrito en sus propiedades físico-químicas, siendo compatibles con otras fluoroquinolonas comercializadas para pollos parrilleros.
- Se determinaron diferencias significativas tanto en las concentraciones plasmáticas como tisulares de marbofloxacin en función de la época del año, siendo menores en verano y mayores en invierno respecto a la época con temperatura de termoneutralidad (primavera), lo cual repercute en la depleción del fármaco.
- La cinética de eliminación de marbofloxacin en aves aplicada en distintas épocas del año sufre variaciones; las semividas de eliminación se acortan en verano y se extienden en invierno, lo que requiere ajustar el periodo de carencia del fármaco para garantizar un alimento inocuo para el consumidor final.

- Este estudio resulto innovador, ya que tiene en cuenta la implementación de los cambios fisiológicos que ejercen los factores ambientales en animales productivos, los cuales están estrechamente relacionados con la disposición de marbofloxacin con impacto en el manejo farmacológico y para garantizar un alimento inocuo al consumidor.
- Existe una vasta cantidad de información sobre los efectos del ambiente sobre los pollos parrilleros, sobretodo el efecto de la temperatura y la humedad relativa, pero se desconoce cómo pueden interferir con la farmacocinética de los antibióticos, herramientas terapéuticas de amplio uso en la avicultura, este es el primer estudio en relacionar esto, es por ello, que es imperioso que se desarrollen futuras investigaciones en este ámbito, para garantizar una eficacia terapéutica e inocuidad alimentaria.

Referencias bibliográficas

- Aboubakr, M. y Abdelazem A. M. (2015). Pharmacokinetics of marbofloxacin in Japanese quails (*Coturnix japonica*) after different routes of administration. *J. Amer. Sci.*: 11 (4): 305-308.
- Aerts, M., Hogemboom, A. y Brinkman, U. (1995). Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *J. Chromatogr. B.*: 667: 1-40.
- Agrawal, A. K., Singh, S. D. y Jayachandran, C. (2002). Comparative pharmacokinetics and dosage regimen of amikacin in afebrile and febrile goats. *Indian J Pharmacol.*: 34 (5): 356-360.
- Ahangar, A. H. y Srivastava, A. K. (2000). Pharmacokinetics of enrofloxacin in febrile cross-bred bovine calves. *Indian J. Pharmacol.*: 32 (5): 305-308.
- Anadón, A., Martínez-Larraña, M. y Fernández-Cruz, M. (1993). Considérations physiologiques et pharmacologiques en thérapeutique aviaire. *Rev Méd. Vét.*: 144 (10): 745-757.
- Anadón, A., Martínez-Larraña, M., Díaz M. J., Martínez, M.A., FREJO, M.T., MARTÍNEZ, M., TAFUR, M. y CASTELLANO, V.J. (2002). Pharmacokinetic characteristics and tissue residues for marbofloxacin and its metabolite N-desmethyl-marbofloxacin in broiler chickens. *A. J. V. R.*: (63): 927-933.
- Anadón, A., Martínez-Larraña, M., Díaz M., Bringas, P., Martínez, M., Fernández-CRUZ, M., Fernández, M. y Fernández, R. (1995) Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. *A.J.V.R.*: 56 (4): 501-506.
- Anadón, A., Martínez-Larraña, M., Iturbe, J., Martínez, M., Díaz, M., Frejo, M. y Martínez, M. (2001) Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.*: 71 (2):101-109.
- Anadón, A., Martínez-Larraña, M., Velez, C., Díaz, M. y Bringas, P. (1992) Pharmacokinetics of norfloxacin and its N-desethyl- and oxo-metabolites in broiler chickens. *A.J.V.R.*: 53 (11): 2084-2089.
- Anadón, A., Suárez, F. H., Martínez, M. A., Castellano, V., Martínez, M., Ares, I. y Martínez-Larraña, M. R. (2011). Plasma disposition and tissue depletion of difloxacin and its metabolite sarafloxacin in the food producing animals, chickens for fattening. *Food Chem. Toxicol.*: 49 (2): 441-449.
- Anadón, A.R. (2007). Antibióticos de uso veterinario y su relación con la seguridad alimentaria y salud pública. Instituto de España Real Academia de Ciencias Veterinarias. Madrid. España.
- Anadón, A. y Martínez-Larraña, M. (1999). Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livest. Prod. Sci.* 59: 183-198.
- Andreu, V., Blasco, C. y Pico, Y. (2007). Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *Trends Anal. Chem.*: 26 (6): 534-556.

- Anjum, A. y Rizvi, F. (1998). Use of second generation of quinolones in poultry. *Pakistan J. Biol. Sci.*: 1 (4): 392-395.
- Antonovic, L. y Martinez, M. (2011). Role of the cytochrome P450 enzyme system in veterinary pharmacokinetics: where are we now? Where are we going?. *Fut. Med. Chem.*: 3 (7): 855-879.
- Baggot, J. D. (2002). Principios de biodisponibilidad y disposición de los fármacos antimicrobianos. En B. Prescott J., *En Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria* (págs. 43-76). Buenos Aires: (3 ed) Intermédica.
- Bailac, S., Ballesteros, O., Jiménez-Lozano, E., Barrón, D., Sanz-Nebot, V., Navalón, A. y Barbosa, J. (2004). Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. A.*: 1029 (1), 145-151.
- Baynes, R.E y Riviere, J.E. (2014). Importance of veterinary drug residues. En: *Strategies for Reducing Drug and Chemical Residues in Food Animals*. (Pag 1-7). New Jersey. USA. John Wiley & Sons, Inc.
- Beltrán, C. (2004). Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos utilidad práctica. *Rev.Chil. Infect.*: (1): 39-44.
- BOLETIN AVÍCOLA (2017). Enero - abril. Ministerio de agroindustria. Argentina. Pág 3-15.
- Boswell, F. J. y Wise, R. (1998). Advances in the macrolides and quinolones. *Infec. Dis. Clinic.*:12 (3) 647-670.
- Böttcher, S., Baum, H., Hoppe-Tychy, T. y Benz, C. (2001). An HPLC assay as a microbiological assay to determine levofloxacin in soft tissue, bone, bile and serum. *J Pharma Biomed Anals.*: (25): 197-203.
- Brake, J. y Yahav, S. (2012). Responses of poultry to environmental challenges. *Environmental physiology of livestock*. (17) 309-325. ED Collier J, New Dheli. India.
- Bueno, D.J., López, N., Rodríguez, F.I y Procura, F. (2016). Producción de pollos parrilleros en países sudamericanos y planes sanitarios nacionales para el control de *Salmonella* en dichos animales. *Rev. Agron. Noroeste Argent.*:36 (2): 11-37.
- Bugyei, K., Black, W. D. y Mcewen, S. (1999). Pharmacokinetics of enrofloxacin given by the oral, intravenous and intramuscular routes in broiler chickens. *C. J. V. R.*: 63 (3): 193.
- Butcher, G. y Miles, D. (2003). The avian immune system. *University of Florida. The Institute of Food and Agricultural Sciences Extension*. Pág. 1-2.
- Cahaner, A., Ajuh, A., Siegmund-Schultze, M., Azoula, Y., Y., Druyan, S. y Valle Zarate, S. (2008). Effects of the genetically reduced feather coverage in naked neck and featherless broilers on their performance under hot conditions. *J. Poult. Sci.*: (87): 2517-2527.

Calefi, A., Takashi, B., Costola-De-Souza, C., Siqueira, A., Namazu, L., Quinteiro-filho, W. y Palermo-Neto, J. (2014). Effects of long-term heat stress in an experimental model of avian necrotic enteritis. *Poult. Sci.* : (93): 1344-1353.

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

Castelló Llobet, J. (1993) Factores de confort en las aves: Termorregulación. En: Construcciones y equipos avícolas. Tecnograf S.A. Barcelona. España. Pag 29-24.

Castelló Llobet, J., Cedón Benet, R., Cepero, B., García Martínez, E., Pontes PonteS, M. y Vaquerizo Florez, J. (2002). *Producción de carne de pollo. Real Escuela de Avicultura.* Barcelona, España.

Chen, Z., Fang, K-F., Fang, B. y Song, Y. (1994). Antimicrobial and pharmacokinetic studies of fluoroquinolones in chickens. 6th Congress EAVPT, Edinburgh, Scotland: 209-210.

Coleman, M.D. (2007). Human drug metabolism. An introduction. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Čonkova, E., Čellarova, E., Vaczi, P. y Sabova, L. (2009). Quinolones from the point of view of pharmacology and veterinary indications. *A review. Folia Vet.*: (53) 4: 175-185.

Cunha, D. (2011) *Determinação das faixas de conforto térmico para frangos de corte de diferentes idades criados no Brasil.* (Tesis Doctoral). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. Brasil.

CVMP. Committee for veterinary medicinal products. (1996). Note for guidance. Approach towards harmonisation of withdrawal periods. EMEA/CVMP/036/96 final:1- 37.

De Backer, P. (2006). Comparative pharmacokinetics in avian species. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: 29 (Suppl 1): 243.

Da Silva, R. G., Reyes, F. G. R., Sartori, J. R. y Rath, S. (2006). Enrofloxacin assay validation and pharmacokinetics following a single oral dose in chickens. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: 29, (5): 365-372.

De Basilio, V., Requena, F., Leon, A., Vilarino, M. y Picard, M. (2003) Early age thermal conditioning immediately reduces body temperature of broiler chicks in a tropical environment. *Poult. Sci.*: (8): 1235-1242.

Denbow, M. (2000). Gastrointestinal anatomy and physiology. In: Whittow G.C. (Ed.) *Sturkie's Avian Physiology* (págs. 299-325), Fifth Ed. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Diaz David, D. C. (2012). *Comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en bovinos de diferentes edades y relación PK-PD frente a mastitis estafilocócicas.* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid. España.

Ding, H. Z., Yang, G. X., Huang, X. H., Chen, Z. L. y Zeng, Z. L. (2008). Pharmacokinetics of difloxacin in pigs and broilers following intravenous, intramuscular, and oral single-dose applications. *J. Vet Pharmacol. Therap.*: 31 (3): 200-204.

- Ding, H., Wang, L., Shen, X., Gu X., Zeng, D. y Zeng, Z. (2013). Plasma and tissue pharmacokinetics of marbofloxacin in experimentally infected chickens with *Mycoplasma gallisepticum* and *Escherichia coli*. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: (36): 511-515.
- Drugeon, H. B. y Thomas, V. (1997). Antibacterial activity of marbofloxacin vs. enrofloxacin in an in vitro model simulating the kinetic profile of the drugs in dogs. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: suppl 1: 138-139.
- Echavarrí, V. y De La Fuente, T. (2012). Las carnes de aves. Oficina de estudio y políticas agrarias. Ministerio de Agricultura y Ganadería de Chile.
- El Garch, F., Sauget, M., Hocquet, D., Lechaudee, D., Woehrle, F. y Bertrand, X. (2017). MCR-1 is borne by highly diverse *Escherichia coli* isolates since 2004 in food-producing animals in Europe. *Clin. Microbiol. Inf.*: 23 (1): 51-e1.
- El-Aziz, M. A., Aziz, M. A., Soliman, F. A. y Afify N. A. (1997). Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin in chickens. *Brit. Poul. Sci.*: 38 (2): 164-168.
- El-Komy, A., Attia, T., El Latif, A. A. y Fathy, H. (2016). Bioavailability pharmacokinetics and residues of marbofloxacin in normal and E. coli infected broiler chicken. *Int. J. Pharma. Toxicol.*: 4 (2): 144-149.
- EMA. (2000). EMA/CVMP/573/00-Final: Draft Volume 8, Notice to Applicants, Veterinary Medicinal Products: Establishment of Maximum Residue Limits (MRLs) for Residues of Veterinary Products in Foodstuffs of Animal Origin: Development and Validation of a Proposed Regulatory Method.
- EMA, (2002). 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C(2002) 3044
- Errecalde, C., Prieto, G., Bourel, B., Lüders, C., Tonini, M. y Rodríguez Triana, L. (2017). Disposition of danofloxacin in plasma and edible tissues of broiler chickens. *Rev. Med. Vet.*: (35): 103-111.
- Errecart, V. (2015). Análisis de mercado mundial de carnes. Escuela de economía y negocios. Universidad Nacional de San Martín. Argentina.
- Escudero, E. y Marín Carrillo, R. (2015). Capítulo 18: Antibióticos inhibidores de metabolismo intermediario e inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos. En: Botana L.M. *Farmacología Veterinaria: Fundamentos y Aplicaciones Terapéuticas* (pág. 373-378)
- Escudero, E., Espuny A., Vicente, S., y Carceles, C. M. (1999). Pharmacokinetics of an ampicillin-sulbactam combination after intravenous and intramuscular administration to sheep. *C. J. V. R.*: 63 (1): 25.
- Estrada, M., Marquez, S. y Restrepo, L. (2007) Efecto de la temperatura y humedad relativa en los parámetros productivos y la transferencia de calor en pollos de engorde. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.*: (20): 288-303.

- Estrada, P. y Márquez, G. (2005). Interacciones de factores ambientales con la respuesta del comportamiento productivo en pollos de engorde. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.*: (18): 256-273.
- Farrier, D.S. (1999). PK Solutions 2.0, Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis. Summit Research Services. Ashland, USA.
- Fernández Palacios O'connor, R. (2013). *Estudio farmacocinético de formulacionespoliméricas de liberación controlada para marbofloxacino en caprino*. Tesis Doctoral, Departamento de Farmacología, Universidad de Murcia, España.
- Furlan, R. (2006). Influência da temperatura na produção de frangos de corte. In: VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Chapecó. SC.Brasil.
- García, A. L. (2011). *Productores familiares y agricultura de contrato. Vínculos y estrategias en el caso de la avicultura entrerriana*. CONICET – INTA EEA Concepción del Uruguay. Instituto Nacional de Educación Tecnológica y MAG y P (2010). *Sector avícola. Informe final preliminar*.
- Gehring, R., Baynes, R. E., Craigmill, A. L. y Riviere, J. E. (2004). Feasibility of using half-life multipliers to estimate extended withdrawal intervals following the extralabel use of drugs in food-producing animals. *J. Food Protec.*: 67 (3): 555-560.
- Gibaldi, M. y Perrier, D. (1975). Pharmacokinetics. Universidad de Michigan, USA: 1 th edn, Ed Marcerl Dekker.
- Gigosos, P. G., Revesado, P. R., Cadahia, O., Fente, C. A., Vazquez, B. I., Franco, C. M., y Cepeda, A. (2000). Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromato. A.*: 871 (1): 31-36.
- Giguère, S. y Dowling, P. (2013). Chapter 18: Fluoroquinolones. En: Prescott J. & Dowling P. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (págs. 295-311). Iowa, USA: 5ed. John Wiley & Son.
- Glisson, J. R., Hofacre, C. L. y Mathis, G. F. (2004). Comparative efficacy of enrofloxacin, oxytetracycline, and sulfadimethoxine for the control of morbidity and mortality caused by *Escherichia coli* in broiler chickens. *Avi. Dis.*: 48 (3): 658-662.
- Goudah, A. y Hasabelnaby, S. (2010). The disposition of marbofloxacin after single dose intravenous, intramuscular and oral administration to Muscovy ducks. *J. Vet.Pharmacol. Therap.*: 34 (2): 197-201.
- Gouvêa, R., Dos Santos, F. F. y De Aquino, M. H. C. (2015). Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a review. *Rev. Br.a Ciênc. Avíc.*: 17 (1): 1-10.
- Guo, M., Bughio, S., Sun Y., Zhang, Y., Dong, L., Dai, X. y Wang, L. (2013). Age related Pglycoprotein expression in the intestine and affecting the pharmacokinetics of orally administrated enrofloxacin in broilers. *PloS one.*: 8 (9): e74150.
- Gupta, R., Sharma, K., Sharma, R., Gupta, D., Sachin, T. y Yadav, B. (2012). A review: pharmacokinetics application of fluoroquinolons. *I.J.P.P.R.*: 3 (2): 650-660.

- Hai, L., Rong, D y Zhang, Z. (2000) The effect of thermal environment on the digestion of broilers. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.*: (83): 57-64.
- Hao, H., Cheng, G., Iqbal, Z., Ai X., Hussain, H., Huang, L., Dai, M., Wang, Y., Liu, Z. y Yuan, Z. (2014). Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontier. Microbio.*: (5) 288.
- Haritova, A. M., Rusenova, N. V., Parvanov, P. R., Lashev, L. D., y Fink-GremmelS, J. (2006). Integration of pharmacokinetic and pharmacodynamic indices of marbofloxacin in turkeys. *Antimicrobio. Agent. Chemoth.*: 50 (11): 3779-3785.
- Haritova, A. M., Schrickx, J. y Fink-Gremmels, J. (2010). Expression of drug efflux transporters in poultry tissues. *Res. Vet. Sci.*: 89 (1): 104-107.
- Haritova, A., Dimitrova, D., Dinev, T., Moutafchieva, R. y Lashev, L. (2013). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin, danofloxacin, and marbofloxacin after intravenous and oral administration in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Avian Med. Surg.*: 27 (1): 23-31.
- Haritova, A. y Lashev, L. (2009). Comparison of the pharmacokinetics of seven fluoroquinolones in mammalian and bird species using allometric analysis. *Bulg. J. Vet. Med.*: 12 (1): 3-24.
- Hassouan, M. K. (2006). *Desarrollo de nueva metodología analítica para la determinación de quinolonas en alimentos de origen animal*. (Tesis Doctoral) Universidad de Granada. España.
- Hekman P. (1996) WT1.4 Withdrawal time calculation program. Freeware, distributed by the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA), London, UK.
- Hernández-Arteseros, J., Barbosa, J., Compañó, R. y Prat, M. (2002). Analysis of quinolone residues in edible animal products. *J. Chromatogr. A.*: 945: 1-24.
- Hilmi, H.T., Surakka, A., Apajalahti, J. y Saris, P. (2007). Identification of the most abundant Lactobacillus species in the crop of 1-and 5-week-old broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*: (73): 7867-7873.
- Hofacre, C.L., Fricke, J.A. y Inglis, T. (2013) Antimicrobial Drug Use in Poultry. En B. D. GIGUERÉ S. PRESCOTT, *En Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (págs. 569-584). IOWA, USA: V (ed), Blackwell Publ.
- Houin, G. (1990). Notion générales de pharmacocinétique: approches physiologique et mathématique. *Ann. Rech. Vét.*: (1): 3-9.
- Hourriet, J.L. (2007). Guía práctica de enfermedades más comunes en aves de corral (ponedoras y pollos). *Sitio Argentino de Producción Animal*. INTA EEA Cerro Azul, Misiones. *Miscelánea N° 58*, 48.
- Huang, X., Chen, Z., Zhang, S. y Zeng, Z. (2003). Influence of experimentally *Pasteurella multocida* infection on the pharmacokinetics of marbofloxacin in broiler chickens. *Acta Vet. Zoothe. Sin.*: (34): 98-102.

IBM. Corp. Released. (2012). IBM SPSS Statistics for Windows, versión 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Idowu, O. y 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. (2006). A pharmacokinetic study of danofloxacin in febrile goats following repeated administration of endotoxin. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: 29 (4): 313-316.

Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clini. Infect. Diseases.*: 41 (Suppl 2): S120-S126.

Kalaiselvi, L., Sriranjani, D., Ramesh, S., Sriram, P., y Mathuram, L. N. (2006). Pharmacokinetics of ofloxacin in broiler chicken. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: 29 (3): 185-189.

Karademir, U., Boyacioglu, M., Kum, C. y Sekkin, S. (2015). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin, danofloxacin and marbofloxacin following intramuscular administration in sheep. *Small Rumin. Re.*: 133:108-111

Keiddine, F.D (2015). *Área de consolidación gestión de la producción de agroalimentos: Análisis de buenas prácticas de manufactura e inversión en una planta faenadora de pollos parrilleros en la ciudad de Colonia Caroya, Córdoba.* (Tesis de grado Ingeniero Agrónomo). Universidad Nacional de Río Cuarto.

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

Kyuchukova, R., Urumova, V. y Lyutskanov, M. (2013). Levofloxacin residues in chicken meat and giblets. *B.J.V.M.*: 16 (1): 216-219.

Laczay, P., Semjen, G., Nagy, G. y Lehel, J. (1998). Comparative studies on the pharmacokinetics of norfloxacin in chickens, turkeys and geese after a single oral administration. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: 21(2): 161-164.

Lahoz, F. (2003). Control ambiental en galpones de pollos. Universidad de la Almunia. Zaragoza. España. URL: www.engormix.com

Lambert, A., Regnouf-De-Vains, J.B. y Ruiz-López M. (2007). Structure of levofloxacin in hydrophilic and hydrophobic media: relationship to its antibacterial properties. *Chem. Phys. Lett.*: 442: 281-284.

Landoni, M. F. y Albarellós, G. (2015). The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *Vet. J.*: 205 (1): 21-27.

Lara, L. y Rostagno, M. (2013) Impact of heat stress on poultry production. *J. Animals.*: (3): 356-369.

- Lashev, L. D., Dimitrova, D. J., Milanova, A. y Moutafchieva, R. (2015). Pharmacokinetics of enrofloxacin and marbofloxacin in Japanese quails and common pheasants. *Br. Poult. Sci.*: 56 (2): 255-261.
- Lecoeur Bitchatchi, S. y Kolf Clauw, M. (1998). Les nouvelles quinolones en médecine vétérinaire. *Rec.Méd. Vét.*: (175): 7-15.
- Lees, P. y Shojaee Aliabadi, F. (2002). Principios de antibioticoterapia. En *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* por Botana, L., Landoni, F. & Martín-Jiménez, T., Madrid, España, McGraw-Hill-Interamericana.: 493-501.
- Lees, P. y Toutain, P.L (2012). The role of pharmacokinetics in veterinary drug residues. *Drug Test. Analy.* :4 (Suppl. 1): 34-43.
- Lees, P., Svendsen, O. y Wiuff, C. (2008). Strategies to minimise the impact of antimicrobial treatment on the selection of resistant bacteria. En *Guide to Antimicrobial Use in Animals* por Guardabassi L.; Jensen, L.B. & Kruse, H. (ed). Garsington Road, Oxford, UK, Blackwell Publ.: 77-101.
- Li, J., Hao, H., Cheng, G., Wang, X., Ahmed, S., Shabbir, M. A., Liu, Z., Dai, M. y Yuan, Z. (2017). The effects of different enrofloxacin dosages on clinical efficacy and resistance development in chickens experimentally infected with *Salmonella Typhimurium*. *Sci. R. Nat.*, 7.
- Lisboa, J. (2012) Impacto del estrés calórico en la producción de pollos de engorde de Venezuela. *R.E.D.V.E.T.*: (13): 6.
- Löhren, U., Ricci A. y Cummings T.S. (2008). Chapter 8: Guidelines for antimicrobial use in poultry. En Guardabassi & Jensen: *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. (Pag. 126-141). Iowa. USA. Blackwell Publishing.
- Lorenzoni, G. (2010). *Poultry Diseases Influenced by Gastrointestinal Health Traditional Treatments and Innovative Solutions*. Nottingham University Press. Nottingham, United Kingdom
- Lorenzutti, A. M. (2017). *Evaluación farmacocinética-farmacodinámica de un régimen terapéutico de marbofloxacina, como predictor de su eficacia, en mastitis caprina*. (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid. España.
- Lynch, M., Rice, J., Ericson, J. Mosher, F., MillaS, W., Harran, L., Frame, G., Illyes, E., Mcguirk, P. y Jefson, M. (1994). Residue depletion studies on danofloxacin in the chicken. *J. Agric. Food Chem.*: 42: 289-294.
- MAG . (2016). Informes de cadenas de valor: Año 1 - N° 5 - Julio 2016: *Cárnica -Aviar*. Pág 4-32. Ministerio de agroindustria. Argentina.
- Maraschiello, C., Cusidó, E., Abellán, M. y Vilageliu, J. (2001). Validation of an analytical procedure for the determination of the fluoroquinolone ofloxacin in chicken tissues. *J. Chromatogr. B.*: 754: 311-318.

- Marin Carrillo, P. (2008). *Aplicación de fluoroquinolonas en Medicina Veterinaria. Criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK-PD)*. (Tesis de Doctorado). Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, España. 162p
- Márquez Lara, D. (2008). Residuos químicos en alimentos de origen animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia. *Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria.*: 9 (1): 124-135.
- Martinez, M. y Modric, S. (2010). Patient variation in veterinary medicine: part I. Influence of altered physiological states. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: 33 (3): 213-226.
- Martinez, M., Mcdermott, P. y Walker, R. (2006). Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet. J.*: 172 (1): 10-28.
- Martín-Jiménez, T. y Riviere, J. (1998). Population pharmacokinetics in veterinary medicine: Potential use for therapeutic drug monitoring and prediction of tissue residues. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: (21): 167-189.
- Martin-Jimenez, T. (2015a). Capítulo1: Farmacocinética de Absorción y distribución de los fármacos. En: BOTANA. *Farmacología Veterinaria: Fundamentos y aplicaciones terapéuticas*. (Págs 3-15). Panamericana (ed). Buenos Aires. Argentina.
- Martin-Jimenez, T. (2015b). Capítulo2: Farmacocinética de distribución y eliminación. En: BOTANA. *Farmacología Veterinaria: Fundamentos y aplicaciones terapéuticas*. (Págs 7-35). Panamericana (ed). Buenos Aires. Argentina.
- Marzo, A. y 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.
- Mc Kinnon, P. S. y Davis S. L. (2004). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Issues in the Treatment of Bacterial Infectious Diseases. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.*: (23): 271-288.
- Mclean, C. y Graham, T. E. (2002). Effects of exercise and thermal stress on caffeine pharmacokinetics in men and eumenorrheic women. *J. Appl. Physiol.*: 93 (4): 1471-1478.
- Modric, S. y Martinez, M. (2011). Patient variation in veterinary medicine–Part II–Influence of physiological variables. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: 34 (3): 209-223.
- Modric, S. (2014). Pharmacokinetic Principles for Understanding Drug Depletion as a Basis for Determination of Withdrawal Periods for Animal Drugs. In: Baynes R. & Riviere J.E. *Strategies for Reducing Drug and Chemical Residues in Food Animals*. New Jersey. USA: John Wiley & Sons.
- Moema, D., Nindi, M. M. y Dube, S. (2012). Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography. *Analy. chim. acta.*: (730): 80-86.
- Nawaz, M. y Nawaz, R. (1983) Pharmacokinetics and urinary excretion of sulphadimidine in sheep during summer and winter. *Vet. Rec.*: 112 (16): 379-81.
- Nelson, D. R. (2009). The cytochrome p450 homepage. *Human genomics.*: 4 (1): 59.

- Nelson, J., Chiller, T., Powers, J. y Angulo, F. (2007). Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story. *Clin. Infect. Dis.*: 44: 977-980.
- Olanrewaju, H., Purswell, J., Collier, S. y Branton S. (2010) Effect of ambient temperature and light intensity on physiological reactions of heavy broiler chickens. *Poult. Sci.*: (89): 2668-2677.
- Oliveira, R., Donzele, J., Abreu, M., Ferreira, R., Vaz, R. Gomes, M. y Cella, P. S. (2006) Efeitos da temperatura e da umidade relativa sobre o desempenho e o rendimento de cortes nobres de frangos de corte de 1 a 49 dias de idade. *Revi. Bras. Zootec.*: (35): 797-803.
- Owens, R. y Ambrose, P. (2002). Torsades de pointes associated with fluoroquinolones. *Pharmacotherapy: J. Hum. Pharmacol. D. Therap.*: 22(5): 663-672.
- Palermo Neto, J. (2006). Uso de medicamentos veterinários: impactos na moderna avicultura. VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Chapecó, SC, Brasil: 70-78.
- Papich, M. G y Riviere, J.M. (2009). Chapter 38: Fluoroquinolone antimicrobial drugs. *IN: Papich M. G y RIVIERE J.M, Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Iowa, USA: IX (ed), Wiley-Blackwell. Páginas
- Papich, M.G. (2016). Marbofloxacin. En Saunder Handbook of veterinary drugs: small and large animal. 4 ed., Elsevier, st. Louis, Missouri, 471
- Patel, M.J y Kirkpatrick, C. (2011). Pharmacokinetic concepts revisited - Basic and applied. *Benth. Sci. Publ.*: 12 (12): 1983-1990.
- Pedersen, S. y Thomsen, M. (2000) Heat and moisture production of broilers kept on straw bedding. Research Centre Bygholm, Danish Institute of Agricultural Science. Horsens, Denmark. *J. Agric. Eng. Res.* (2): 177 -186.
- Pereira, A. M. P. T. (2009). *Determinação de resíduos de fluoroquinolonas em amostras de tecido muscular de frangos e respectivo impacto na saúde humana* (Tesis de master). Coimbra. Portugal.
- Posyniak, A., Zmudzki, J. y 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.
- Poźniak, B., Pawłowski, P., Pasławska, U., Grabowski, T., Suszko, A., Lis, M. y Świtła, M. (2017). The influence of rapid growth in broilers on florfenicol pharmacokinetics -allometric modelling of the pharmacokinetic and haemodynamic parameters. *Br. Poult. Sci.*: 58 (2): 184-191.
- PROSAIA. (2013). Guía para el cálculo del período de retiro en tejidos comestibles. Fundación PROSAIA. Guía nº3. Pag. 9-10. Argentina.
- Quinteiro-Filho, W. M., Gomes, A. V. S., Pinheiro, M. L., Ribeiro, A., Ferrazde-Paula, V., Astolfi-Ferreira, C. S., Ferreira, A. J. P. y Palermo-Neto J. (2012) Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with *Salmonella Enteritidis*. *A. Pathol.*: 41 (5): 421-427.

- Quinteiro-Filho, W., Rodrigues, A., Ribeiro, V., Ferraz-De-Paula, M., Pinheiro, L., FERREIRA, P. y PALERMO-NETO. (2010). Acute heat stress impairs performance parameter and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens: Role of acute HPA axis activation. *J. Anim. Sci.*: (90): 1986–1994.
- Rajput, N. E. E. T. U., Dumka, V. K. y Sandhu, H. S. (2011). Pharmacokinetics and dosage regimen of ceftiofime in febrile cross-bred calves. *I.J.P.T.*: 10 (1): 17-20.
- Reig, M. y Toldrá, F. (2009). Veterinary Drug Residues. En Handbook of processed meats and poultry análisis. Nollet L. y Toldrá F. (ed). Boca Raton London- New York, CRC Press: 647-665.
- Requena, F., León, A. y De Basilio, V. (2004). Efecto de la restricción alimenticia durante el proceso de aclimatación precoz de pollos de engorde bajo condiciones tropicales. *Zootecnia. Trop.* (22). 371-385.
- Riviere, J. E (2009). Chapter 3: Pharmacokinetics. In: Riviere J.E & Papich M. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (págs. 48-70). Iowa, USA: 9ed. Wiley-Blackwell.
- Riviere, J. E y Sundlof, S.F. (2009). Chapter 61: Chemical residues in tissues of food animals. In Riviere J and Papich M., *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (pág 1459). Iowa: (9 ed). Willey-Blackwell.
- Riviere, J.E (2011). Comparative pharmacokinetics: principles, techniques and applications. Iowa. USA: 2ed. John Wiley & Sons.
- Rocha, D. G., Santos, F. A., DA Silva, J. C. C., Augusti, R. y Faria, A. F. (2015). Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*: (1379): 83-91.
- Rosanova, M., Ledea, R., Capurroa, H., Petrungraroa, V. y Copertari P. (2010). Efectos adversos musculoesqueléticos por el uso de fluoroquinolonas en niños: un metaanálisis. *Arch. Argent. Pediatr.*: 108 (6): 524-531.
- 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.
- Sajid, B. (2008). *Pharmacokinetics of Ciprofloxacin in Normal and Different Metabolically Altered Conditions in Rabbits* (Doctoral dissertation, University of the Punjab, Lahore).
- Sanchez, G. (2005). Farmacología Aviar: Parte 1. Principios básicos sobre la administración de fármacos antiinfecciosos. *Rev. Med. Vet. Zoot.* (52) 170-175.
- Santosh, K. (2010). *Effect of ketoprofen on pharmacokinetics of levofloxacin in buffalo calves*. (Tesis master). Universidad en Gwalior. India

- Saranteas, T., Mourouzis, C., Dannis, C., Alexopoulos, C., Lolis, E. y Tesseromatis, C. (2004). Effect of various stress models on lidocaine pharmacokinetic properties in the mandible after masseter injection. *J. Oral Maxillofac. Surg.*: 62 (7) 858-862.
- Sharma, P., Jain, A. y Jain, J. (2009). Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Act. Polon. Pharmace. D. Res.*: 66 (6): 587-604.
- Silva, N. y Sousa, M. (2017). Is marbofloxacin a good candidate for treating pigs in Europe?. *Vet. Rec.*: 180 (24): 588-590.
- Soliman, G. A. (2000). Tissue distribution and disposition kinetics of enrofloxacin in healthy and *E. coli* infected broilers. *D.T.W.*: 107 (1): 23-27.
- Sörgel, F. y Kinzig, M. (1993) Pharmacokinetics of gyrase inhibitors. Part 2: renal and hepatic elimination pathways and drug interactions. *Amer. J. Med.*: 94: 56-59.
- Spreng, M., Deleforge, J., Thomas, V., Boisram, E.B y DrugeoN, H. (1995). Antibacterial activity of marbofloxacin. A new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates. *J. vet. Pharmacol. Therap.* (18): 247-289.
- Sumano Lopéz, H. y Gutierrez, L. (2004) Consideraciones farmacológicas de la antibioticoterapia en aves. *V Simpósio Brasil sul de avicultura*. Chapecó. Brasil.
- Sumano López, H., Negrón- Gonzalez, G. y Fernández SURUMA, Y.G. (2000). Consideraciones prácticas y farmacológicas en medicina antibacteriana en avicultura. Una revisión. *Rev. Cient. FCV-LUZ.*: 10 (3): 251-266.
- Sun, M., Li J., Gai C. L., Chang Z. Q., LI J. T. y ZHAO, F. Z. (2013). Pharmacokinetics of difloxacin in olive flounder *Paralichthys olivaceus* at two water temperatures. *J. Vet. Pha. Th.*: 37 (2): 186-191.
- Svihus, B. (2011). The gizzard: function, influence of diet structure and effects on nutrient. *World's Poul. Sci. J.*: (67): 207-224.
- Talero-Pérez, V., Medina, O. y Rozo-Núñez, W. (2014). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Univ. Sci.*: 19 (1): 11-29.
- Tolentino, C., Icochea, E, Reyna, P. y Valdivia, R. (2008). Influencia de la temperatura y humedad ambiental del verano e invierno sobre parámetros productivos de pollos de carne criados en la ciudad de lima. *Rev Inv Vet Perú.*: 19 (1): 9-14.
- Toutain, P. y Bousquet-Mélou, A. (2004a). Bioavailability and its assessment. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: (27): 455-466.
- Toutain, P. y Bousquet-Melou, A. (2004b). Volumes of distribution. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: 27: 441-453.
- Toutain, P. y Bousquet-Mélou, A. (2004c). Clearance. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 27: 415-42.

- Toutain, P. y Bousquet-Mélou, A. (2004d). Plasma terminal half-life. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: 27: 427-439.
- Toutain, P.L., Ferran, A. y Bousquet-Melou A. (2010). Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: Cunningham, F., Elliott, J., Lees, P. (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 199. *Comparative and Veterinary Pharmacology* (págs 19-48). Springer, Berlin, Germany.
- Turnidge, J. (2004). Antibiotic use in animals-prejudices, perceptions and realities. *J. Antimicrob. Chemother.*: (53): 26-27.
- Van Der Klis, J.G., Verstegen, M.W. y De Wit, W. (1990). Absorption of minerals and retention time of dry matter in the gastrointestinal tract of broilers. *Poult. Sci.*: (69): 2185-2194.
- Vanakoski, J. y Seppälä, T. (1998). Heat exposure and drugs: a review of the effects of hyperthermia on pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.*: 4 (34): 311-322.
- Verdon, E., Couedor, P., Roudaut, B. y Sandérs, 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. Internat.*: 88 (4): 1179-1192.
- Vermeulen, B., De Baker, P. y Remon, J.P. (2002). Drug administration to poultry. *Advanc. D. Deliv. Reviews.*: (54): 795-803.
- Virden, W. S. y Kidd, M. T. (2009). Physiological stress in broilers: Ramifications on nutrient digestibility and responses. *J. Appl. Poult. Res.*: (18): 338-347.
- Whittow, G. (1968). Regulación de la temperatura orgánica. *Sturkie. Fisiología aviar.* (págs. 152-189) Zaragoza. España: I (ed) Arancibia.
- Yahav, S. (2015). Regulation of body temperature: strategies and mechanisms. En Colin G. *Sturkie's Avian Physiology* (págs. 869-897). London. UK: 6ed. Elsevier.
- Yang, F., Yang, Y. R., Wang, L., Huang, X. H., Qiao, G. y Zeng, Z. L. (2014). Estimating marbofloxacin withdrawal time in broiler chickens using a population physiologically based pharmacokinetics model. *J. vet. Pharmacol. Therap.*: (37): 579-588.
- Yorke, J. C. y Froc, P. (2000). Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.*: 882 (1): 63-77.
- Yuan, L. G., Wang, R., Sun, L. H., Zhu, L. X., Luo, X. Y., Sun, J. y Liu, Y. H. (2011). Pharmacokinetics of marbofloxacin in Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *J. Vet. Pharmacol. Therap.*: 34 (1): 82-85.
- Zulfiqar-Ul-Hassan, S. R., Naseer R. y Murad S. (2008). Bioavailability and disposition kinetics of amoxicillin in normal and febrile rabbits. *Blood.*: (30): 30-63.

PUBLICACIONES

2016- Plasma pharmacokinetics and muscle disposition of marbofloxacin in chickens. Urzúa., N; Errecalde., C; Prieto., G; Lüders., C; Picco E;. *Iranian Journal of Veterinary Medicine.* 10 (1) 1-6. Iran.

2017- Pharmacokinetic behavior of marbofloxacin in plasma from chickens at different seasons. Natalia Francisca Urzúa Pizarro, Carlos Alberto Errecalde, Guillermo Fermin Prieto, Carlos Fernando Lüders, María Paula Tonini, Eduardo Jesús Picco. *Macedonian Veterinary Review.* 2017; 40 (2): i-v.

2018- Validation method for extraction and determination of marbofloxacin in plasma and edible chicken tissues. Natalia Francisca Urzúa, Guillermo Fermín Prieto, Carlos Fernando Lüders, Maria Paula Tonini, Eduardo Jesús Picco, Carlos Alberto Errecalde. *Malaysian Journal of Analytical Sciences.* Aceptado.

CONGRESOS

2014-Farmacocinética plasmática y determinación del periodo de resguardo de marbofloxacina en pollos parrilleros. Urzúa Pizarro, N; Prieto, G; Tonini, M; Errecalde, C; Lüders, C; Picco, E. Jornadas Latinoamericanas de Fármaco-Toxicología Veterinaria XVII Latinoamericanas - XXII Nacionales. 11 de Septiembre, Santa Fe, Argentina.

2015- Disposición plasmática de marbofloxacina en pollos parrilleros. Prieto G., Urzúa Pizarro N., Tonini M.P., Errecalde C., Lüders C., Picco E. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. XLVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética. Noviembre. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

2016- Disposición y depleción muscular de marbofloxacina por aplicación oral en pollos parrilleros en condiciones estivales e invernales. Urzúa N., Errecalde C., Prieto G., Lüders

C., Picco E., Tonini M.P. IV Jornada de difusión de la investigación y extensión. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina.