

Residuos de fluoroquinolonas en **animales** **domésticos**

Carlos Errecalde, Guillermo Prieto,
Natalia Urzúa, Carlos Lüders
y Rosendo Liboa

Residuos de fluoroquinolonas en animales domésticos / Carlos Errecalde ... [et al.]. -
1a ed. - Río Cuarto : UniRío Editora, 2022.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-688-511-9

1. Medicina Veterinaria. 2. Farmacología. 3. Bacteriología. I. Errecalde, Carlos.
CDD 636.08951

Residuos de fluoroquinolonas en animales domésticos

Carlos Errecalde, Guillermo Prieto, Natalia Urzúa, Carlos Lüders, Rosendo Liboa

2022 © *UniRío editora*. Universidad Nacional de Río Cuarto
Ruta Nacional 36 km 601 – (X5804) Río Cuarto – Argentina
Tel.: 54 (358) 467 6309 – Fax.: 54 (358) 468 0280
editorial@rec.unrc.edu.ar
www.unirioeditora.com.ar

Primera edición digital: *noviembre de 2022*

ISBN 978-987-688-511-9



Este obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 2.5 Argentina.
http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/ar/deed.es_AR

Ministerio de
**Ciencia
Y Tecnología**

GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE
CÓRDOBA

**ENTRE
TODOS**

INTA
Instituto Nacional
de Tecnología Agropecuaria

**FAV
UNRC**

PROTRI



Uni. Tres primeras letras de «Universidad». Uso popular muy nuestro; la Uni. Universidad del latín «universitas» (personas dedicadas al ocio del saber), se contextualiza para nosotros en nuestro anclaje territorial y en la concepción de conocimientos y saberes construidos y compartidos socialmente.

El río. Celeste y Naranja. El agua y la arena de nuestro Río Cuarto en constante confluencia y devenir.

La gota. El acento y el impacto visual: agua en un movimiento de vuelo libre de un «nosotros».

Conocimiento que circula y calma la sed.

Consejo Editorial

Facultad de Agronomía y Veterinaria
Prof. Alicia Carranza y Prof. Mercedes Ibañez

Facultad de Ciencias Humanas
Prof. Graciana Pérez Zavala

Facultad de Ciencias Económicas
Prof. Clara Sorondo

Facultad de Ingeniería
Prof. Marcelo Alcoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físico–
Químicas y Naturales
Prof. Sandra Miskoski

Biblioteca Central Juan Filloy
Bibl. Claudia Rodríguez y Bibl. Mónica Torreta

Secretaría Académica
Prof. Sergio González y Prof. José Di Marco

Equipo Editorial:

Secretaría Académica: *Prof. Sergio González*
Director: *Prof. José Di Marco*
Equipo: *José Luis Ammann, Lara Oviedo, Ana Carolina Savino
Maximiliano Brito, Daniel Ferniot, Roberto Guardia, Marcela Rapetti.*

Índice

Capítulo I

El uso de fármacos en animales domésticos	6
La terapéutica antimicrobiana	7
Farmacocinética	8
Farmacodinamia	14

Capítulo II

Residuos en animales de consumo	18
La resistencia bacteriana.....	23
Toxicidad en el animal huésped	25
Regulación internacional de fármacos de uso veterinario.....	25
Valoración del riesgo	26
Control de residuos	28
Estudios de residuos	29

Capítulo III

Fluoroquinolonas	31
Relación estructura-actividad	32
Modo de acción	34
Resistencia bacteriana	35
Perfil toxicológico.....	36
Farmacocinética	37
Distribución.....	38
Metabolismo y eliminación	38
Cuantificación de fluoroquinolonas.....	39
Aplicación de fluoroquinolonas en medicina veterinaria	42

Capítulo IV

Disposición de fluoroquinolonas en pollos parrilleros	44
Enrofloxacin y ciprofloxacina	45
Marbofloxacina	46
Danofloxacina	53
Levofloxacina	55
Difloxacina	58

Capítulo V

Estudios de fluoroquinolonas en huevos de gallina	61
Danofloxacina	64
Marbofloxacina	65

Capítulo VI

Experiencias con fluoroquinolonas en cabras lactantes	67
Danofloxacina	70
Difloxacina	72
Levofloxacina	74
Marbofloxacina	75
Enrofloxacina y ciprofloxacina	79

Capítulo VII

Experiencias con fluoroquinolonas en truchas Arco iris	82
Marbofloxacina	82
Enrofloxacina	89
Levofloxacina	94

Bibliografía consultada	97
--------------------------------------	-----------

Sobre los autores	100
--------------------------------	------------

Capítulo I

El uso de fármacos en animales domésticos

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

Con el propósito de compensar estas demandas, a través del tiempo los distintos sectores involucrados modificaron los viejos paradigmas de producción y comercialización; las explotaciones extensivas y de venta local o regional se transformaron en sistemas de producción animal intensivos, caracterizados por mayor número de animales por unidad de superficie y con un mercado de ventas globalizado.

Con frecuencia, estas condiciones de explotación predisponen a los animales para el desarrollo de enfermedades lo que demanda mayor empleo de medicamentos veterinarios, de tal modo que éstos constituyen elementos centrales en la actividad agropecuaria.

El Codex Alimentarius define a los medicamentos veterinarios como toda sustancia aplicada o administrada a cualquier animal destinado a la producción de alimentos, como los que producen carne o leche, aves de corral, peces o abejas, tanto con fines terapéuticos como profilácticos o de diagnóstico, o para modificar las funciones fisiológicas o el comportamiento.

Sin embargo, el uso inapropiado de fármacos ya sea de forma inadvertida o intencional (uso ilegal), sin respetar dosis y los usos autorizados en el registro sanitario, puede generar residuos de medicamentos en los alimentos destinados al consumo humano que pueden depositarse o almacenarse en células, tejidos u órganos, ya sea como tales o como sus metabolitos.

En las prácticas agrícolas modernas los fármacos antimicrobianos se utilizan a gran escala, en directa relación con el enorme aumento e intensificación de la cría de animales, en contraste con el sistema tradicional de cría en libertad, que permitía a los animales deambular al aire libre por amplias áreas de la granja para buscar alimento, la cría intensiva actual de animales en alojamientos restringidos ha aumentado inevitablemente la incidencia y propagación de enfermedades. Por lo tanto, ha habido una mayor necesidad de usar agentes terapéuticos.

Estos fármacos se aplican en la cría de animales por diferentes razones, para curar o prevenir enfermedades para aumentar la eficiencia alimenticia y/o la tasa de crecimiento, y para sedar animales con el fin de minimizar el efecto del estrés. Debido que

no todas las aplicaciones son de carácter terapéutico, es habitual denominar a los medicamentos veterinarios como cualquier sustancia farmacológicamente activa en animales, independiente de su propósito de uso y modo de aplicación. En este contexto, las sustancias utilizadas para aumentar la eficiencia alimenticia y/o la tasa de crecimiento también se consideran medicamentos veterinarios.

Tanto que la medicina humana como la veterinaria amplían su arsenal en clases más potentes de agentes terapéuticos, la gama de medicamentos con potencial uso en animales productores de alimentos se amplía continuamente.

El Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) ha estimado que, hasta 400 sustancias, no todas las cuales son medicamentos veterinarios, tienen el potencial para su uso en la producción de alimentos para animales.

La terapéutica antimicrobiana

El objetivo primordial cuando se aplican antimicrobianos es lograr la curación clínica-bacteriológica del animal, de modo que resulta indispensable brindar concentraciones efectivas en el sitio de infección durante un tiempo suficientemente extenso que permita eliminar o al menos controlar el crecimiento microbiano.

La selección del fármaco y el diseño de un régimen de administración correcto dependen del microorganismo causal de la enfermedad, aunque la eficacia terapéutica está supeditada por la compleja interacción entre el animal, la actividad antimicrobiana (farmacodinamia) y la farmacocinética, que expresa la disposición del fármaco en el organismo, según se representa en la figura 1.



Figura 1: Relación animal, bacteria y huésped.

Farmacocinética

El objetivo terapéutico consiste en controlar o erradicar el agente infeccioso, sin provocar efectos nocivos en el huésped. En consecuencia, la susceptibilidad del microorganismo patógeno al agente es crucial; sin embargo, deben contemplarse las características cinéticas del fármaco antimicrobiano seleccionado por cuanto es necesario conseguir niveles suficientes en el tejido afectado.

La disposición tisular es importante no sólo desde el punto de vista terapéutico por cuanto diferentes respuestas interespecíficas pueden atribuirse a variaciones en su absorción, distribución, biotransformación y excreción y sino/también además porque la disposición se asocia con la posibilidad de generar residuos en los tejidos comestibles.

Las características de disposición son estudiadas por la farmacocinética, una rama de la farmacología que evalúa la evolución temporal de los niveles del fármaco en el organismo mediante estudios sobre un grupo homogéneo de animales sanos quienes reciben una dosis única por una o más vías y a partir de la aplicación se colectan muestras de sangre en diferentes tiempos en las cuales se cuantifica el fármaco en estudio.

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

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

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

La absorción implica el ingreso del fármaco en el organismo lo que comprende también la liberación de su forma farmacéutica, disolución y absorción propiamente dicha. Este proceso es influenciado cuanti-cualitativamente por la concentración del fármaco, el pH, sus características físico-químicas, el área de la superficie absorbente y la irrigación del sitio de administración, etc.

Cuando se procuran acciones sistémicas por aplicación no intravenosa, es requisito para la absorción del fármaco que este se libere de la formulación farmacéutica. En este caso la absorción se expresa en función del parámetro F, fracción absorbible o biodisponibilidad.

La velocidad de absorción se estima mediante la concentración máxima alcanzada en la sangre o $C_{máx}$ y el tiempo a la que esta ocurre o $T_{máx}$. Estos parámetros no

reflejan las características de absorción, aunque revelan su capacidad para acceder a la circulación sistémica.

Las concentraciones plasmáticas y los tiempos a las que éstas se logran resultan del equilibrio dinámico establecido entre los diferentes procesos cinéticos que regulan la disposición del fármaco en el organismo. La magnitud del $C_{máx}$ depende de la dosis aplicada y de la relación entre las constantes de velocidad de absorción (K_a) y de eliminación (K_{el}).

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

La biodisponibilidad relaciona los valores establecidos de ABC por la administración extravascular versus los obtenidos de ABC intravascular en un determinado periodo de tiempo. Por la vía intravenosa, la biodisponibilidad es completa y el valor de F es 100 %, debido que se evita el proceso de absorción y el fármaco accede directamente a la circulación general, en tanto para una vía extravascular puede situarse entre 0 y 100. El valor de F para un determinado fármaco no sólo depende de la absorción sino también de los eventos que reducen su exposición, inclusive el metabolismo pre sistémico.

Con la administración intravenosa de un fármaco se consigue la concentración máxima en sangre (C_0) de inmediato. Luego, la concentración decrece en dos fases diferentes: la inicial, caracterizada por un descenso rápido, denominada fase de distribución (α), en la cual, a medida que descienden los niveles séricos éstos se incrementan en los tejidos hasta que se logra la fase de equilibrio o de eliminación (β).

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

La distribución es el proceso mediante el cual el fármaco se incorpora desde la circulación sanguínea a los diferentes tejidos, inclusive el sitio blanco o biofase, donde ejerce su acción. La transferencia del fármaco se produce por procesos a favor de gradiente y es determinada por las propiedades fisicoquímicas del fármaco tales como el peso molecular, el coeficiente de partición, el pK_a y por la afinidad hacia proteínas plasmáticas y tisulares, debido que sólo la fracción que permanece libre en el plasma posee capacidad para difundir a los espacios extravasculares.

Los antimicrobianos utilizados en la terapéutica son ácidos o bases débiles, que en solución a pH fisiológico se encuentran en forma ionizada o no ionizada. Las moléculas ionizadas son poco liposolubles y ofrecen dificultades para atravesar membranas celulares, limitando su distribución al fluido extracelular, en cambio las no ionizadas son más lipofílicas y difunden pasivamente a través de las membranas celulares, hasta obtener un equilibrio dinámico de concentraciones.

La proporción de fármaco ionizado-no ionizado, sujeto a la constante de disociación del fármaco (pK_a), difiere según el pH del medio en el que se encuentra la molécula. En consecuencia, el gradiente de pH entre el plasma y los tejidos determina en gran medida las concentraciones tisulares del fármaco.

Los ácidos débiles, en gran medida ionizados en la sangre ($pH = 7,4$), difunden poco a los tejidos, en cambio, la relación previsible para las bases débiles supera la unidad, siempre que tenga carácter liposoluble, de modo que los fármacos básicos suelen lograr niveles tisulares varias veces superiores a las séricos.

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

La cantidad de compartimientos varía según la naturaleza del fármaco. Cuando éste no tiene afinidad por ningún elemento orgánico y se distribuye por toda el agua corporal, se trata de un modelo de distribución monocompartimental. En cambio, si no se distribuye instantáneamente o lo hace de modo heterogéneo, se trata de un modelo multicompartmental.

La distribución se cuantifica por el parámetro volumen de distribución o V_d . En general, este no tiene un significado fisiológico, es irreal, y se define como el volumen teórico que ocuparía un fármaco, si la concentración alcanzada en todo el organismo fuese igual a la existente en la sangre. El V_d otorga sólo una estimación sobre el grado de distribución, pero no revela el patrón de distribución que sólo se puede describir cuantificándolo en distintos órganos.

El metabolismo o biotransformación comprende cambios bioquímicos verificados en el organismo mediante los cuales las sustancias extrañas se convierten en otras más ionizadas, más polares, más hidrosolubles, menos difusibles y más fácilmente eliminables respecto la original.

La biotransformación acontece en dos fases, habitualmente secuenciales. La Fase I comprende reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y descarboxilación que tienden a inactivar o restarle actividad biológica al fármaco, aunque a veces sucede lo contrario y el metabolito es más activo que su precursor, mientras las reacciones de Fase II procuran incrementar la polaridad de modo de promover su eliminación.

Las reacciones son consumadas por el sistema microsomal, las mitocondrias, enzimas solubles en citosol, lisosomas y flora intestinal. La mayoría de los fármacos se metabolizan en el hígado debido al gran tamaño del órgano, a su elevado riego sanguíneo y por la gran cantidad de enzimas metabolizadoras.

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

La intensidad con la que un fármaco se une a las proteínas del plasma también influye en la fracción que puede ser extraída por el órgano u órganos de eliminación, ya que sólo la fracción libre se puede depurar. La interacción fármaco-proteína reduce la difusión, retarda la eliminación, y prolonga el efecto biológico.

En el riñón la eliminación está determinada por la filtración, la secreción y la reabsorción. En el túbulo renal son secretados diversos fármacos por sistemas de transporte de ácidos orgánicos. El clearance o Cl, es el parámetro cinético que indica el volumen de sangre o plasma que es depurado de una sustancia por unidad de tiempo. Esta relación permanece constante para cada fármaco se repite y expresa el volumen de plasma depurado del mismo por unidad de tiempo. Este parámetro evalúa la eliminación, si bien no explicita el tiempo que requiere un fármaco para eliminarse del organismo ni el modo de eliminación.

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

El $t_{1/2\beta}$ brinda una idea de su permanencia en el organismo y sustenta la identificación del intervalo de dosis: su valor multiplicado por 10 estima el tiempo en que se elimina del organismo el 99,99% del fármaco y además, el $t_{1/2\beta}$ ofrece una aproximación del tiempo de eliminación de residuos. Diversos autores sostienen que se requieren de 20 $t_{1/2\beta}$ para calcular el tiempo mínimo de retiro de un medicamento.

El tiempo medio de residencia (TMR), representa el tiempo medio en que el fármaco reside en el organismo luego de una dosis única. Este parámetro es la analogía del momento estadístico de la vida media y puede variar según la vía de administración.

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

El conjunto de procesos descriptos intentan explicar la concentración de un fármaco en su lugar de acción, de la cual dependen sus efectos terapéuticos. Debido a que éste sitio o tejido, no es de fácil acceso, se estiman niveles del fármaco en el suero o plasma versus tiempo, puesto que éstos fluidos se encuentran en contacto directo con los receptores y, en consecuencia cualquier modificación de los niveles plasmáticos redundará en el efecto farmacológico, aunque no siempre se percibe una correlación lineal entre ambas concentraciones.

El resultado práctico de los estudios cinéticos es la obtención de modelos matemáticos que describen el curso temporal de la concentración de fármacos en el organismo animal, con cualquier régimen de dosificación y permiten estimar la posible acumula-

ción del fármaco o sus metabolitos, correlacionar concentraciones de fármaco con el efecto farmacológico o toxicológico, evaluar la biodisponibilidad, describir el efecto de los cambios fisiológicos o patológicos en la absorción, distribución y eliminación de los fármacos y explicar interacciones entre fármacos e inclusive, resultan útiles para estimar el período de resguardo para animales destinados al consumo.

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

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

La descripción de las curvas de concentración versus tiempo, se puede realizar mediante modelos compartimentales o no compartimentales. En los primeros, en un modelo monocompartimental el organismo animal se considera como si fuera sólo un compartimiento, es decir, que el fármaco que ingresa en la circulación general se distribuye y elimina simultáneamente.

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

El organismo en sí se comporta como multicompartimental, más de los que arriba se describen, por lo tanto, en la actualidad se tiende a la aplicación de modelos no compartimentales, entregando con ellos parámetros cinéticos robustos de utilidad clínica.

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

El único requisito para aplicar un modelo no compartimental es que la absorción y disposición del fármaco cumplan una farmacocinética de primer orden, de todos modos, la elección del modelo depende del propósito del estudio, propiedades físico-químicas del fármaco que se estudia, especificidad y sensibilidad del método analítico utilizado y de la especie estudiada.

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

En la actualidad existen programas informáticos que permiten graficar los datos en curvas y estiman los parámetros cinéticos mediante fórmulas preestablecidas, por ej., el programa farmacocinético no compartimental PK Solution 2.0 (Farrier, 1999).

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

Un fármaco administrado por vía intravenosa, puede presentar una o dos pendientes. Presenta una pendiente o es monoexponencial cuando predomina la eliminación, y dos pendientes o biexponencial cuando se distingue una fase previa de distribución, mientras que, si la administración es extravascular, está presente también la pendiente de absorción.

El objetivo siguiente es determinar cuál es la curva teórica, modelo o función que mejor interpreta los datos experimentales, que tenga valor predictivo, con el mínimo error. El operador del programa elige cuántas y qué pendientes utilizará y decide los puntos de corte, es decir los tiempos entre los cuales considera que se verifica el proceso en estudio. Esto significa "a priori" definir cuál sería la mejor función logarítmica.

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

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

Con los valores de área bajo la curva (ABC), la constante de velocidad de eliminación (β) y la dosis empleada, el programa calcula el volumen de distribución (Vd), el clearance total (Cl_{tot}), y la vida media de eliminación ($t_{1/2\beta}$), mediante las fórmulas cinéticas clásicas. Otros parámetros que determina son el área bajo la curva del primer momento estadístico o ABCM y el tiempo de residencia medio o TMR.

El método de análisis modelo-independiente, se aplica sólo si el comportamiento cinético de la fase de eliminación es de primer orden, lo cual significa que una fracción constante de la droga se elimina por unidad de tiempo. En este caso la velocidad del

proceso de eliminación es proporcional a la concentración del fármaco en el organismo, lo que puede evidenciarse en la curva semilogarítmica por la linealidad de la fase de eliminación y el elevado coeficiente de determinación ($\geq 0,9$). Afortunadamente, la mayoría de los fármacos exhiben este comportamiento aplicados a las dosis terapéuticas convencionales, lo que hace muy versátil a este tipo de programa.

Los valores de los parámetros exhiben alta variabilidad individual y son afectados por diversos factores fisiopatológicos tales como enfermedades, edad, sexo y el estado nutricional de los animales como alternativa se utilizan estudios cinéticos poblacionales para moderar la influencia de las variables mencionadas y obtener información confiable.

Farmacodinamia

La farmacodinamia expresa la selectividad sobre el microorganismo patógeno según la actividad bacteriostática o bactericida desarrollada, ya sea interceptando procesos metabólicos (por ej. síntesis de proteínas) o por la interacción con componentes estructurales: pared, membrana celular o ácidos nucleicos e incluso por la habilidad para desplegar acciones intracelulares y en consecuencia, interrumpir el desarrollo bacteriano y permitir la participación de los mecanismos inmunitarios del huésped (Figura 2).

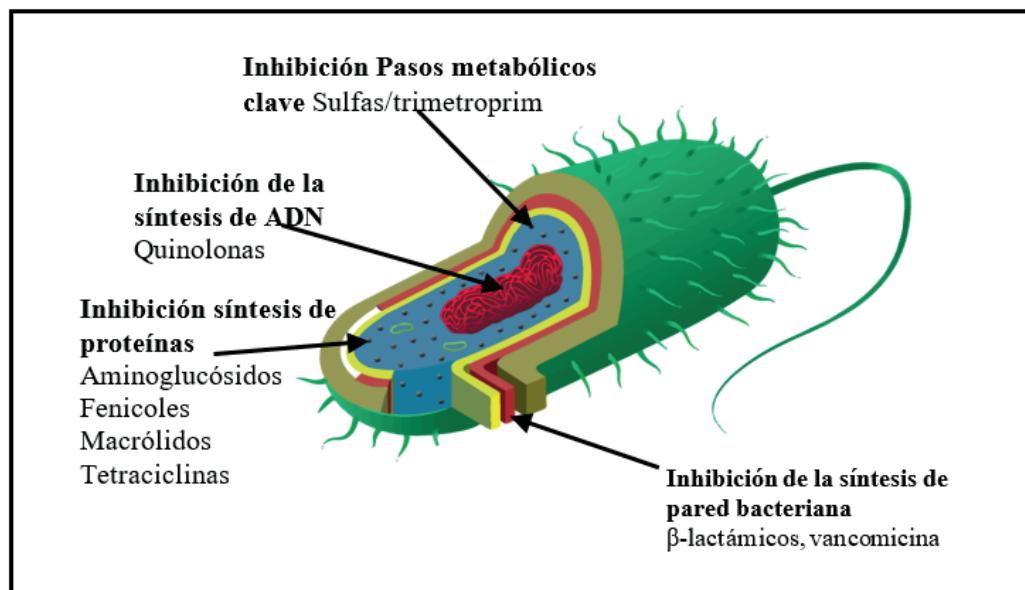


Figura 2. Sitios de acción de los fármacos antibacterianos

La susceptibilidad de los patógenos a los antibacterianos es determinada empíricamente por la respuesta al tratamiento implementado o científicamente, mediante técnicas estandarizadas por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), como el método de difusión en agar-disco o de Kirby-Bauer o pruebas de dilución en caldo y agar.

Los ensayos de susceptibilidad in vitro son útiles como indicadores para determinar la quimioterapia cuando la susceptibilidad de un patógeno es impredecible, o cuando

una infección no responde a una terapia a priori apropiada. La CMI obtenida indica al clínico la concentración necesaria del fármaco en el sitio de infección, para erradicar o inhibir el organismo infectante.

Los ensayos de susceptibilidad de rutina tienen significancia para la salud pública, porque los datos generados pueden utilizarse para evaluar la ocurrencia y la prevalencia de resistencia en una determinada área geográfica.

Los clínicos esperan del laboratorio la información para categorizar las cepas aisladas como susceptibles, intermedias o resistentes, lo que requiere establecer concentraciones de antibióticos que se formalicen como puntos de corte, que son concentraciones discriminatorias usadas en la interpretación de los resultados de las pruebas de susceptibilidad.

Actualmente es irrefutable la necesidad de emplear antimicrobianos activos in vitro frente al microorganismo causante del proceso infeccioso lo que, con frecuencia, obliga a la práctica del antibiograma.

Esta técnica, que no siempre es posible realizar de rutina, permite determinar el parámetro de actividad microbiológica que más objetivamente se correlaciona con la eficacia de los antibióticos, la CMI.

Si bien se acepta que muchos procesos infecciosos evolucionan hacia la curación clínica empleando antimicrobianos inefectivos frente al agente infeccioso, también es aceptado que varias enfermedades infecciosas evolucionan de manera espontánea hacia la curación, en ausencia de un tratamiento específico.

En términos generales, un antibacteriano es efectivo cuando obtiene concentraciones superiores a la CMI en el sitio de infección. Estudios experimentales y clínicos avallan la integración de parámetros farmacocinéticos-farmacodinámicos, conocidos como PK-PD, con el propósito de maximizar la eficacia antimicrobiana.

Las dianas de estos fármacos son los microorganismos y éstos son los mismos en las infecciones humanas que las provocadas en animales de experimentación por lo que los resultados obtenidos en unos son generalmente extrapolables.

Los principales parámetros PK-PD que mejor se correlacionan con la eficacia terapéutica son el cociente inhibitorio ($C_{m\acute{a}x}/CMI$), la relación área bajo la curva entre el momento de la administración y las 24 horas siguientes (ABC/CMI) y el tiempo (t) que las concentraciones plasmáticas o tisulares superan la CMI del patógeno considerado ($t > CMI$). Según estos parámetros, los antimicrobianos pueden clasificarse en:

a) Antibióticos con efecto tiempo-dependiente y diferente persistencia. Algunos grupos antibacterianos como los betalactámicos y los macrólidos clásicos, poseen efectos poco persistentes y requieren aplicaciones frecuentes para optimizar su actividad o la administración de antibióticos con extensa vida media biológica. En estas sustancias el parámetro farmacodinámico que mejor se correlaciona con la eficacia es $t > CMI$, donde

t refiere al porcentaje de tiempo entre intervalos de dosis que excede la CMI.

Otros antibióticos, como azitromicina o del grupo de las tetraciclinas, poseen efectos más persistentes debido al efecto postantibiótico, de modo que no demandan administraciones frecuentes, entonces el cociente ABC/CMI el parámetro que mejor se correlaciona con eficacia clínica (figura 3).

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

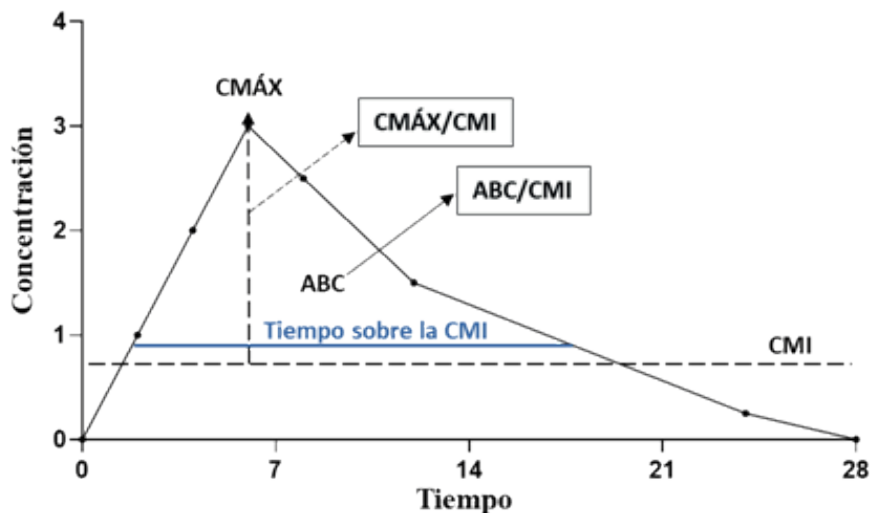


Figura 3: Relación PK-PD

b) Antibióticos concentración dependiente: en este caso su eficacia se correlaciona con niveles séricos o tisulares elevados ocasionando un efecto persistente y prolongado. Dosis altas producen un elevado cociente inhibitorio y marcada acción bactericida.

En general la administración de antibacterianos siempre debe considerar los niveles alcanzados en el sitio target y la CMI de las bacterias susceptibles, de manera de asegurar la máxima eficacia del tratamiento. La importancia de las concentraciones alcanzadas en el sitio de infección en el éxito del tratamiento avala la cuantificación de concentraciones plasmáticas o tisulares de antimicrobianos.

En infecciones sobre órganos con escaso ingreso, las consideraciones farmacodinámicas adquieren máxima importancia, por cuanto las concentraciones plasmáticas no siempre son similares a las del sitio de infección.

En presencia de bacterias muy susceptibles en inóculos bajos, la eficacia del tratamiento no depende de manera crucial del modo de administración.

En cambio, en infecciones causadas por agentes resistentes en inóculos altos, la predeterminación de objetivos farmacodinámicos específicos para cada antibacteriano puede ser fundamental en el éxito de la terapia y para establecer una dosis racional.

La integración PK-PD es útil para implementar un régimen de dosificación. Un tratamiento con antimicrobianos se define por la dosis y el intervalo de aplicación, establecidos a partir de la relación farmacocinética-farmacodinamia.

Los valores de $C_{m\acute{a}x}$ y $C_{m\acute{i}n}$ se incrementan progresivamente en el transcurso del tratamiento hasta alcanzar un estado estacionario ($C_{ss\ m\acute{i}n}$ y $C_{ss\ m\acute{a}x}$) y se mantienen si no se modifican las pautas de dosificación y no cambian los parámetros que definen el perfil farmacocinético. La variabilidad de este perfil es la principal causa de variaciones en la respuesta que oscila entre ineficacia hasta la toxicidad severa.

La selección de una determinada dosis de antibiótico se ha basado más con la tolerancia al mismo que con la sensibilidad del patógeno. Además, pocos estudios demuestran cuál es la duración óptima de un tratamiento antibiótico que garantice la curación de la infección. El cálculo de la dosis, su frecuencia y duración total del tratamiento es, por lo general, menos preciso, ya que existe gran desconocimiento sobre los múltiples factores que pueden condicionar esta decisión.

Los métodos de dosificación a priori utilizan características conocidas del fármaco, del paciente y la enfermedad que inciden en los parámetros cinéticos, incluso la farmacocinética poblacional ofrece la posibilidad de incluir diversas covariables que mejoran significativamente la capacidad de predicción.

Capítulo II

Residuos en animales de consumo

Un residuo medicamentoso o químico es definido como la sustancia que, a consecuencia del empleo de medicamentos o productos químicos con diferentes fines, puede depositarse o almacenarse en células, tejidos u órganos, ya sea como tales o como sus metabolitos, con el consiguiente impacto en salud pública, en la industrialización del alimento y la comercialización internacional.

En la 12^o edición del Manual de Procedimiento de la Comisión del Codex Alimentarius el LMR se define como “la concentración máxima de residuos resultante del uso de un medicamento veterinario, expresada en mg/kg o en mg/L del peso del producto fresco, que se recomienda como legalmente permisibles o reconoce como aceptables dentro de un alimento o en la superficie del mismo”.

Los residuos en los alimentos de origen animal generan productos de baja calidad y eventualmente, constituyen un riesgo para la salud de los consumidores, pudiendo causar toxicidad aguda o crónica, efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas, etc.

Hace unos años era difícil definir qué es un residuo, cuando las técnicas analíticas detectaban solamente niveles elevados, el sólo hallazgo de concentraciones de sustancias extrañas en alimentos hablaba claramente de un riesgo para el consumidor. Actualmente, con el gran incremento de la sensibilidad de los métodos de detección, es muy fácil encontrar residuos de sustancias extrañas en alimentos de origen zoógeno.

Ciertas organizaciones, encargadas de garantizar la protección al consumidor como la Comisión del Codex Alimentarius, estipula el marco legal que rige el comercio internacional según lo resuelto por la Organización Mundial del Comercio (OMC), organismo que propicia prácticas equitativas en el comercio mundial de alimentos agropecuarios.

El Codex proporciona pautas sobre la higiene de alimentos, aditivos alimentarios, residuos de pesticidas, contaminantes, etiquetado y presentación, además informa de los métodos de análisis y pruebas, que suelen ser aceptadas por las autoridades de los distintos países, aunque cualquier reglamentación sobre inocuidad de alimentos de un país debe estar basada en una evaluación de riesgo científicamente sólida, so pena de padecer restricciones comerciales en el marco de las reglas de la Organización Mundial de Comercio (OMC) y evidencia la necesidad que tiene el país de fortalecer su capacidad de evaluación de exposición con rigor científico, la cual constituye la base para que los comités de expertos de la FAO/OMS determinen la evaluación de riesgos y las posteriores recomendaciones; a continuación, éstas constituyen la base para el establecimiento de normas y las recomendaciones del Codex.

Las recomendaciones generales se imparten a los gobiernos, a la industria (productores primarios, fabricantes y transformadores, operadores de servicios alimentarios y minoristas) y al consumidor, lo cual implica que cualquier país que decida adoptar las normas del Codex requiere de legislaciones alimentarias apropiadas, cuyos principios activos pueden originar residuos que exponen a los consumidores de alimentos de origen animal a la ingestión de sustancias o residuos potencialmente perjudiciales para la salud.

En este contexto, es vital aplicar programas de inocuidad de los alimentos para garantizar que sean seguros y cumplan con las normas establecidas. Un sistema de control es eficaz si asegura concentraciones permitidas de productos químicos en los alimentos de origen animal, condición que puede lograrse mediante la aplicación de directrices, como las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), las Buenas Prácticas Agrícolas o las Buenas Prácticas Veterinarias para el uso responsable y prudente de los medicamentos en Medicina Veterinaria.

Los niveles de residuos tienen directa relación con las etapas que influyen en la disposición de los fármacos, aunque la depleción completa de un fármaco en el organismo es difícil de establecer.

Los residuos presentes en alimentos de origen animal generan productos de escasa calidad e implican algún riesgo para la salud de los consumidores, no obstante, la problemática comúnmente se enfoca en tres elementos relevantes: la salud pública, el comercio internacional y la tecnología de procesamiento de subproductos:

a) Impacto en la salud pública: algunos grupos de antibióticos son capaces de desencadenar reacciones alérgicas como las sulfonamidas, pero siempre hay un componente fuertemente individual en estas reacciones que está representado por el terreno inmunológico del paciente. En general, la presencia de bajas concentraciones de antibióticos alérgicos, por ejemplo, los antibióticos betalactámicos, son insuficientes para sensibilizar pacientes.

Cuando ciertas sustancias exceden determinados límites en los alimentos ponen en riesgo la salud de los consumidores y provocan efectos leves hasta efectos tóxicos graves sobre los órganos y tejidos del cuerpo humano, aunque los problemas toxicológicos son bastante difíciles de comprobar, dadas las bajas concentraciones residuales de estos fármacos.

Los antibióticos aminoglucósidos, por ejemplo, causan toxicidad renal y auditiva, aunque es improbable que los niveles de residuales de estas sustancias en tejidos comestibles puedan provocar efectos tóxicos en los consumidores.

En cambio, otras sustancias generan efectos nocivos en dosis probablemente muy bajas, por ejemplo, los nitrofuranos son cancerígenos y el cloranfenicol es capaz de producir dos tipos de manifestaciones toxicológicas: 1) mielodepresión dosis dependiente que se presenta en el curso de un tratamiento con el fármaco y, 2) anemia aplásica dosis independiente, que desarrolla en individuos susceptibles, y que es irreversible una vez instalada.

Los derivados fenicoles como tianfenicol y florfenicol, si bien pueden generar algún tipo de mielo depresión dosis dependiente que cede al suprimir el tratamiento o reducir la dosis, no causan la anemia aplásica que puede producir el cloranfenicol, lo que motivó la prohibición de cloranfenicol en algunos países, aunque no sucede lo mismo con los otros fenicoles.

En este sentido, es evidente la preocupación de los organismos responsables de la salud pública relacionada con los efectos resultantes del consumo ciertas sustancias químicas presentes en los alimentos de origen animal, y en especial, por los posibles efectos teratogénicos y cancerígenos.

Este escenario hace que las medidas de control necesarias para garantizar la inocuidad y calidad de los alimentos exportables adquieran paulatinamente mayor exigencia, en parte potenciadas por crisis originadas por la presencia de residuos peligrosos (clembuterol en hígado bovino, nitrofuranos en miel, etc.) cuando adquieren estado público.

b) La segunda inquietud son las restricciones comerciales internacionales que pueden sufrir los países productores de alimentos sin garantías de inocuidad y calidad.

Adicionalmente, son también conocidas las dificultades que puede tener la comercialización internacional de carnes por las alteraciones locales (irritación y necrosis) posibles tras la administración de ciertos fármacos relacionados con la concentración utilizada o la escasa solubilidad local de la formulación farmacéutica según los sitios de aplicación.

c) Finalmente, por el impacto tecnológico negativo en los procesos de elaboración de subproductos con lo cual se perjudican las industrias cárnica o láctea.

En este contexto, la industria láctea es la más afectada por la presencia de residuos de inhibidores (especialmente antimicrobianos) en la leche que alteran el proceso de fermentación necesario para la elaboración de alimentos derivados.

En los procesos de industrialización láctea la incidencia negativa originada por los antimicrobianos es muy significativa; experiencias realizadas en vacas relevan que sólo 10 litros de leche provenientes de una vaca tratada con antibióticos pueden perturbar el procesado de 80.000 litros de leche y resultar positiva a inhibidores una cisterna que contiene 200.000 litros de leche.

Además, los cultivos iniciadores para producción de yogurt y queso son sensibles a concentraciones relativamente bajas de antimicrobianos. Esto puede repercutir claramente en pérdidas económicas. El procesado de leche que contiene estos fármacos, actúa como sustancia inhibitoria para la preparación de lactofermentos, demoran la multiplicación de las bacterias lácticas o bloquean su acción y modifican el equilibrio microbiológico.

El desarrollo de otros microorganismos productores de gases altera la acidificación de la masa y generan un exceso de humedad en la misma. Esta fermentación anormal

modifica el gusto del queso; produce un sabor amargo por la liberación de peptonas de procesos proteolíticos sostenidos de microorganismos coliformes, y sabor picante por rápida lipólisis.

Los microorganismos gramnegativos y coliformes presentan, a diferencia de los lactobacilos, una gran capacidad para desarrollarse en presencia de antibióticos. La penicilina en concentraciones de 0,2-0,7 ppm puede bloquear el proceso de acidificación y a 0,01 ppm puede bloquear la formación normal del aroma del queso.

Como réplica a los aspectos de salud pública y a los problemas que originan en la industria, muchos países han adoptado el sistema de imponer sanciones económicas a los establecimientos que producen leche con residuos de antimicrobianos.

En el proceso industrial, el rol desempeñado por las bacterias lácticas es fundamental: son responsables de la acidificación de la leche, que permiten la coagulación de la caseína, además, participan en el desarrollo aromático de numerosos derivados lácteos. Reducidas cantidades de antimicrobianos inhiben o perturban el proceso normal de fermentación que realiza la industria láctea, afectando la fabricación de derivados o sus propiedades organolépticas.

Aún la CMI difiere con las cepas consideradas, las bacterias lácticas son muy sensibles a antimicrobianos utilizados en el tratamiento de mastitis: los estreptococos lácticos mesófilos son parcialmente inhibidos por concentraciones de penicilina de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y completamente por 0,2-0,3 $\mu\text{g/ml}$. *Streptococcus thermophilus* y los lactobacilos, son diez veces más susceptible a penicilina que los estreptococos mesófilos.

El proceso de pasteurización no siempre modifica el contenido de antibióticos de la leche: algunas sustancias experimentan pérdida parcial de la actividad microbiológica, mientras otras resisten altas temperaturas, como sucede con las fluoroquinolonas.

Con el propósito de atenuar el impacto de los residuos y brindar seguridad al consumidor de alimentos, cada nuevo fármaco o que se implemente en otra especie animal, debe ser evaluado para determinar su comportamiento y su aptitud sobre el animal: son requisitos indispensables establecer parámetros farmacocinéticos que permiten interpretar el destino en el organismo y analizar sus antecedentes toxicológicos para establecer los niveles máximos de residuos (LMR) en los alimentos.

Estas herramientas permiten hacer un uso racional del fármaco y con la información obtenida, determinar un periodo de espera, resguardo o retirada (Pr), que corresponde al período de tiempo que debe transcurrir desde que culmina la aplicación del fármaco hasta que el animal o sus subproductos se destinan a consumo humano, de modo que los residuos en determinados tejidos se encuentren en cantidades tolerables de modo de proteger la salud de los consumidores.

El Pr se establece en cada especie animal e inclusive puede variar entre los distintos productos alimenticios. En consecuencia, la extrapolación de datos interespecíficos puede generar resultados inciertos, más entre mamíferos y aves, considerando las di-

ferencias anatómicas y funcionales, en particular aquellas referidas a la absorción intestinal, a procesos metabólicos y eliminación de los fármacos, con obvias implicancias farmacocinéticas.

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

Sin duda el tema residuos de fármacos es complejo, aun para el mismo principio activo difiere según el esquema productivo, el producto comestible en cuestión, el modo de aplicación y la formulación farmacéutica utilizada.

En Medicina Veterinaria la presencia de residuos se asocia con el uso de medicamentos veterinarios, en particular antihelmínticos, antibióticos, hormonas e insecticidas, asociados al empleo masivo. Sin embargo, es necesario considerar que no todos los principios activos aplicados en los animales en producción generan residuos, ni todos los residuos generados son nocivos.

La inocuidad de los alimentos es un desafío mayor, consecuencia del proceso de expansión de la población mundial, los cambios en los hábitos de consumo, la globalización del comercio de alimentos y la intensificación de los sistemas de producción agropecuarios.

En la actualidad, la producción de alimentos de origen animal inocuos, sin presencia de residuos químicos que atenten contra la salud de los consumidores, constituye una preocupación importante a escala mundial y demanda soluciones urgentes por sus implicaciones en la salud pública y el comercio internacional de alimentos.

En relación al control de residuos de fármacos veterinarios, en Argentina el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) lleva a cabo el Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos (CREHA), cuyo objetivo es afianzar la sanidad y la inocuidad de los alimentos para garantizar la salud de los consumidores.

Este posicionamiento contribuye a mantener los mercados abiertos para la exportación de todas las especies y productos que elabora nuestro país. Además, intenta concientizar a los consumidores sobre el control de residuos e higiene de los alimentos para garantizar la salud pública y lograr un estándar sanitario que asegure la inocuidad de los alimentos en todo el país.

Este plan fue aprobado por los servicios sanitarios de la Comunidad Económica Europea (CEE) y de los Estados Unidos, entre otros países. Sin embargo, estos objetivos están orientados a productos exportables y no siempre son accesibles por pequeños productores o actores vinculados a la seguridad alimentaria que habitan en pequeñas

localidades del interior provincial particularmente cuando refiere a la toma de conciencia sobre el control de residuos.

Los residuos constituyen una realidad con incidencia local desconocida, en algunos casos resultado de acciones irresponsables y en otros por desconocimiento por los actores involucrados. Los consumidores perciben la situación que genera varios mitos y con frecuencia tienden a generalizar, por ejemplo, por el empleo de hormonas en animales genera alarma -debido al contenido emocional que implica el término hormona- sin embargo, no todas las hormonas ofrecen idéntica toxicidad.

En cambio, otros minimizan efectos que no se visualizan, por ejemplo, el incremento de la resistencia bacteriana consecuencia del uso de ciertos antimicrobianos y muchos consideran que la ocurrencia de residuos es más probable en los productos alimenticios destinados al mercado interno.

En el pasado, el control de los alimentos estaba dirigido al examen de los productos finales y a la inspección de los establecimientos donde se elaboraban y distribuían los alimentos. En cambio, en la actualidad la incorporación de nuevas tecnologías ha permitido lograr progresos importantes sobre la necesidad de involucrar de manera integral y multidisciplinaria toda la cadena productiva desde el lugar donde se producen hasta su consumo, debido a que muchos de los problemas de inocuidad de los alimentos se originan en la producción primaria.

Esta situación implica que la responsabilidad de proveer alimentos debe ser compartida desde el proveedor de insumos hasta el consumidor, lo cual significa nuevas redefiniciones y coordinaciones de los sectores público y privado, incluso universidades y centros de investigación y significa que deben ser aplicadas medidas reglamentarias y no reglamentarias en los puntos adecuados de la cadena alimentaria, desde las fases anteriores a la producción hasta los establecimientos o puntos de distribución a los consumidores, como única manera de garantizar el abasto de alimentos inocuos para la población humana de modo este es uno de los grandes desafíos como consecuencia del proceso de expansión de la población mundial, los cambios en los hábitos de consumo, la globalización del comercio de alimentos y la intensificación de los sistemas de producción agropecuarios.

Riesgos inherentes al empleo de antimicrobianos en animales domésticos

La resistencia bacteriana

El uso de antimicrobianos en la farmacoterapia se ha convertido en uno de los eventos más exitosos de la medicina moderna, sin embargo, el optimismo inicial generado fue paulatinamente reemplazado por la concientización de los problemas que origina una modificación en los patrones de sensibilidad bacteriana.

La resistencia bacteriana natural es definida por el espectro de cada fármaco, mientras que la adquirida constituye un problema central en la terapéutica antiinfecciosa,

puesto que la efectividad de los fármacos disponibles se compromete con la manifestación de resistencia.

La situación planteada, suscribe la trascendencia la valoración in vitro de la sensibilidad a partir de cepas obtenidas de casos clínicos, como orientación terapéutica.

Según representa la figura 1, los genes resistentes codifican diferentes mecanismos por medio de los cuales los microorganismos pueden resistir los efectos inhibitorios de agentes antimicrobianos específicos, tales como:

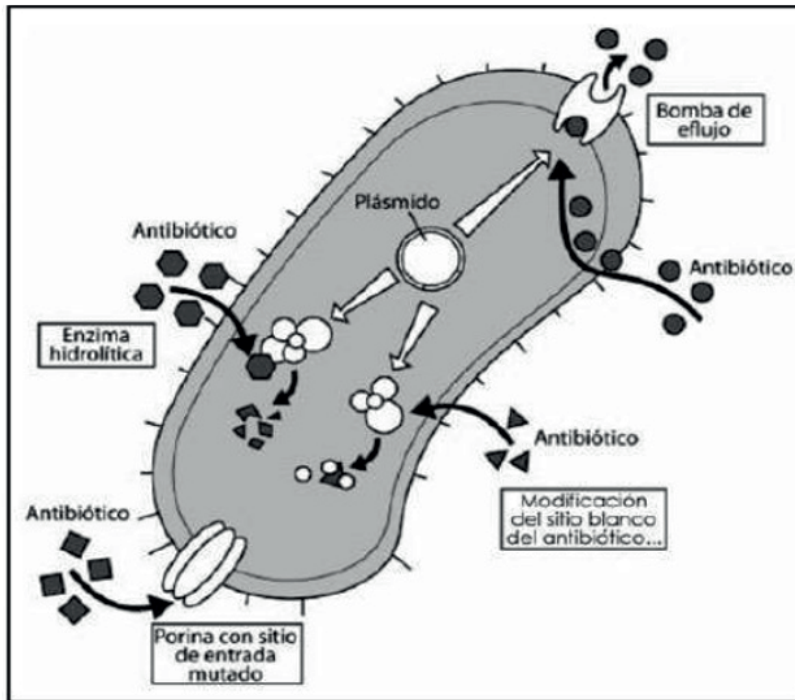


Figura 1: Mecanismos implicados en la resistencia bacteriana

Inactividad microbiológica por modificaciones estructurales, en el sitio de acción del antimicrobiano.

Inactivación enzimática: la bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producir las. En los grampositivos suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares, mientras en los gramnegativos las enzimas tienen origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas. También poseen enzimas modificantes de aminoglucósidos, el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas.

Mutaciones en las porinas de la pared bacteriana que reducen el ingreso de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios). En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico mediante la expresión de bombas de expulsión que impiden que se acumule en cantidad suficiente en el interior bacteriano.

La resistencia adquirida es determinada genéticamente por mutaciones cromosómicas generalmente graduales, que suceden al azar y carecen de sentido adaptativo. Esta modalidad implica modificaciones estructurales y se transmite sólo durante la replicación celular, mientras que la transmisible, involucra el intercambio de material genético entre bacterias, es relevante e inclusive puede implicar varios antimicrobianos simultáneamente.

El ADN responsable de la resistencia puede autorreplicarse intracelularmente y luego propagarse a otras células por los mecanismos de transducción, transformación, transposones, integrones, etc. Lamentablemente, la resistencia transmisible fue identificada para la mayoría de los antibacterianos.

El desarrollo de resistencia es favorecido por la presión de selección, particularmente cuando se utilizan antimicrobianos como promotores del crecimiento animal. Sin embargo, diversos factores pueden ser significativos, por ejemplo, el régimen de administración, la dosis utilizada, la disposición de los fármacos en el organismo, los niveles obtenidos, las rutas de eliminación, etc.

En humanos, la resistencia a ciprofloxacina observada sobre bacterias entéricas se relacionó con las elevadas concentraciones que alcanza en el lumen intestinal, que exceden entre 10 a 100 veces las plasmáticas.

El uso incorrecto de antibióticos puede generar el desarrollo de resistencia bacteriana en animales tratados. Estas bacterias podrían transmitirse al hombre causando dificultades en el momento de tratar infecciones humanas, por ejemplo, se determinaron microorganismos coliformes antibiótico-resistentes en carne cruda y cocida.

Asimismo, los antibióticos consumidos por seres humanos provenientes de residuos presentes en alimentos de origen animal, pueden generar una alteración de la flora intestinal y como consecuencia una disminución de bacterias que compiten con microorganismos patógenos, aumentando el riesgo de enfermedad.

Toxicidad en el animal huésped

Esta situación implica contemplar efectos tóxicos dosis dependientes sobre las células, efectos adversos que surgen en situaciones especiales como los que derivan de la interacción con otros fármacos, aplicación en animales viejos o con determinadas patologías, por interferencia con la microflora normal del huésped, por fenómenos alérgicos, etc.

Regulación internacional de fármacos de uso veterinario

En el pasado, el control de los alimentos se orientaba al examen de productos finales y a la inspección de los establecimientos elaboradores.

En la actualidad, la incorporación de nuevas tecnologías en los procesos de producción de alimentos, supone la necesidad de involucrar de manera integral y multidiscipli-

naria toda la cadena productiva desde el lugar donde se producen hasta su consumo, debido que muchos de los problemas de inocuidad de los alimentos se originan en la producción primaria.

La situación implica que la responsabilidad de proveer alimentos debe ser compartida desde el proveedor de insumos hasta el consumidor, lo que significa nuevas redefiniciones y coordinaciones de los sectores público y privado, adoptando medidas en todos los eslabones de la cadena alimentaria, como única manera de garantizar el abasto de alimentos inocuos para la población humana. En este contexto, de modo que los medicamentos veterinarios sólo se autorizan en especies de abasto tras la evaluación de residuos.

La Federal Drug Administration (FDA) de los EEUU, 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), son los organismos oficiales que regulan la aprobación de medicamentos y evalúan los problemas de residuos en alimentos de origen animal, en los diferentes mercados.

Valoración del riesgo

El diseño de regímenes de administración debe contemplar eventuales residuos del fármaco en tejidos comestibles que puedan afectar negativamente la salud del consumidor o impliquen sanciones de orden económico.

Al respecto, los organismos internacionales de control estipulan para cada fármaco y cada tejido comestible de una especie animal determinada un límite máximo de residuos o LMR, establecidos mediante estudios de toxicidad crónica en animales de laboratorio y que contemplan una cantidad de fármaco “non observable effect level” (NOEL).

Según la información obtenida, el paso siguiente es determinar el nivel de ingesta diaria admisible (IDA), mediante factores de seguridad de 100 a 1000 veces para el NOEL -según la gravedad de los antecedentes toxicológicos disponibles- que avalen inocuidad al consumidor de alimentos.

El problema que se presenta en la actualidad es definir los niveles que representan riesgos para la salud pública. No siempre la presencia de un residuo tiene efectos sobre los consumidores, existe un nivel, para cada sustancia, por debajo del cual esta no tiene ningún efecto sobre el consumidor.

Si bien cualquier compuesto administrado voluntaria o inadvertidamente a un animal, o ingresado en el mismo vía contaminación ambiental, mantiene sus concentraciones en el organismo durante un tiempo más o menos prolongado, existen algunos tipos de sustancias que, en general, persisten más tiempo. Entre ellas podemos citar fármacos, pesticidas, contaminantes ambientales y tóxicos naturales. La persistencia en

seres vivos de sustancias extrañas -comúnmente denominadas xenobióticos- hizo que se contemplara cuidadosamente la capacidad de estas sustancias de inducir efectos negativos, ya que es obvio que su desaparición completa de un organismo vivo es casi imposible.

Dadas las condiciones citadas, resulta importante considerar el concepto de ingesta diaria aceptable (IDA), que refiere a la dosis diaria de residuos medicamentosos o químicos que durante toda la vida aparece en una persona sin riesgo apreciable alguno para la salud, de acuerdo a los conocimientos científicos de ese momento. “Sin riesgo apreciable”, significa certeza de que la exposición durante toda la vida al residuo no dará lugar a ningún efecto perjudicial.

El establecimiento del IDA de un residuo medicamentoso o químico constituye una guía para conocer la cantidad máxima que puede ingerirse diariamente con el alimento sin riesgo apreciable para el consumidor.

La IDA constituye la base para obtener el límite máximo de residuo (LMR), que son las concentraciones máximas permitidas en una matriz determinada (leche, carne, miel, etc) de una sustancia química. El LMR varía de un país o bloque comercial a otro y estos tienen que ser tenidos en cuenta en el momento de exportar algún producto de origen animal.

Con el propósito de reducir estas diferencias, en 1995 se constituyó un programa de armonización internacional de requisitos técnicos de los registros de medicamentos veterinarios. Este programa, conocido como VICH (Veterinary International Cooperation on Harmonisation), se concreta con el auspicio de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), y agrupa representantes de Europa, Estados Unidos y Japón y cuenta como observadores a representantes de Nueva Zelanda, Australia y Mercosur.

El establecimiento de los LMR posibilita la concretar dos objetivos fundamentales para garantizar la seguridad del consumidor, en primer lugar, la ejecución de programas de control con el objeto de comprobar que el contenido de residuos en los tejidos comestibles no supera los correspondientes LMR y, en segundo lugar, permite la definición de tiempos de espera de las especialidades farmacéuticas veterinarias, para las que se solicite la autorización de comercialización.

La detección y cuantificación de xenobióticos, entre ellos antibióticos en leche, por debajo del LMR, hasta hace no mucho tiempo estaban al alcance de pocos laboratorios especializados, y resultaban complejas y costosas.

El avance tecnológico permitió la realización de pruebas químicas confiables, rápidas y económicas, gracias a las cuales las industrias lácteas, los veterinarios dedicados a producción lechera y los mismos productores, pueden detectar la presencia de niveles prohibidos de residuos de antimicrobianos en la leche cruda.

Control de residuos

La depleción completa de un fármaco en el organismo es muy difícil de establecer. Con el propósito de atenuar el impacto de los residuos y brindar seguridad al consumidor de alimentos, para cada fármaco y especie animal tratada se estipula un periodo de resguardo, retirada o Pr.

El Pr corresponde al período de tiempo que debe transcurrir desde que culmina la aplicación del fármaco hasta que el animal o sus subproductos se destinan a consumo humano, de modo que los residuos en determinados tejidos se encuentren en cantidades tolerables.

Los niveles de residuos tienen directa relación con las etapas que influyen en la disposición de los fármacos, de modo que el Pr se establece en función de parámetros cinéticos obtenidos propios para cada especie animal e inclusive puede variar entre los distintos productos alimenticios.

En consecuencia, la extrapolación de datos interespecíficos puede generar resultados inciertos, más aún cuando sucede entre mamíferos y aves, considerando las diferencias anatómicas y funcionales, particularmente aquellas referidas a la absorción intestinal, a los procesos metabólicos y de eliminación de los fármacos, con obvias implicancias farmacocinéticas.

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

Si las recomendaciones acerca del período de resguardo establecido para cada fármaco no se respetan, existe el riesgo de presencia de residuos en el alimento. Altos niveles de residuos en productos comestibles pueden provocar reacciones alérgicas en individuos hipersensibles.

En contraste, dosis reducidas de antimicrobianos usados durante extensos períodos de tiempo puede resultar en bacterias resistentes que se transfieren desde el alimento al hombre.

Estas resistencias pueden generar fracasos terapéuticos en tratamientos veterinarios, y aumentar el riesgo de transferencia de bacterias resistentes de los animales al hombre, o de genes portadores de información que codifican resistencia de bacterias de animales a cepas bacterianas humanas. El Codex Alimentarius plantea que el problema de la resistencia en los animales domésticos es multidimensional, en cuya solución están implicados la industria farmacéutica veterinaria, el Médico Veterinario y el productor.

La responsabilidad del profesional consiste en utilizar antibacterianos sólo cuando es necesario, limitando la duración del tratamiento implementado lo indispensable, a los efectos de reducir la exposición de la población bacteriana al antimicrobiano.

Estudios de residuos

Los estudios cinéticos describen los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de la sustancia de interés en animales sanos de la especie de destino. En los estudios de depleción, el propósito es determinar cuánto y durante cuánto tiempo permanecen los residuos de un fármaco en los tejidos comestibles y en qué momento estos niveles residuales se encuentran bajo el límite de tolerancia (figura 2), situación que demanda el desarrollo de métodos analíticos sencillos, sensibles, que a posteriori puedan aplicarse en los programas de monitoreo.

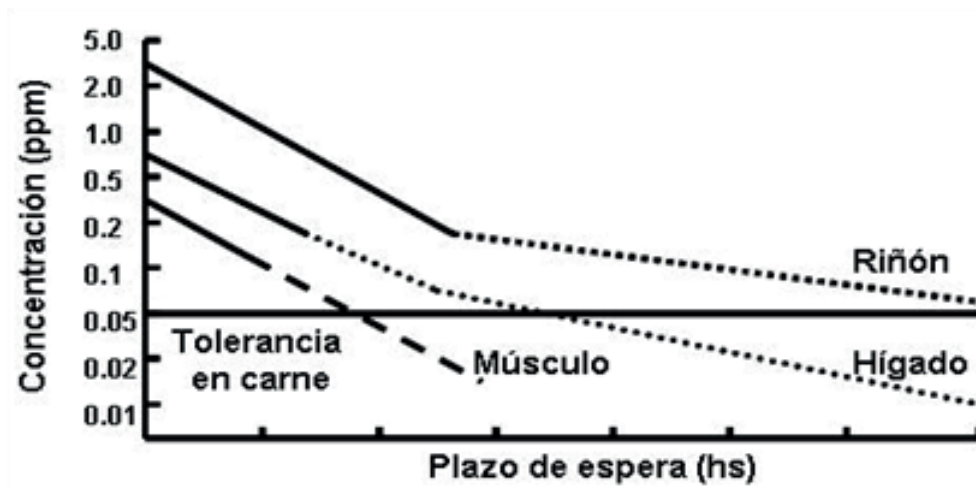


Figura 2: Curva de depleción simulada de un fármaco en distintos tejidos.

La curva de depleción es necesaria para establecer el $t_{1/2\beta}$, de interés terapéutico, en cambio la vida media terminal γ ($t_{1/2\gamma}$), (figura 3), definida al incorporar las concentraciones subinhibitorias, es necesaria para establecer el Pr mediante la ecuación:

$$Pr = 1,44 \cdot \ln (Co / \text{tolerancia}) \cdot t_{1/2\gamma}$$

dónde: ln= logaritmo natural, tolerancia corresponde al LMR. Co= intercepto de la fase de eliminación, $t_{1/2\gamma}$ = tiempo medio de la fase de eliminación diferida obtenida en cada tejido estudiado.

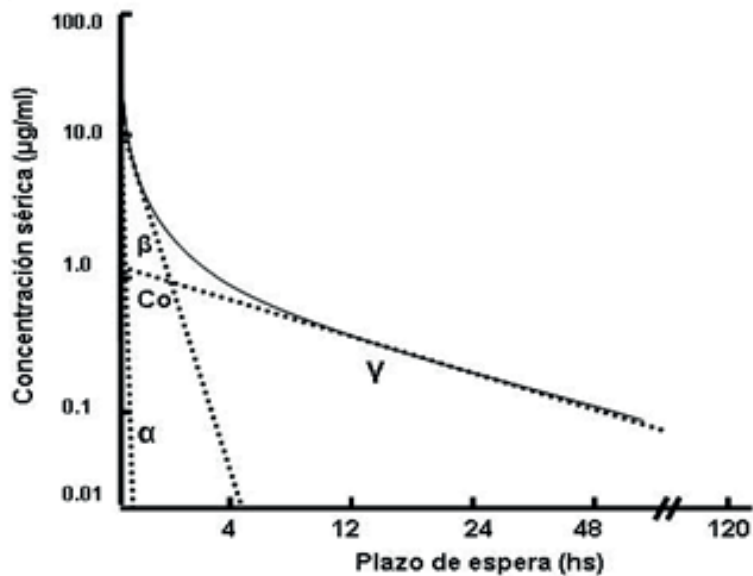


Figura 3: Representación semilogarítmica de concentraciones tisulares vs tiempo. Referencias. α = fase de distribución, β = fase eliminación, γ = fase de eliminación diferida, C_0 = intercepto de la fase de eliminación.

En general, la mayor concentración tisular se comprueba de inmediato después del tratamiento, incluso es corriente observar diferencias entre tejidos. Los niveles hepáticos y renales suelen superar a los musculares. Con el tiempo, los procesos metabólicos y excretorios normales del animal eliminan el fármaco del organismo.

En el caso de ectotermos, por ejemplo, la trucha Arco iris, no tiene capacidad para regular su temperatura corporal, por lo que ésta permanece similar a la del medio. Por esta razón, es posible estimar estados fisiológicos de desarrollo (eclosión, primera alimentación, engorde, peso a la faena) a través de las unidades térmicas acumuladas (UTA).

El mismo criterio se adopta para el cálculo del periodo de resguardo, ya que el mismo se modifica con la temperatura del agua. El cálculo de las UTA se obtiene de la sumatoria de la media diaria de la temperatura del agua en grados centígrados ($^{\circ}\text{C}$), por un período de “n” días y puede expresarse en grados/día.

Para estimar el período de resguardo en días, y a modo de ejemplo si se registrara un valor de 300 grados/día, con una temperatura media del agua de 20°C , implica que se requieren 15 días de resguardo, antes de que sus productos puedan ser consumidos asegurando que el residuo de droga en sus tejidos está por debajo del límite indicado como seguro. En el mismo sentido, el período de resguardo se puede calcular multiplicando un período de referencia en días por las UTA de cada establecimiento, en base a sus registros diarios de temperatura.

Capítulo III

Fluoroquinolonas

El desarrollo de las quinolonas surge tras el descubrimiento de las propiedades antibacterianas de un derivado de naftiridinas, el ácido nalidíxico, ocurrido en 1962 y considerado el precursor del grupo. A partir del ácido nalidíxico se desarrollaron varios compuestos con características similares, que sólo se establecieron como antisépticos urinarios, y que conformaron la primera generación de quinolonas. Algunos miembros son los ácidos pipemídico y oxonílico y flumequine.

Entonces, representaban fármacos que demostraban una efectividad relativamente baja, ocupando un lugar poco relevante en la quimioterapia puesto que actúan únicamente frente a microorganismos gramnegativos, tales como *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, excepto *Pseudomonas spp.*

En 1978, comenzó el desarrollo intenso de las fluoroquinolonas, moléculas sintéticas generadas por modificaciones estructurales del esqueleto 4-quinolona o 4-oxo-1,4 dihidroquinolona.

La fluoración de la molécula original en posición C6, generó sustancias provistas de amplio espectro antibacteriano y con características cinéticas más ventajosas que los agentes precedentes. Los continuos progresos determinaron la vigencia de varias generaciones, que se amplíe su uso y continúen en desarrollo.

Los agentes de segunda generación, representados inicialmente por norfloxacin, un quimioterápico importante en el tratamiento de las infecciones urinarias y, luego, por ciprofloxacina, debido a la extensión del espectro antibacteriano y el logro de concentraciones plasmáticas y tisulares bactericidas, proyectaron al grupo como fármacos realmente revolucionarios, activos por vía oral y con escasa incidencia de efectos adversos.

La segunda generación afecta bacterias gramnegativas, incluso *Pseudomonas spp* y determinados microorganismos grampositivos, micobacterias y ciertos patógenos atípicos. El grupo comprende también a enrofloxacin, difloxacina y marbofloxacina.

Los miembros de la tercera generación comprenden a gatifloxacina, moxifloxacina y levofloxacina, presentan propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas que, respecto a las precedentes, constituyen ventajas significativas como agentes antimicrobianos.

Este grupo mantiene su actividad frente a microorganismos gramnegativos y además la extiende a grampositivos, anaerobios, micobacterias y patógenos atípicos.

Luego de la aplicación oral, estas fluoroquinolonas experimentan rápida disolución en el medio gastrointestinal, que se acompaña con una adecuada y pronta absorción

en duodeno y yeyuno, y brindan niveles máximos ($C_{m\acute{a}x}$) plasmáticos entre 1 y 2 horas posteriores a la administración.

El carácter lipofílico de estas sustancias promueve la absorción intestinal por difusión pasiva, aunque el transporte mediado por transportadores a través de la membrana apical fue demostrado para algunos integrantes del grupo, inclusive levofloxacin.

Estas sustancias presentan elevados volúmenes de distribución, superiores a los agentes de segunda generación y consiguen concentraciones elevadas en los tejidos pulmonar, renal, reproductor, vesícula y líquido biliar, significativamente mayores a las plasmáticas, aunque la variabilidad entre individuos en cuanto al cociente tejido/plasma alcanza el 82%.

Las fluoroquinolonas alcanzan no sólo en el líquido extracelular sino también en el espacio intracelular y logran concentraciones intracelulares muy altas en macrófagos y otras células fagocíticas, varias veces superiores a las plasmáticas.

Las nuevas fluoroquinolonas aportan importantes mejoras farmacocinéticas respecto a compuestos precedentes, son ventajosas la excelente absorción digestiva, la amplia distribución tisular y la extensa vida media biológica, lo que implica que pueden ser administradas en una sola dosis diaria.

Relación estructura-actividad

Las fluoroquinolonas son moléculas anfóteras que pueden estar protonadas en el grupo carboxílico o en la amina terciaria; son bases orgánicas, cuyo pK_a se ubica entre 5,2 y 8,5.

Son sustancias ligeramente hidrosolubles que a pH fisiológico se comportan como zwitteriones, en el que están cargados tanto los correspondientes grupos aniónicos como los catiónicos. A pesar del que poseen un grupo carboxilo, el grado de ionización de estos compuestos es limitado y exhiben elevada liposolubilidad en un intervalo de pH ubicado entre 6 y 8.

Durante un tiempo, las fluoroquinolonas fueron consideradas como un grupo homogéneo, con propiedades semejantes, pero las posibilidades de transformación de su estructura química promovieron el desarrollo vertiginoso del grupo, originando agentes provistos de mayor espectro antibacteriano, elevada penetración tisular, seguros y con menor manifestación de resistencia microbiana.

La estructura básica de estos agentes está conformada por un par de anillos (figura 1), presentan un nitrógeno en la posición 1, un grupo carboxilo en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4; las posiciones 2, 3 y 4, parecen ser críticas para la actividad de las quinolonas.

Las sustituciones químicas realizadas en distintas posiciones modifican profundamente distintas características farmacológicas, como la biodisponibilidad oral o la potencia con respecto a determinados grupos bacterianos.

La introducción de flúor en C6 es esencial para inhibir la enzima ADN girasa, extiende la acción hacia bacterias grampositivas y reduce el valor de la CMI aproximadamente 100 veces en los integrantes de la tercera generación.

A partir de la estructura primaria se efectuaron modificaciones en la posición N1 y en las posiciones C6, C7 y C8, dando origen a más de 10.000 derivados.

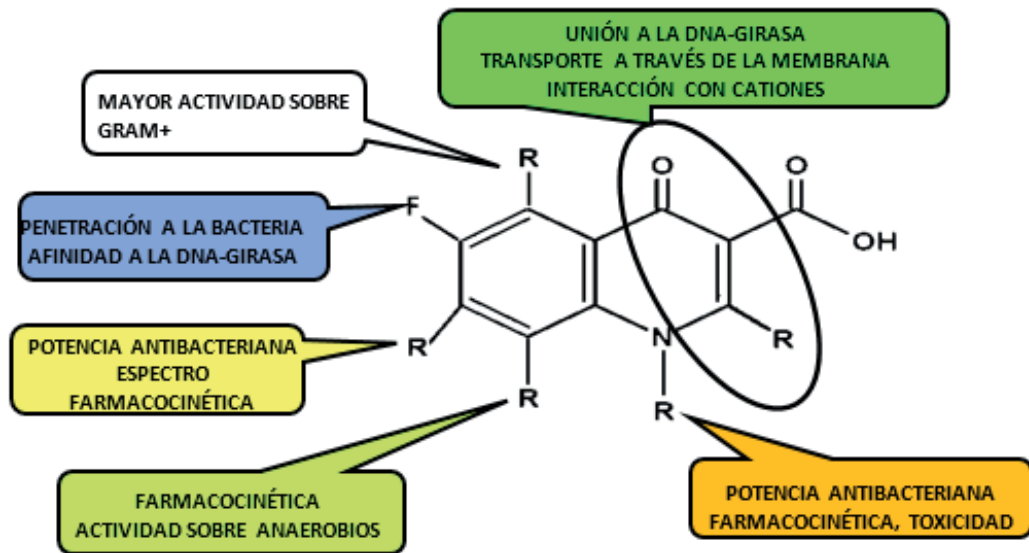


Figura 1: Farmacóforo de las fluoroquinolonas

La introducción de flúor en C6 es esencial para inhibir la enzima ADN girasa, extiende la acción hacia bacterias grampositivas y reduce el valor de la CMI aproximadamente 100 veces en los integrantes de la tercera generación.

La incorporación de flúor en C8 asegura estabilidad metabólica, reduce la velocidad de eliminación y aumenta significativamente la actividad biológica, al desarrollar actividad sobre estafilococos, mientras que el agregado de un segundo átomo de flúor en la misma posición provoca mejoras en el perfil cinético.

El nitrógeno de la posición N1 y el ácido carboxílico en C3 son requisitos indispensables para desarrollar la actividad antibacteriana.

Los cambios estructurales más relevantes para obtener nuevos derivados se han efectuado sobre las aminas en posición 7 debido a la facilidad de incorporar diferentes cadenas laterales.

La inclusión de los grupos piperazina, aminopirrolidina y derivados con distintas sustituciones permitieron la síntesis de nuevas moléculas caracterizadas por mayor biodisponibilidad respecto a las generaciones anteriores.

La alquilación del anillo piperazínico amplía la acción hacia los gérmenes grampositivos, facilita la absorción intestinal e incrementa la vida media de eliminación. El agregado de un grupo piperazina en la posición C7 aumenta la actividad sobre *Pseudomonas* spp.

Algunos efectos colaterales están muy relacionados con algunos sustituyentes. Las moléculas que poseen grupos piperazínicos y pirrolidínicos en C7 pueden producir efectos sobre el sistema nervioso central por interferir la unión del receptor GABA-A con su ligando natural.

Un reemplazo en posición 8 condiciona la fototoxicidad; cuando el sustituto es flúor, los compuestos son inestables a la radiación ultravioleta, formando productos de degradación tóxicos. Los cambios en N1 (ciclopropilo) y en C7 y posición 8 de la estructura están relacionadas con la genotoxicidad.

Modo de acción

La acción antimicrobiana consiste fundamentalmente en la inhibición de la síntesis de ADN microbiano, provocado por el bloqueo de la subunidad A de la enzima ADN girasa también denominada topoisomerasa II, esencial para la duplicación del ADN (Figura 2).

Las bacterias afrontan un problema topológico, debido que cuentan con sólo 2 µm de longitud por 1 µm de ancho y deben contener en su interior un ADN de doble cadena de 1.300 µm de longitud.

La enzima ADN girasa, conformada por las subunidades GyrA y GyrB, es responsable del enrollamiento de las bandas, conserva los cromosomas en un estado de súper espiral y los fija a la superficie interna de la célula. Además, la enzima repara mini roturas de filamentos de ADN que ocurren durante el proceso de multiplicación.

Las fluoroquinolonas también inhiben la topoisomerasa IV, una enzima homóloga de la ADN girasa integrada por dos subunidades A y dos subunidades B, codificada por los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, esta enzima topoisomerasa IV, es encargada de separar la parte replicada del ADN, bloqueo principal en las bacterias grampositivas

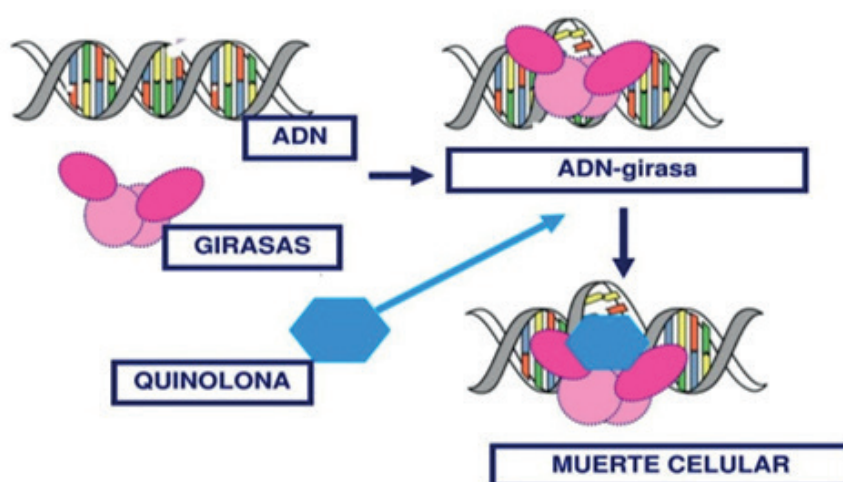


Figura 2: Mecanismo de acción de quinolonas

Las fluoroquinolonas también inducen una reacción de alarma, que consiste en la inducción de la síntesis no replicante del ADN e inhibición de la división celular sobre la

filamentación, que determina la eliminación de la bacteriana, debido a la concentración y al tiempo de exposición del ADN al agente tóxico.

Estas sustancias afectan microorganismos de localización intracelular, puesto que logran concentraciones 4 a 10 veces superiores respecto al medio extracelular.

Resistencia bacteriana

Para desplegar su efecto citotóxico estas sustancias deben ingresar a través de la membrana bacteriana y alcanzar su diana celular, la enzima ADN girasa o la topoisomerasa IV e inducir la muerte de la célula.

Un mecanismo posible de resistencia es la alteración en la permeabilidad de la membrana que reduce el ingreso al interior celular.

En general, la resistencia surge de forma espontánea debido a mutaciones puntuales en los genes que codifican la ADN girasa y la topoisomerasa IV, originando la denominada quinolone resistance-determining region o QRDR.

Los cambios en los aminoácidos de la QRDR alteran la estructura del sitio de unión con el complejo ADN girasa y reducen la afinidad a las fluoroquinolonas.

La mutación producida en el gen *gyrA* -que codifica la subunidad A de la ADN girasa- constituye el mecanismo de resistencia más frecuente en los gramnegativos, inclusive *Escherichia coli*, mientras que la modificación inducida en el gen *parC* -que codifica la subunidad C de la topoisomerasa IV- es habitual en grampositivos.

Recientemente, se demostró que la sobreexpresión de bombas de expulsión activa genera resistencia en microorganismos grampositivos y negativos.

Los mecanismos involucrados pueden manifestarse solos o combinados, aunque in vivo el incremento de resistencia se asocia con modos simultáneos.

La resistencia resulta principalmente de mutaciones cromosomales de baja frecuencia. Sin embargo, se comprobó un informe de resistencia mediada por plásmidos, que no aparenta subsistir.

Actualmente, se acepta que la resistencia transferible es extremadamente rara, sin embargo, es concebible que, en el futuro, la transferencia horizontal del gene puede constituirse en un medio muy importante de la resistencia que confiere al grupo.

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

Este inconveniente ha estimulado controversias importantes respecto a su aplicación en los animales de producción cuyos productos y subproductos ingresan en la cadena alimentaria humana, tras la manifestación de cepas *Campylobacter jejuni* resistentes y la menor susceptibilidad de *Salmonella thiphymurium* a la ciprofloxacina, inmediatamente después de aprobarse la enrofloxacin para uso en animales en el Reino Unido.

En la actualidad la Administración Federal de Drogas (FDA) de USA no autoriza el uso de nuevas fluoroquinolonas en animales destinados a producción debido al incremento de cepas hospitalarias resistentes, aspecto relacionado con la aplicación oral y la presunción de ineffectividad de estos fármacos para tratar infecciones en humanos, particularmente aquellas causadas por los géneros *Campylobacter spp* y *Salmonella spp*.

Las cepas bacterianas resistentes a una fluoroquinolona generalmente poseen resistencia cruzada con sus congéneres, inclusive las usadas en terapéutica veterinaria y las disponibles para Medicina Humana, situación que puede tornarse en un problema de importancia en salud pública por la elevada estabilidad térmica que exhiben estas sustancias cuando se encuentran en tejidos comestibles, propiedad que las protege de temperaturas extremas como las que se logran durante la cocción de los alimentos.

Los cocientes predictores de eficacia $ABC/CMI \geq 125$ y $C_{\max}/CMI \geq 10$, se aconsejan cuando se utilizan fluoroquinolonas, acorde al concepto de fármacos concentración dependiente de estas sustancias, mientras la erradicación rápida de patógenos es reportada con relaciones $ABC/CMI \geq 250$.

Si este cociente permanece <125 , un escalonado aumento en la expresión de resistencia y la incompleta erradicación es observada. En conclusión, la manifestación de mutantes resistentes tiene relación directa con los regímenes de dosis implementados.

Perfil toxicológico

En humanos, las fluoroquinolonas modernas exhiben un perfil toxicológico favorable, similar al de los antibióticos betalactámicos y macrólidos. Sin embargo, se observan notables variaciones entre sus integrantes, en parte consecuencia de las modificaciones realizadas en la estructura molecular durante el proceso de desarrollo y también acorde la disposición que logran algunos agentes en determinados tejidos, por ejemplo, en el sistema nervioso.

Los efectos adversos más frecuentes comprenden reacciones dermatológicas, particularmente fototoxicidad; disturbios digestivos, como náuseas, vómitos o diarreas y alteraciones nerviosas.

La neurotoxicidad se relaciona con la activación del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), reversible cuando se discontinúa la administración.

Es controvertido el uso de fluoroquinolonas en individuos jóvenes, debido que causan lesiones en el tejido conectivo afectando el cartílago articular en animales en crecimiento. El motivo del daño es ignorado, aunque se comprobó inhibición del ADN, de

colágeno, de la síntesis de proteoglicano y la formación de moléculas reactivas de O₂.

Estos agentes provocan inflamación e incluso ruptura de tendones. La injuria no depende de la edad de los pacientes y se verifica con todos los miembros del grupo, principalmente con ofloxacina y ciprofloxacina. Son factores de riesgo inherentes a esta patología las afecciones renales concomitantes y los tratamientos simultáneos con glucocorticoides y no necesariamente el daño se asocia con la duración del tratamiento.

Algunos integrantes del grupo fueron excluidos del mercado farmacéutico mundial debido que inducen la manifestación de serias patologías, por ejemplo, el empleo de temafloxacina provoca hemólisis, trombocitopenia y falla renal; trovafloxacina induce hepatotoxicidad; temafloxacina y grepafloxacina originan efectos cardiovasculares, asociados con prolongación del intervalo Q-T.

En animales domésticos, los efectos adversos son escasos cuando se aplican según las dosis y condiciones recomendadas.

El target de estos antimicrobianos, la enzima ADN topoisomerasa, se encuentra en todos los organismos vivos; pero las fluoroquinolonas interactúan sólo con la topoisomerasa II de las bacterias sin afectar a las células eucariotas, debido a que están formadas por sólo 2 subunidades en lugar de las 4 subunidades que poseen las células bacterianas. En consecuencia, la concentración que inhibe la enzima ADN girasa de los mamíferos se ubica en dos órdenes de magnitud respecto la requerida para inhibir la enzima bacteriana.

Farmacocinética

Las quinolonas presentan comportamientos cinéticos diferentes según su estructura química o la generación a la que pertenece cada integrante. En general, las sustancias de primera generación exhiben escasa absorción en el tracto gastrointestinal y sufren un rápido aclaramiento, principalmente renal, lo cual limita su uso al tratamiento de infecciones urinarias y entéricas.

El conjunto de las fluoroquinolonas experimenta moderada a elevada biosponibilidad oral en animales domésticos, excepto en los rumiantes, casi completa absorción parenteral y amplia distribución tisular.

El átomo de flúor en C6 y el anillo piperazínico en el C7, acentúan la penetración celular con respecto a las antiguas quinolonas y las cadenas alquiladas en posición "para" del anillo piperazínico incrementan la liposolubilidad.

La reducida unión a proteínas plasmáticas, que generalmente presentan estos compuestos, sumado a la escasa ionización a pH sanguíneo, redundan en elevados valores de volumen de distribución de las fluoroquinolonas con respecto a las quinolonas clásicas.

En términos generales, luego de la administración por vía oral y al considerar la variación individual entre los diferentes compuestos y especies, la absorción es elevada

en monogástricos y prerrumiantes, menor en monogástricos de transición (equinos) y escasa en rumiantes.

La presencia de alimentos en el tracto digestivo no ejerce un efecto significativo, puede retrasar la absorción, pero la cuantía de la misma representada por el área bajo la curva (ABC), no se ve afectada.

Los rumiantes presentan tasas de absorción digestiva con gran variabilidad. Se reporta un 61% en ovinos mientras la cifra desciende al 10% para enrofloxacina.

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

La absorción tras la aplicación intramuscular y subcutánea es prácticamente completa. Sin embargo, pueden presentarse demoras en la absorción en algunos casos, atribuible a la fijación a los tejidos o por la irritación producida que interfiere con la circulación local.

Distribución

Por su carácter lipofílico, tras la aplicación se obtienen volúmenes de distribución que exceden el L/kg. Las concentraciones son elevadas en el árbol respiratorio: secreciones nasal y bronquial, mucosa, epitelio, fluido de revestimiento y macrófagos alveolares, así como en el aparato urogenital, digestivo, hígado, músculo, piel y glándula mamaria. En todos estos territorios, por lo general, las concentraciones son superiores a las plasmáticas. También consiguen niveles terapéuticos en humor acuoso, tejido linfático, hueso, articulaciones y líquido cefalorraquídeo.

Metabolismo y eliminación

La eliminación de fluoroquinolonas se concreta por vía renal, metabolismo hepático o mixto (hepático-renal). La excreción renal, variable según el compuesto, ocurre por filtración glomerular y/o secreción tubular activa, lo que permite que se alcancen altas concentraciones urinarias. Para la mayor parte de las fluoroquinolonas, los compuestos madre y sus metabolitos se recuperan en orina y escasamente en heces. Una excepción es difloxacina, donde se recupera hasta un 80%.

La metabolización es hepática, la extensión depende del tipo de compuesto y especie animal. Algunos de los metabolitos originados son activos, sin embargo, no revisten mayor relevancia, excepto ciprofloxacina, metabolito de enrofloxacina.

La excreción biliar y transintestinal es variable según el compuesto, pero generalmente es reducido. Es posible también la circulación enterohepática por acción de β -glucuronidasas intestinales, liberando el compuesto primario o metabolitos activos.

Las quinolonas se eliminan principalmente por metabolismo hepático y excreción renal, ya sea por filtración glomerular o secreción tubular activa. Aunque la excreción de la mayoría de estos fármacos sucede principalmente por vía renal, también se debe considerar la eliminación por vía hepática y gastrointestinal, según el agente.

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

Los compuestos más polares, como la norfloxacina y ciprofloxacina, presentan valores más altos de aclaramiento renal (Cl), y menor semivida de eliminación. Los derivados N4 metilados, más lipofílicos, son los más susceptibles de ser reabsorbidos.

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

El grado de excreción biliar difiere según el compuesto, aunque generalmente es reducido. Algunas fluoroquinolonas pueden ser eliminadas vía transintestinal. La acción de las β -glucuronidasas en el tracto intestinal, puede liberar el compuesto primario o metabolitos activos, los cuales por la recirculación enterohepática pueden reabsorberse.

La semivida de eliminación de las fluoroquinolonas depende de cada molécula y la especie considerada. En general, la $t_{1/2\beta}$ es prolongada permitiendo su dosificación cada 12 o 24 horas, según los casos. El aclaramiento plasmático no excede en ninguna de las especies el litro por Kg/hora, excepto en cerdos, ratas, ratones y conejos tras la administración de ciprofloxacina y moxifloxacina.

Cuantificación de fluoroquinolonas

Los procedimientos empleados para la colecta de muestras con el propósito de cuantificar fluoroquinolonas en tejidos o fluidos biológicos, son dispares. Los modelos utilizados comprenden:

a) El muestreo a partir de fluidos biológicos excretados (orina, saliva, leche o bilis).

b) Implante de elementos sólidos

c) La elaboración de espacios intersticiales artificiales; mediante el desarrollo de espacios extravasculares con sustancias irritantes, por ejemplo, cantaridina.

Las vesículas generadas contienen un líquido similar al líquido intersticial, rico en albúminas, del cual se materializa el muestreo,

d) Lavados broncoalveolares,

e) Microdiálisis, procedimiento que aporta información respecto a difusión de fármacos en fluidos extracelulares, aplicado en pacientes sometidos a cirugías torácicas y,

e) Homogeneizado de tejidos, a partir de muestras obtenidas mediante biopsias realizadas durante actos quirúrgicos o luego del sacrificio de los animales, procedimiento adoptado en pollos para establecer los niveles residuales versus tiempo en tejidos comestibles.

Este recurso fue utilizado para determinar niveles de enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacina, norfloxacina y flumequine.

El ensayo microbiológico se utiliza para cuantificar fluoroquinolonas en muestras biológicas, utilizando *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 y *Escherichia coli* como microorganismos test. Algunos autores demostraron que el método microbiológico posee cualidades similares que el HPLC para establecer niveles bajo los límites de tolerancia de enrofloxacin en músculo de pollos.

Sin embargo, en la determinación de fluoroquinolonas en matrices biológicas se emplea corrientemente la cromatografía líquida asociada a detección ultravioleta o de fluorescencia y eventualmente, espectrometría de masas.

La cromatografía líquida o High Performance Liquid Chromatography (HPLC) presenta sensibilidad analítica y además brinda la ventaja de que pueden determinarse separadamente las concentraciones del compuesto original inalterado y sus metabolitos, superando otros métodos, considerados poco específicos, como el microbiológico.

Cada integrante del grupo posee propiedades físico-químicas específicas, que definen exactamente 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.

El inconveniente que se advierte en el análisis de estas moléculas es la naturaleza de la matriz en la que se encuentran, básicamente músculo, hígado, riñón u otro tejido y en particular cuando se analizan compartimentos del huevo o por su elevado contenido en lípidos, en leche de cabra.

Estos tejidos por si mismos constituyen matrices complejas por cuanto contienen proteínas, grasas, enzimas y otras macromoléculas, que interactúan con la sustancia a determinar y dificultan la extracción del analito.

Además, pueden existir diferencias entre matrices en función de la especie, puesto que la composición del tejido puede variar en diferentes especies, influyendo en la extracción del fármaco y su aislamiento del resto de compuestos.

El tratamiento de la muestra problema, comprende acciones tendientes a remover macromoléculas u otras sustancias incorporadas en la matriz que puedan afectar adversamente la detección, procedimiento llamada clean up que contempla diferentes alternativas: homogeneización, digestión enzimática, purificación y/o enriquecimiento, filtración, centrifugación y derivatización.

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

Esto implica que un método de análisis que incorpore varias etapas de extracción, en general, exhibe baja recuperación y por tanto demande una detección mucho más sensible.

En cambio, cuando se reducen las etapas para extraer la molécula del tejido, la técnica de detección no necesita ser tan sensible, pero en cambio debe ser mucho más específica y selectiva.

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

Debido a su naturaleza polar de estas sustancias, algunos procedimientos utilizados para la extracción son complejos, otros requieren el empleo de gran cantidad de solventes orgánicos, tales como diclorometano, acetonitrilo, metanol o ácido tricloroacético, seguido de extracción líquida o en fase sólida y mediante la desnaturalización con ácido perclórico.

Indudablemente, el procedimiento de extracción representa el mayor desafío con las fluoroquinolonas por su naturaleza anfótera, resultado del grupo piperazinil y el ácido carboxílico, generan posibles residuos químicos que interactúan con componentes de la matriz dificultando la extracción; el efecto es pH dependiente, y puede diferir según la matriz. Debido que estas sustancias fluorescen por la incorporación del grupo piperazinil, la determinación mediante fluorómetro suele emplearse para su determinación. La fluorescencia depende del pH del medio; la mejor respuesta se logra entre rangos de pH de 2,5 a 4,5.

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

Habitualmente, la separación de compuestos es apropiada con HPLC empleando columna de sílica C18 o C8 y fase móvil que incorpore acetonitrilo o metanol.

El método de análisis utilizado, además de sensible -el factor más crítico, sobre todo cuando se emplea para detección de residuos- debe ser específico y preciso. La precisión se expresa en la desviación estándar relativa (CV, coeficiente de variación), valorada entre ensayos realizados el mismo día o en días diferentes. En músculo de pollo, se 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, ajustada 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 del principio activo y evitan interferencias de la fase móvil en el cromatograma.

Aplicación de fluoroquinolonas en medicina veterinaria

En animales domésticos, se emplean principalmente miembros de segunda generación destinadas sólo para su aplicación en veterinaria. El fármaco utilizado con más frecuencia es enrofloxacin, frente infecciones producidas por microorganismos gram-positivos, negativos y micoplasmas, debido que brinda alta biodisponibilidad y amplia distribución tisular, incluso la glándula mamaria. En el hígado, se metaboliza parcialmente a ciprofloxacina, que preserva la actividad antimicrobiana.

Marbofloxacina, sintetizada en el año 1986, presenta una serie de sustituciones en la estructura que le confieren ventajas sobre otras fluoroquinolonas, tales como una destacada potencia antibacteriana, mayor actividad sobre grampositivos, bacterias anaeróbicas y *Pseudomonas spp.*; mejor ingreso a la célula bacteriana, mayor liposolubilidad del fármaco y consecuente volumen de distribución; respecto otras quinolonas veterinarias (bicíclicas), la estructura tricíclica de marbofloxacina, incrementa la biodisponibilidad y le confiere mayor estabilidad metabólica, con un período más extenso de semivida de eliminación.

Danofloxacina, también es un agente de tercera generación desarrollada sólo para su aplicación en animales. En mamíferos los antecedentes cinéticos por aplicación parenteral indican pronta absorción, biodisponibilidad superior al 65%, moderada permanencia en el organismo y notable disposición tisular. En aves de corral se utiliza la sal mesilato, muy soluble en agua. En pollos de engorde se aplican 5 mg/kg por día por vía oral para tratar enfermedades causadas por *E. coli*, *Pasteurella multocida*, *H. somnus* y *Mycoplasma spp.* Frente a *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophylus sommus*, la CIM90 se estableció en 0,04 mg/mL.

Difloxacina es una de las últimas fluoroquinolonas aprobadas para su aplicación en medicina aviar en Europa. Existen formulaciones para la aplicación en agua de bebida en pollos parrilleros y pavos. En aves se recomienda para el uso de infecciones causadas por *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* y *Mycoplasma gallisepticum*.

Levofloxacina, isómero levógiro de ofloxacina, es una moderna fluoroquinolona de tercera generación introducida en el mercado norteamericano para uso exclusivo en Medicina Humana en el año 1997. Este fármaco está provisto de amplio espectro antibacteriano; comparada con sus congéneres exhibe mejor actividad frente a *Pseudomonas spp* y otras bacterias gramnegativas. Además, posee un excelente perfil cinético por aplicación oral y endovenoso, comprobado en algunas especies domésticas.

En las aves, habitualmente se administran en el agua de bebida, condición indispensable para medicar en estas producciones de alta densidad de animales y además

proveen acción sistémica, mientras para la aplicación parenteral en mamíferos, con la finalidad de favorecer predictores de eficacia, recientemente se incorporaron al mercado formulaciones más concentradas que brindan absorción lenta, mayores áreas bajo la curva (ABC) e incrementan la disposición tisular.

En el caso de enrofloxacin se elaboran preparados al 10% con una dosis indicativa de 7,5 mg/kg versus la formulación original del 5% con dosis de 2,5-5 mg/kg, mientras que danofloxacin se comercializa al 18% con una dosis de 6 mg/kg, respecto de su precursor al 2,5% que se utilizaba a dosis de 1,25-2,5 mg/kg.

Capítulo IV

Disposición de fluoroquinolonas en pollos parrilleros

Introducidas en el mercado veterinario como herramientas terapéuticas en la década del 80, las fluoroquinolonas son recursos antimicrobianos muy utilizados en el tratamiento y profilaxis de las enfermedades entéricas y respiratorias de las aves, en particular los integrantes de la segunda generación.

La aplicación de estos fármacos fue fomentada no sólo por las propiedades cinéticas del grupo, demostradas en humanos y en varias especies domésticas, sino surgen como alternativa frente a la manifestación creciente de resistencia bacteriana exhibida frente a las tetraciclinas.

El uso de fluoroquinolonas en aves es facilitado por sus propiedades físico-químicas. Son sustancias estables en soluciones acuosas, por lo tanto, admiten la aplicación en el agua de bebida, que constituye el modo habitual de administración en los criaderos comerciales.

Esta modalidad es poco estresante, permite el tratamiento de gran cantidad de aves en poco tiempo y ventajosa, debido que el animal enfermo suele no alimentarse, pero continúa consumiendo agua.

Se aconsejan frente a infecciones causadas por *Escherichia coli* -particularmente aerosaculitis- y por otros microorganismos gramnegativos. Esta bacteria, comensal del intestino delgado de las aves se revela como el agente infeccioso que origina el más importante deterioro económico.

Si bien este microorganismo se considera un patógeno secundario, el ingreso al animal tras la inhalación de material contaminado a partir de la materia fecal, provoca lesiones en las vías respiratorias bajas, sacos aéreos, hígado, corazón y en la cavidad intestinal.

Debido que *Escherichia coli* es un microorganismo gramnegativo y, contemplando que el antimicrobiano debe aplicarse en el agua de bebida y que el fármaco utilizado debe poseer actividad sistémica, las herramientas terapéuticas disponibles actualmente se reducen a los grupos tetraciclinas, sulfonamidas, fenicoles y fluoroquinolonas.

Las restricciones impuestas por motivos toxicológicos al conjunto de sulfonamidas, nitrofuranos y cloranfenicol, favorecieron el uso de fluoroquinolonas en avicultura.

Enrofloxacin, desarrollada sólo para uso en animales domésticos, es el miembro del grupo más aplicado y efectivo para controlar la colibacilosis. En menor proporción, en

aves se usan otros miembros del grupo como ciprofloxacina -principal metabolito activo de enrofloxacina- norfloxacina, danofloxacina, marbofloxacina, flumequine y difloxacina y su metabolito, sarafloxacina.

No obstante, similar a lo que ocurre en los mamíferos, el empleo de cada integrante difiere significativamente según la región, incluso en algunos países se aplican aquellos agentes destinados al humano, sin el aval de estudios cinéticos y de disposición tisular en aves, sino con datos extrapolados de otras especies.

Enrofloxacina y ciprofloxacina

Los antecedentes cinéticos de enrofloxacina y ciprofloxacina, tras la aplicación oral en pollos parrilleros indican rápida y amplia absorción develada por semividas de absorción que son ≤ 0.48 horas y una biodisponibilidad oral entre 64 a 89%, con amplia distribución desde el compartimiento central, reflejado en elevados volúmenes de distribución y eliminación moderada, con mayor permanencia ciprofloxacina ($t_{1/2\beta} \leq 11,8$ horas) que enrofloxacina ($t_{1/2\beta} \leq 5,8$ horas).

La disposición tisular de ambos principios activos es significativa desde el enfoque terapéutico, pero también se asocia con la magnitud de los residuos tisulares, que resultan de sus propiedades lipofílicas y es facilitada por la escasa unión a proteínas plasmáticas, estimada en aves en el 15 al 20%.

Las semividas de eliminación de los fármacos son variables a nivel de tejido muscular, la cual oscila entre 5,5 y 10,2 horas con enrofloxacina y para ciprofloxacina de 8,8 horas, lo cual mantiene la persistencia moderada de los fármacos.

En situaciones productivas reales se desarrolló una investigación en pollos parrilleros de 44 días, clínicamente sanos, con un peso promedio de $1,73 \pm 0,15$ kg de peso agrupados en lote A que recibió una dosis en bolo oral de 5 mg/kg cada 12 horas por 5 días de enrofloxacina mientras el lote B recibió la misma dosis pero de ciprofloxacina, con los objetivos de evaluar los niveles temporales de residuos de ambos principios activos en tejido muscular, y con estos valores establecer el periodo de retiro a la faena.

Para determinar y cuantificar los residuos de ambos analitos la metodología de extracción de muestras de músculo consistió en desproteinización con diclorometano y luego evaporación con nitrógeno a 50°C y determinación HPLC mediante detector de fluorescencia establecido a 295 nm de excitación y 500 nm de emisión.

En este ensayo, los límites de cuantificación fueron de 0,01 y 0,05 $\mu\text{g/g}$, mientras los porcentajes de recuperabilidad obtenidos fueron del 77,4 y 87,7%, para enrofloxacina y ciprofloxacina, respectivamente.

El período de carencia para enrofloxacina y ciprofloxacina, se estableció a partir del límite máximo de residuos (LMR) reportado por la FDA y por el Codex Alimentarius, de 300 $\mu\text{g/kg}$ para ambos analitos en músculo de pollos parrilleros, sumado a las concen-

traciones registradas a las 24, 48, 72, 96, 120 horas estableciendo un periodo de carencia de 5 días para ambos.

Tiempo (horas)	Enrofloxacin	Ciprofloxacina
24	0,073 ± 0,01	0,014 ± 0,00
48	0,063 ± 0,01	0,012 ± 0,00
72	0,002 ± 0,00	0,027 ± 0,01
96	0,0005 ± 0,00	0,017 ± 0,01
120	0,0004 ± 0,00	0,013 ± 0,00

Tabla 1: Concentraciones musculares ($\mu\text{g/g}$) de enrofloxacin y ciprofloxacina en pollos parrilleros, posterior a la aplicación oral de 5 mg/kg cada 12 horas durante 5 días.

Marbofloxacin

Las propiedades microbiológicas de marbofloxacin sobre patógenos aviares de importancia, tales como *Mycoplasma* motivaron diversos estudios farmacocinéticos debido este antimicrobiano constituye una herramienta posiblemente útil en especies tales como pavos, patos, patos silvestres, codornices faisanes y pollos parrilleros, aunque no se encuentra aprobada su uso para la producción avícola en Argentina, estos estudios con marbofloxacin entregan escasa información en cuanto a la determinación de residuos del fármaco en los diferentes tejidos.

La extracción del analito en estudio se realizó mediante una metodología simple, ya que para la desproteinización de la muestra se utilizaron diferentes ácidos (metanol, ácido perclórico, ácido fosfórico) y agua deionizada, directamente en la muestra, luego el conjunto se homogeniza mecánicamente, se deja reposo durante 12 horas, luego se centrifuga y se filtra. El sobrenadante es eluido por HPLC con detector de fluorescencia establecido en 295 nm de excitación y 490 nm de emisión.

En el ensayo de validación se establecieron límites de cuantificación para marbofloxacin dependiendo de la matriz a estudiar (plasma, músculo, piel, riñón, pulmón, e hígado) que en conjunto son $\leq 0,018 \mu\text{g/g}$, recuperabilidad $\leq 93,7\%$ para marbofloxacin en todos los tejidos, lo que significa que las metodologías de extracción y analítica son eficientes para la cuantificación en plasma y diferentes tejidos estudiados.

En una primera experiencia se determinó la influencia de factores ambientales sobre el comportamiento farmacocinético plasmático y disposición tisular de marbofloxacin, principalmente porque en la avicultura, la temperatura ambiente debe permanecer en un rango estrecho, estimado entre 18 a 24°C, fuera de este rango se observan cambios fisiológicos que se generan principalmente por la pérdida de rusticidad y de adaptabilidad de las líneas genéticas de pollos parrilleros, debido a que gran parte del metabolismo del ave se centraliza en la productividad, es decir en la ganancia de peso en el menor tiempo posible.

Los cambios fisiológicos relacionados a las condiciones ambientales, tales como la temperatura ambiental pueden modificar la cinética de eliminación de los antimicrobianos utilizados, e interferir con el periodo de carencia, herramienta esencial para garantizar un alimento inocuo para el ser humano.

Se realizó un estudio farmacocinético poblacional de marbofloxacina en pollos parrilleros en situación productiva real en el sur de la provincia de Córdoba, enfocado principalmente en granjas familiares de media-baja tecnología, 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, tales como la temperatura ambiental (figura 1).



Figura 1: Granjas familiares avícolas de la Provincia de Córdoba.

En este estudio se evaluaron las diferencias farmacocinéticas de marbofloxacina en aves expuestas a temperaturas ambientales en distintas estaciones del año y se elaboró un modelo predictivo que ajuste el período de carencia, en relación a la cinética de eliminación del fármaco en el tejido muscular, considerando las respuestas fisiológicas que las aves presentan en situaciones de altas y/o bajas temperaturas ambientales.

Como sujetos experimentales se utilizaron pollos parrilleros clínicamente sanos, de 30 días de edad, con un peso promedio de $1,06 \pm 0,27$ kg, expuestos a diferentes temperaturas ambientales, en primavera de $18,6 \pm 2,5$ °C, en verano de $26,6 \pm 2,3$ °C e invierno de $12 \pm 2,9$ °C. La primavera se asumió como estación control para evaluar la disposición y comportamiento farmacocinético de marbofloxacina en plasma y músculo de pollos parrilleros debido que la temperatura se encuentra dentro del rango ideal de la producción de pollos parrilleros, mientras que verano e invierno son las épocas de estudio.

A las aves, posterior de su acondicionamiento a las condiciones ambientales, en cada estación del año, se aplicó una dosis única de 2 mg/kg de marbofloxacina por vía endovenosa y oral, posteriormente se establecieron por HPLC las concentraciones versus tiempo en plasma (figuras 2 y 3) y en músculo (figuras 4 y 5).

Luego de la administración intravenosa no se registraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de marbofloxacin en las distintas épocas del año y se observó un rápido descenso del fármaco en plasma semejante en las tres estaciones, comportamiento similar al observado con otras fluoroquinolonas aplicadas por esta vía.

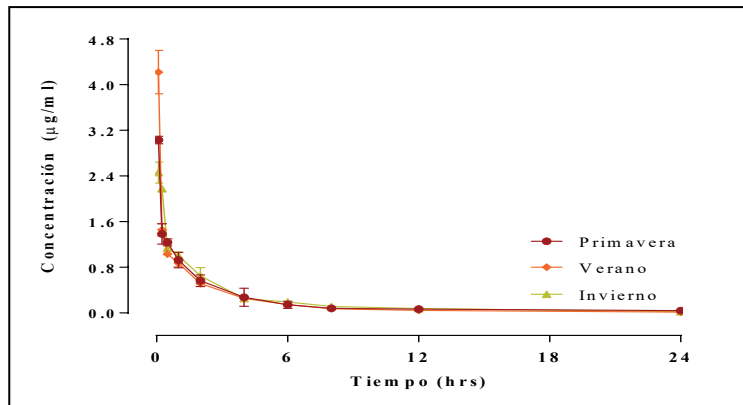


Figura 2: Concentración plasmáticas de marbofloxacin (\pm DE) en pollos parrilleros, aplicación endovenosa en diferentes estaciones del año.

Las concentraciones plasmáticas por aplicación oral en época estival e invernal son significativamente menores ($p < 0,05$) que las de primavera; aunque se probó una reducción en las concentraciones presentes del 44 y 46 % en verano e invierno, respectivamente, ésta última registrada hasta 72 horas post-aplicación (figura 3).

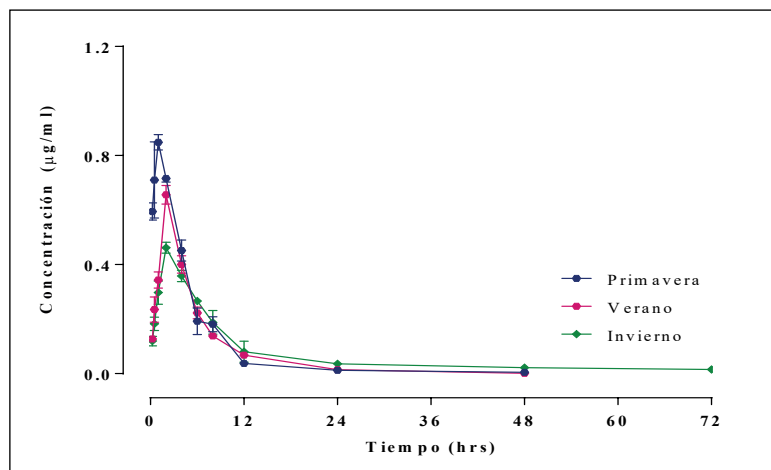


Figura 3: Concentraciones plasmáticas de marbofloxacin (\pm DE) en pollos aplicación por vía oral en diferentes estaciones del año.

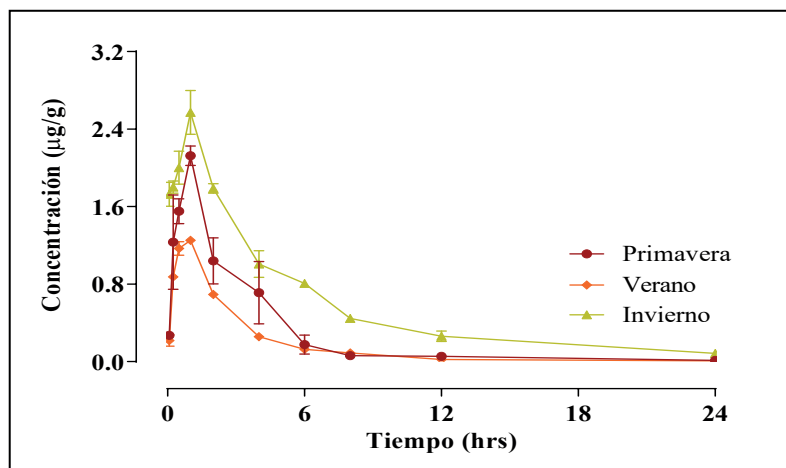


Figura 4: Concentraciones musculares de marbofloxacin (\pm DE) en pollos por aplicación vía endovenosa, en diferentes estaciones del año.

En el tejido muscular (Figura 4 y 5), se comprobó un perfil de disposición similar al plasmático, según la temperatura ambiental que estuvieron expuestas las aves. En invierno los niveles fueron significativamente mayores que la estación control, tanto por vía endovenosa (+67%) u oral (+37%).

En verano, las concentraciones de marbofloxacin se reducen por aplicación endovenosa (-35%) y oral (-27%), en relación a los valores de primavera, esto demuestra una acumulación del fármaco en invierno, que puede deberse a los cambios de flujos sanguíneos que se observan en las aves expuestas a temperaturas frías.

Los parámetros cinéticos robustos provistos aplicación intravenosa única en plasma y músculo en diferentes estaciones se reseñan en las tablas 1, 2, 3 y 4.

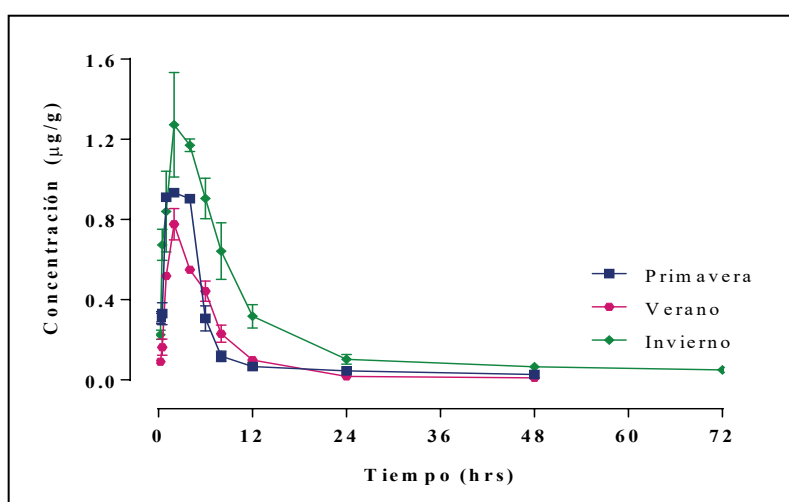


Figura 5: Concentraciones musculares de marbofloxacin (\pm DE) en pollos parrilleros posterior a una dosis por vía oral en diferentes estaciones del año.

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
Cl _t (ml/min/kg)	6,6	7,6	6,3

Tabla 1. Parámetros cinéticos plasmáticos de marbofloxacina en pollos luego de la administración endovenosa de 2 mg/kg, en las diferentes estaciones del año.

Los parámetros cinéticos plasmáticos de marbofloxacina aplicada por vía endovenosa tabla 1, reportan una amplia y rápida distribución reflejada en el $t_{1/2\alpha} \leq 0,7$ y elevados volúmenes de distribución en las 3 experiencias realizadas y eliminación moderada que se modifica en las aves expuestas a temperatura estival, con un aumento de la tasa de purgativa del fármaco (Cl) en un 13,1% que se relaciona con el incremento del consumo del agua de las aves en esta época 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
$t_{1/2 \text{ abs}}$ (h)	0,2	0,8	0,7
$t_{1/2\beta}$ (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

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos de marbofloxacina por vía oral, en pollos parrilleros en las diferentes épocas del año.

Por vía oral (tabla 2), en primavera, marbofloxacina indicó una biodisponibilidad oral de 94%, se caracterizó por una rápida absorción con una acotada semivida de absorción de 0,2 horas y moderada eliminación, reflejada en la semivida de eliminación de 6,5 horas.

Los cambios en la absorción se refieren a un enlentecimiento en la funcionalidad digestiva de las aves expuestas a temperaturas bajas, mientras que, en situaciones de calor, que es uno de los factores ambientales más estudiados en la avicultura por su injerencia en el cuadro patológico denominado “estrés térmico”, se observaron daños epiteliales importantes a nivel del intestino delgado que limitan la capacidad de absorción.

Parámetro	Primavera	Verano	Invierno
C _{máx} (µg/g)	2,1	1,3	2,6
T _{máx} (h)	1,0	1,0	1,0
t _½ ing (h)	0,2	0,2	0,5
t _½ β (h)	6,8	5,1	7,0
ABC (µg-h/ml)	6,6	4,0	14,4
ABC musc/ plasma	1,3	0,9	2,7

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacina en músculo por vía intravenosa, en pollos parrilleros en las diferentes épocas del año.

En la eliminación se comprobaron diferencias, en verano se observó una rapidez de eliminación con un t_½β de 4,9 horas, respecto al invierno en el cual se observa un enlentecimiento de la eliminación con un t_½ β de 7,2 horas y un TMR de 9,4 horas. La aplicación intravenosa determinó las mayores diferencias en el tejido muscular se observan en aves expuestas a situaciones de calor una reducción del C_{máx} del 38%, que coincide con la disminución del ABC en un 40% y el cociente de la relación entre ABCmúsculo/ABCplasma que también decreció un 31%, respecto a primavera.

Parámetro	Primavera	Verano	Invierno
C _{máx} (µg/g)	0,9	0,8	1,3
T _{máx} (h)	2,0	2,0	2,0
t _½ ing (h)	0,5	0,6	1,3
t _½ 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
ABC musc/plasma	1,5	1,4	3,19
C _{máx} musc/plasma	1,2	1,1	2,6

Tabla 4: Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacina en músculo por vía oral, en pollos parrilleros en las diferentes épocas del año.

Mientras que, en las aves expuestas a temperaturas invernales, se comprobó un aumento del C_{máx} en un 19,2%, que coincide con la acumulación del fármaco en el tejido, registrado por el ABC un 118% mayor al reportado en primavera, esto se debe al enlentecimiento de la circulación sanguínea en situaciones de frío.

En invierno, tras la administración por vía oral, marbofloxacina exhibió un ingreso lento al tejido muscular, con una C_{máx} (+31%) superior al registrado en primavera y acorde al elevado ABC un 79% mayor y el enlentecimiento en la salida del fármaco (t_½β de 11,5 horas). En verano, se observó una disminución del ABC en un 21% respecto a primavera, que coincide con la disminución de la semivida de eliminación y TMR de 5,4 y 7,3 horas, respectivamente.

Los hallazgos reportados en el comportamiento cinético y disposición de marbofloxacina en pollos parrilleros, demostraron diferencias significativas tanto en las concentraciones según la época del año, menores en verano y mayores en invierno respecto a la época con temperatura de termo-neutralidad (primavera), lo cual repercute en la depleción del fármaco.

La cinética de eliminación de marbofloxacina en aves, aplicada en distintas épocas del año ofrece variaciones significativas; las semividas de eliminación se acortan en verano y se extienden en invierno, lo que requiere ajustar el periodo de carencia del fármaco.

Los resultados obtenidos confirman que los cambios fisiológicos que las aves pueden presentar en ambientes fríos, tales como el aumento en la viscosidad sanguínea y la reducción del flujo sanguíneo, mientras que en situaciones de calor los cambios fisiológicos son completamente inversos, tales como un aumento del flujo sanguíneo para disipar la acumulación de calor, influyen considerablemente en la disposición de los fármacos en el organismo. Asimismo, las variaciones cinéticas según la época del año alteran los periodos de carencia, determinados en 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.

En una segunda etapa se medicaron con una dosis única oral de 2 mg/kg pollos parrilleros de 30 días de vida ($1,09 \pm 0,13$ peso vivo), de ambos sexos, en condiciones productivas reales y ambientales ideales, con temperatura, humedad y ventilación reguladas. Luego se determinaron por HPLC los niveles en diferentes tiempos y tejidos comestibles (músculo, piel, pulmón, riñón e hígado) (tabla 5), con la finalidad de evaluar su depleción tisular, establecer cual presenta el mayor acúmulo de marbofloxacina, y estimar el periodo de carencia en cada tejido en estudio.

Las concentraciones más elevadas, se registraron en riñón y pulmón, mientras que en músculo y piel fueron inferiores. Sin embargo, en todos los tejidos estudiados la depleción de marbofloxacina fue similar, coincidente con lo observado con otras fluoroquinolonas utilizadas en pollos parrilleros. La evolución de las concentraciones de marbofloxacina versus tiempo se observa en la figura 6.

Para estimar el periodo de resguardo se contempló un LMR de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para marbofloxacina para diferentes tejidos considerado seguro debido que no fue establecido en pollos, se estimó un periodo de carencia de 3 días para músculo y piel, de 4 días para pulmón e hígado y de 5 días para riñón. La administración oral de 2 mg/kg de marbofloxacina en pollos requiere un periodo de carencia de 5 días, compatible con los ciclos de vida de las aves productivas.

Horas	Hígado	Pulmón	Riñón	Piel	Músculo
1	$1,88 \pm 0,43$	$2,70 \pm 1,01$	$3,17 \pm 0,39$	$0,84 \pm 0,20$	$0,71 \pm 0,22$
6	$0,49 \pm 0,16$	$0,88 \pm 0,39$	$1,22 \pm 0,72$	$0,34 \pm 0,17$	$0,37 \pm 0,10$

12	0,10 ± 0,02	0,22 ± 0,09	0,24 ± 0,17	0,16 ± 0,04	0,08 ± 0,02
24	0,07 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,02
48	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,01
72	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,05	n/d	n/d
96	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	n/d	n/d

Tabla 5: Concentraciones tisulares (\pm DE) de marbofloxacina en pollos parrilleros con una dosis única oral de 2 mg/kg. (μ g/gr) n/d: no detectado.

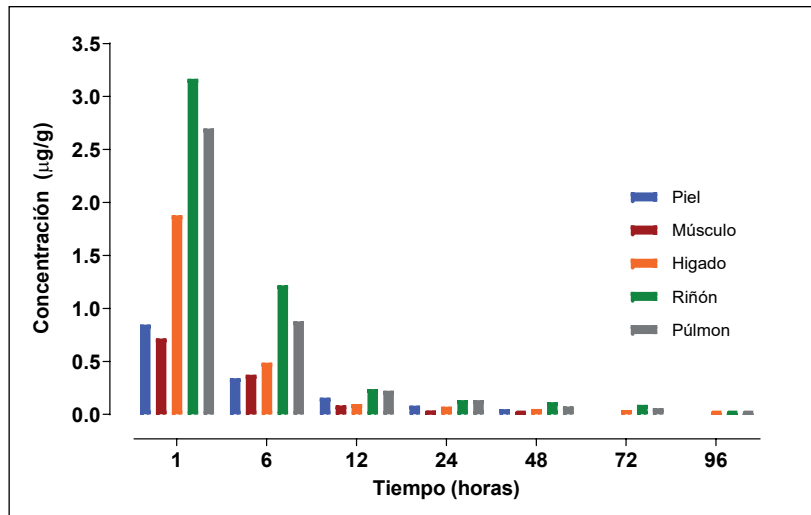


Figura 6: Evolución temporal de las concentraciones de marbofloxacina en hígado, pulmón, riñón, piel y músculo de pollos parrilleros.

Danofloxacina

Los antecedentes cinéticos en pollos en estudios desarrollados con danofloxacina refieren biodisponibilidad oral casi completa ($f = 99\%$), leve unión a proteínas plasmáticas que se ubica entre 20-30% y notable distribución al tejido pulmonar, donde logra niveles terapéuticos a las 2 horas post aplicación y que persisten por un periodo de 12 a 24 horas, que justifica el empleo en enfermedades bacterianas respiratorias en pollos parrilleros.

Con el propósito de conocer el perfil plasmático, estimar parámetros farmacocinéticos robustos, establecer la disposición tisular y el periodo de carencia se realizó un estudio cinético poblacional. Como sujetos experimentales se utilizaron ejemplares adultos ($N = 45$), peso promedio de $3,07 \pm 0,15$ kg, seleccionados al azar de un plantel de 1200 aves alojadas en condiciones ambientales productivas reales y óptimas, control de temperatura, ventilación y 18 horas luz.

Los animales se conformaron en 15 lotes de 3 individuos y recibieron una dosis única de 5 mg/kg de danofloxacina por vía oral tras ayuno de 12 horas previa y 3 horas post administración. Posteriormente, cada lote se sacrificó en uno de los tiempos preestable-

cidos, obteniéndose muestras de sangre por exanguinación y músculo e hígado hasta 120 horas post aplicación, que se conservaron a -20°C hasta su análisis.

Previo al estudio residual y farmacocinético de danofloxacin, se validó el método analítico y de extracción del analito, para la detección y cuantificación de danofloxacin en las diferentes matrices estudiadas, a través de HPLC con detector de fluorescencia.

El ensayo preparativo de las muestras consistió en la extracción líquido-líquido del analito con metanol, homogenización mecánica de los tejidos, procesos de centrifugado y filtrado con filtros de nylon de 0,22 μm , separación y cuantificación por HPLC y lectura con fluorómetro fijado a 295 nm de excitación y 490 nm de emisión. Los ensayos de validación revelan límites de detección y cuantificación para danofloxacin en todas las matrices estudiadas $\leq 0,078 \mu\text{g/ml}$ o g, además de porcentajes de recuperabilidad $\leq 80,5\%$ y aceptables coeficientes de variación $\leq 2,77\%$, que confirman la precisión y eficacia de la metodología analítica propuesta

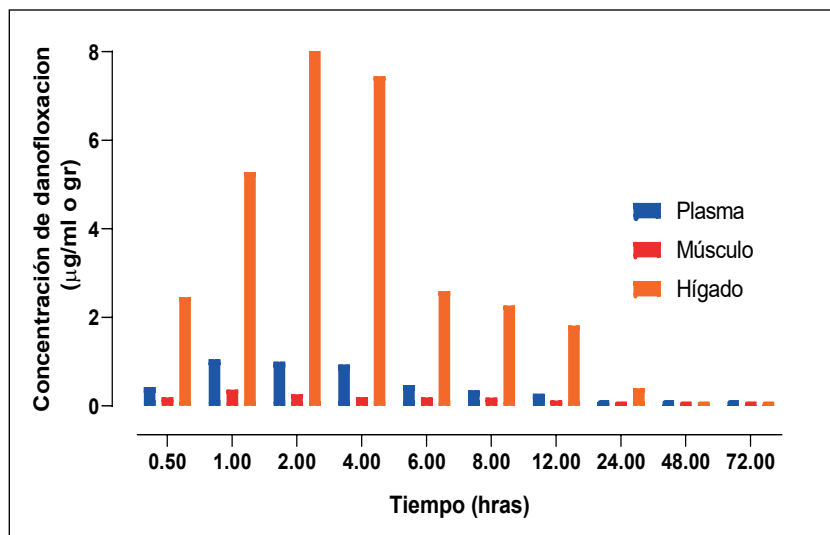


Figura 1: Concentraciones plasmáticas y tisulares de danofloxacin de pollos parrilleros posterior a una dosis única oral de 5 mg/kg.

En plasma y cada tejido los promedios de concentración de danofloxacin por tiempo se analizaron con el programa farmacocinético no compartimental PK Solution.

Los resultados conseguidos señalan que por vía oral este antimicrobiano experimenta pronta absorción, alcanza un $C_{\text{máx}}$ plasmático de 1,1 mg/ml a la hora post aplicación, exhibe moderada permanencia en el organismo, alta difusión tisular y brinda niveles tisulares hasta 72 horas post aplicación (figura 1). Las mayores concentraciones de danofloxacin se registran en hígado a las dos horas post-aplicación, mientras que las concentraciones plasmáticas exceden a las musculares, comportamiento sólo observado con danofloxacin respecto a otras fluoroquinolonas en pollos parrilleros debido que generalmente los niveles plasmáticos tienden a ser inferiores que los tisulares

Similar a lo que acontece con otras fluoroquinolonas, a las 48 horas post aplicación las concentraciones de danofloxacin se equiparan entre plasma, músculo e hígado, aun cuando los niveles registrados en este último tejido fueron 8 veces más significativos que los plasmáticos, revelando la acumulación hepática.

Parámetro	Plasma	Músculo	Hígado
C _{máx} (µg/ml o g)	1,1	0,4	8,8
T _{máx} (h)	1	1	3
t _{1/2} abs(h)	0,5	-	-
V _d (L/kg)	5,5	-	-
t _{1/2} β(h)	0,48	-	-
ABC (µg-h/ml)	10	4,9	66,1
TMR (h)	7,6	12,7	6,1

Tabla 1: Parámetros cinéticos de danofloxacin en plasma y tejidos de pollos parrilleros post-aplicación oral 5 mg/kg.

La comparación de las ABCárea arroja cocientes tejido/plasma de 0,48 y 6,61 en músculo e hígado, respectivamente. Con la dosis utilizada los predictores de eficacia ABC/CIM y C_{máx}/CMI conseguidos plasma y el tejido muscular son insuficientes para respaldar la eficacia terapéutica. En cambio, en el tejido hepático estos predictores permiten acreditar eficacia clínica-bacteriológica y prevenir la manifestación de mutantes resistentes. El periodo de retiro se estimó con el programa WT 1.4 según el LMR establecido en músculo e hígado de pollo de 200 y 400 µg/kg, respectivamente. El análisis de las concentraciones residuales versus tiempo permite estimar un período de resguardo a la faena de 1,4 y 3,34 días, para músculo e hígado, respectivamente, compatibles con la brevedad de los ciclos de producción de pollos parrilleros.

Levofloxacin

Las formulaciones comerciales de levofloxacin disponibles para aves se agregan en el agua de bebida, indicadas para el tratamiento de micoplasmosis, coriza infecciosa y colibacilosis.

En pollos parrilleros, los antecedentes disponibles indican que utilizando un diseño cruzado de tratamiento, la aplicación intravenosa de 10 mg/kg se continuó por pronta y significativa distribución a tejidos, según lo registrado por los parámetros farmacocinéticos, con una t_{1/2}α de 0,29 horas, V_d de 3,2 L/kg, con un ABCárea de 11,3 mg-h/ml y moderada permanencia en el organismo, según t_{1/2}β de 3,2 horas, el TMR de 3,6 horas y un Clt de 14,7 ml/min/kg.

En otro estudio que se describió la farmacocinética de levofloxacin en pollos parrilleros, en aves sometidas a ayuno previo durante 24 horas, la administración oral de idéntica dosis a pollos parrilleros mediante comprimidos disueltos en agua destilada,

determinó rápida absorción, según indicó el $t_{1/2abs}$ de 0,95 horas, un $T_{máx}$ de 2 horas y biodisponibilidad del 59,4%.

Previo al estudio farmacocinético realizado con pollos parrilleros se desarrolló la validación de la metodología analítica para la detección y cuantificación de levofloxacin en diferentes matrices (plasma, piel, músculo, hígado, riñón y pulmón) de pollos parrilleros. Se realizó por HPLC con detector de fluorescencia establecido a 295 nm de excitación y 490 nm de emisión. Para el tratamiento de muestras se utilizaron varios reactivos tales como metanol, ácido perclórico, ácido fosfórico y agua deionizada, las muestras de tejido fueron homogenizadas mecánicamente, y posteriormente con reposo de 12 horas post-tratamiento a 4°C, se centrifugaron y filtraron para su posterior análisis.

Los límites de detección y cuantificación reportados son $\leq 0,4 \mu\text{g/ml}$ o g y $\leq 0,11 \mu\text{g/ml}$ o g , respectivamente, para levofloxacin en las diferentes matrices estudiadas. La recuperabilidad para el analito en las diversas matrices fue $\leq 97,5\%$, mientras que los porcentajes de coeficientes de variación $\leq 1,7\%$, establecen que la metodología analítica y el tratamiento de muestras propuesto son simples, eficientes y confiables.

El estudio realizado en la provincia de Córdoba en pollos parrilleros de aproximadamente 50 días de edad y peso promedio de $2,54 \pm 0,57 \text{ kg}$, en condiciones productivas reales. Las aves se dividieron en lote A que recibieron una dosis única intravenosa de 5 mg/kg de levofloxacin y un lote B en el cual las aves se expusieron a 24 horas de ayuno previo y recibieron idéntica dosis oral. Las concentraciones plasmáticas vs tiempo del lote A como en el lote B se observan en la figura 1, mientras que las concentraciones tisulares en el lote B se describen en la figura 2.

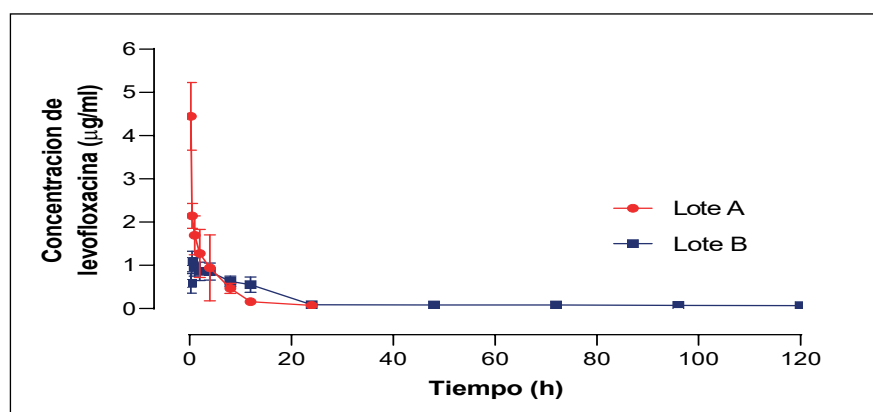


Figura 1: Concentraciones plasmáticas de levofloxacin (\pm DE) posterior a una dosis única de 5 mg/kg por vía endovenosa (lote A) y oral (Lote B).

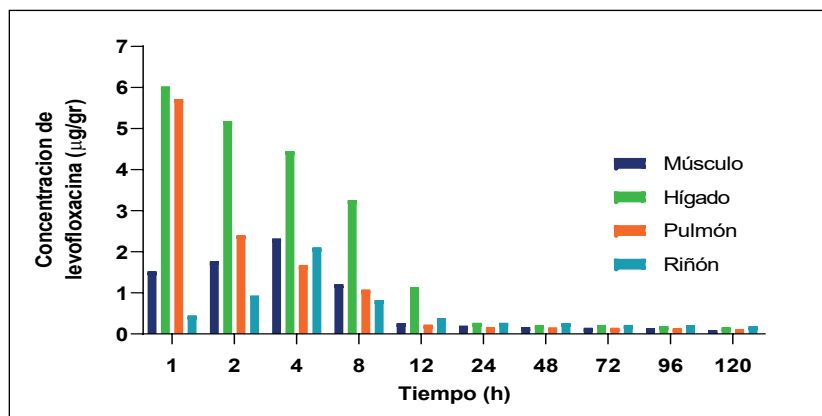


Figura 2: Concentraciones tisulares de levofloxacin en tejidos de pollos parrilleros, posterior a una dosis única oral de 5 mg/kg

Las concentraciones plasmáticas de levofloxacin en las aves luego de la administración por las vías endovenosa y oral, se establecieron hasta las 24 y 120 horas siguientes, respectivamente. La caída de la curva de disposición plasmática del fármaco por ambas vías, es similar a la registrada por otras fluoroquinolonas, observándose una caída exponencial.

Parámetro	Plasma EV	Plasma oral
C _{máx} (µg/ml)	-	1,1
T _{máx} (h)	-	0,5
t _{1/2β} (h)	5,27	5,7
t _{1/2α} (h)	0,31	2,06
ABCárea (µg-h/ml)	12,4	13,2
F (%)	-	106,4
Vd área L/kg	3,06	3,31
TMR (h)	5,9	9,1
Cl (ml/min/kg)	6,7	6,7

Tabla 1: Parámetros cinéticos plasmáticos de levofloxacin en pollos

Las mayores concentraciones se determinaron en hígado y pulmón, las cuales superan hasta 5 veces las determinadas en plasma, la caída de las concentraciones de levofloxacin difiere según el tejido estudiado, tiende a ser más lenta en hígado, mientras que en pulmón es más rápida (figura 2). Las concentraciones más bajas se determinaron en riñón, mientras que en músculo tiende a ser levemente mayores.

Los parámetros cinéticos robustos en plasma y tejidos de levofloxacin tras una aplicación endovenosa y oral se describen en las tablas 1 y 2, en los cuales se observa un comportamiento cinético similar a otras fluoroquinolonas.

Por vía endovenosa, levofloxacin registra una rápida y amplia distribución, según

refieren el $t_{1/2\alpha}$ de 0,31 horas, un V_d área 3,06 L/kg, con una eliminación moderada determinada por un $t_{1/2\beta}$ y TMR de 5,2 y 5,9 horas, respectivamente.

Levofloxacin provee una $C_{m\acute{a}x}$ de 1,1 $\mu\text{g/ml}$, determinada a los 30 minutos posterior a la aplicaci3n, con ABC\rea de 13,2 $\mu\text{g-h/ml}$, una alta biodisponibilidad oral de 106,4%, con una amplia y r\apida distribuci3n destacada por el $t_{1/2\alpha}$ de 2,06 horas y V_d de 3,3 L/kg, y una moderada eliminaci3n con un $t_{1/2\beta}$ 5,7 horas y un TMR mayor al observado por v\ia endovenosa de 9,1 horas.

La amplia distribuci3n observada con levofloxacin coincide con las concentraciones registradas en los diferentes tejidos y los par\ametros cin\eticos tisulares (tabla 2), se observ3 un r\apido ingreso del f\armaco en los diferentes tejidos, con un $t_{1/2ing}$ de 0,47, 0,66 y 1,52, para h\gado, m\usculo y ri\on, respectivamente y eliminaci3n moderada en cada tejido con un $t_{1/2\beta} \leq 7,3$ horas. Determinando un periodo de carencia de 8 d\ias para levofloxacin en pollos parrilleros, bajo la dosificaci3n utilizada (5 mg/kg dosis \nica oral).

Par\ametro	M\usculo	Ri\on	H\gado	Pulm3n
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/g}$)	2,3	2,1	6,0	5,7
T_{max} (h)	2,4	4,0	1	1
$t_{1/2\beta}$ (h)	5,9	7,3	4,9	4,6
$t_{1/2ing}$ (h)	0,66	1,52	0,47	-
ABC\rea ($\mu\text{g-h/ml}$)	21,4	19,0	54,8	23,5
TMR (h)	8,6	11,9	7,0	6,2

Tabla 2: Par\ametros cin\eticos tisulares obtenidos con 5 mg/kg de levofloxacin por v\ia oral en pollos.

Difloxacin

Para garantizar la seguridad alimentaria humana la Uni3n Europea (UE) ha establecido LMR en pollos para difloxacin en 300 $\mu\text{g/kg}$ en m\usculo, 400 $\mu\text{g/kg}$ en piel + grasa, 600 $\mu\text{g/kg}$ en ri\on y 1900 $\mu\text{g/kg}$ en h\gado.

La detecci3n y cuantificaci3n de difloxacin en plasma y diferentes tejidos comestibles, se realiz3 por medio HPLC con detector de fluorescencia, con un m\etodo de extracci3n que posee varios reactivos entre ellos, metanol, \cido tricloroac\etico, \cidos percl3rico y fosf3rico y en mayor proporci3n agua deionizada, las muestras de tejido se homogenizaron mec\anicamente, al igual que otros procesos de extracci3n se mantienen 12 horas con los reactivos a 4°C.

La validaci3n de la t\ecnica anal\itica determin3 l\imites de detecci3n y cuantificaci3n de difloxacin en las diferentes matrices estudiadas de $\leq 0,006$ y 0,019 $\mu\text{g/ml}$ o $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. El ensayo de precisi3n del m\etodo produjo coeficientes de variaci3n $\leq 2,8\%$, mientras que la recuperabilidad fue entre 92,7% a 98,2%. La metodolog\ia anal\itica implementada fue confiable, sensible y eficiente, para utilizarla en estudios farmacocin\eticos o de determinaci3n de residuos en pollos parrilleros.

Con el propósito de establecer concentraciones plasmáticas y tisulares (músculo, piel, hígado, riñón y pulmón) de difloxacin en pollos parrilleros (Figura 1), se desarrolló un estudio poblacional en aves de ambos sexos, clínicamente sanos y con peso promedio de $1,96 \pm 0,23$ kg tras la administración de dosis única oral de 10 mg/kg, con el propósito de establecer parámetros cinéticos plasmáticos y tisulares (tabla 1) y estimar el periodo de carencia teniendo en cuenta los LMR establecidos.

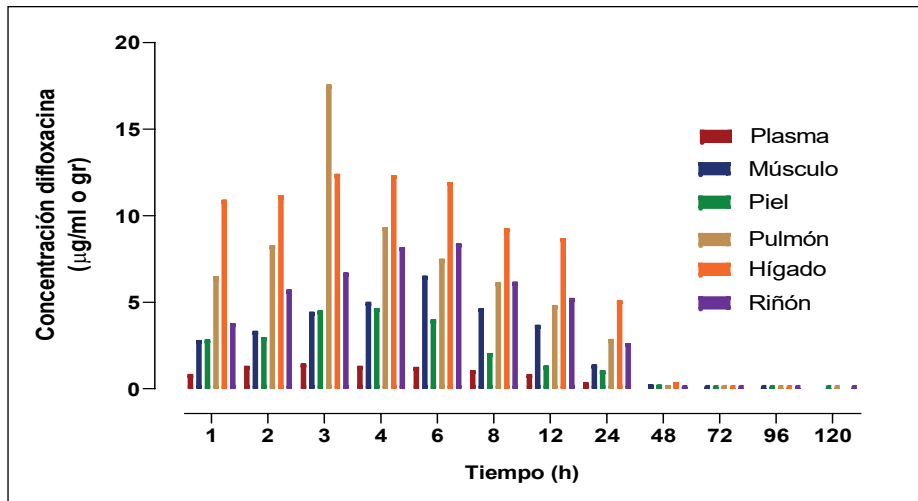


Figura 1: Concentraciones plasmáticas y tisulares de difloxacin ($\mu\text{g/ml}$ o g) posterior a una dosis única oral.

Parámetro	Plasma	Músculo	Piel	Hígado	Riñón	Pulmón
C _{máx} ($\mu\text{g/ml}$ o g)	1,5	6,5	4,7	13	8,4	17,6
T _{máx} (h)	3	6	4	3	4	3
t _{1/2} abs (ing) (h)	1,1	1,5	1,7	0,7	0,7	0,8
t _{1/2} β (h)	10,1	9,0	15,6	15,9	11,5	14,9
ABCárea ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	25,7	101,4	82,1	322,8	166,3	199,2
TMR (h)	15,3	14,5	23,5	23,6	18,1	20,4
C _{máx} tejido/plasma	-	4,3	3,1	8,6	5,6	11,7
ABC tejido/plasma	-	3,9	3,1	12,5	6,4	7,7

Tabla 1: Parámetros cinéticos robustos en plasma y tejidos de difloxacin en pollos parrilleros, posterior a una dosis única de 10 mg/kg.

Difloxacin registra mayor permanencia en pulmón, hígado, piel y riñón, registrando concentraciones hasta las 120 horas, mientras que músculo y plasma sólo hasta las 96 y 48 horas. Las concentraciones hepáticas presentan mayor permanencia, mientras que los niveles en pulmón tienden a descender más rápido, ya que a las 48 horas las concentraciones de todos los tejidos son similares. Músculo y piel son los tejidos que registran menor concentración, mientras que las concentraciones en plasma están por

debajo a todas las observadas en los tejidos, esto demuestra que el fármaco tiene una alta afinidad y distribución tisular.

Luego de la aplicación oral, difloxacina demuestra una absorción más lenta a la observada en otras fluoroquinolonas, lo cual se registra en la $C_{\text{máx}}$ plasmático de 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ determinados a las 3 horas post aplicación y la semivida de absorción 1,1 horas, al igual que la eliminación es moderada, con un $t_{1/2\beta}$ y TMR de 10,1 y 15,3 horas.

En los diferentes tejidos, difloxacina se acumula y distribuye de forma distinta dependiendo el tejido, pero todos están por sobre las concentraciones observadas en plasma, esto se registra con ABC tejido/plasma para los diferentes tejidos $\leq 12,5$, con mayor acumulación en hígado y pulmón, mientras que los $t_{1/2\beta}$ son $\leq 15,6$, que refieren moderada eliminación de difloxacina desde tejidos.

El periodo de carencia se estableció en cada uno de los tejidos analizados, considerando el LMR de la UE en 3 y 5 días, el primero para músculo, piel e hígado y el segundo para pulmón y riñón, respectivamente, acorde a los ciclos productivos avícolas.

Capítulo V

Estudios de fluoroquinolonas en huevos de gallina

En el caso particular de huevos, cuando se usan antimicrobianos en gallinas en postura, la transferencia y acumulación de residuos de estos fármacos está estrechamente relacionada con su fisiología y los procesos de la formación del huevo, aunque también influyen las características físico-químicas de los fármacos utilizados, sobre todo cuando las sustancias administradas son muy liposolubles.

Los residuos de fármacos aparecen primero en la clara del huevo. En este compartimiento, los niveles suelen reflejar los niveles plasmáticos. Por lo tanto, en la clara se observan valores de fármacos constantes, mientras suceda lo mismo en el plasma; el tiempo necesario para alcanzar estos niveles de fármacos constantes en la clara es en general de 2 a 3 días.

Los residuos presentes en la yema, reflejan los niveles plasmáticos de fármacos durante los diez días de fase de crecimiento rápido del folículo. Por lo tanto, según el tiempo y el momento de la exposición, en relación al proceso de crecimiento de la yema, los niveles de residuos en esta pueden aumentar, permanecer constantes o decrecer.

Los residuos de fármacos en la yema, en general requieren una exposición previa de 8 a 10 días para alcanzar niveles constantes. A pesar de los días requeridos para establecer niveles constantes para ambos compartimientos del huevo, una sola exposición a un fármaco puede ser suficiente para detectar residuos de esta en la clara o en la yema, según sus características físico-químicas y de la sensibilidad del método analítico utilizado para detectarla.

La persistencia de los fármacos en clara y yema depende también de los niveles plasmáticos provistos. Aquellos que son pronto eliminados del organismo, desaparecen de la clara en 2-3 días después de que finaliza la exposición. En el caso de la yema, en general los fármacos demoran aproximadamente 10 días en desaparecer.

Sin embargo, si el nivel de exposición es muy alto y el límite de detección para los fármacos analizados es lo suficientemente bajo, sería posible detectar residuos en aquellos folículos que se encuentran en la fase intermedia de crecimiento.

Por otra parte, si la sensibilidad del método analítico utilizado no es la adecuada, los residuos presentes en el huevo podrían ser detectados sólo por un corto período de tiempo, o no serían detectados.

El proceso de disposición y acumulación de los fármacos en los compartimientos del huevo es complejo y se relaciona con diferentes factores:

a) Procesos fisiológicos relacionados con la formación del huevo: fue demostrado que el desarrollo pre-ovulatorio en la yema es un depósito importante de residuos de medicamentos veterinarios y otros contaminantes, mientras algunas investigaciones revelan que la transferencia se asocia con la formación del óvulo en el ovario y con los lugares respectivos de la síntesis de la yema (hígado) y la albúmina (oviducto).

El desarrollo pre-ovulatorio en la yema es un depósito importante de residuos de medicamentos pues sus componentes -en particular lipoproteínas-, se producen en el hígado y son transportados por la sangre hasta el ovario.

En una gallina en producción, estos lípidos se depositan en un patrón concéntrico dentro de los folículos que se encuentran en fase de crecimiento rápido y requieren aproximadamente 10 días para concluir su desarrollo. En cambio, las proteínas hidrosolubles de la clara son secretadas en el magnum, proceso que demanda entre uno y dos días.

Según estos aspectos, según el tiempo y el momento de la exposición al fármaco, en relación con el proceso de formación de la yema, los niveles residuales pueden aumentar, permanecer de modo constante o disminuir.

Los niveles en clara se manifiestan a las 24 horas post administración, en cambio en la yema aparecen a las 24-48 horas. Sin embargo, a pesar de los días requeridos para alcanzar niveles constantes en ambos compartimentos, una sola exposición a un fármaco puede ser suficiente para detectar residuos tanto en la clara como en yema, según las características de los fármacos y la sensibilidad del método analítico utilizado para la detección.

Debido a la fisiología de las gallinas, incluso los productos químicos con propiedades poco lipofílicos de vida media breve (30 minutos), se pueden acumular en las yemas durante días o semanas, con implicancias significativas para el consumo humano, ya que los huevos pueden contener altos niveles residuales durante un largo período de tiempo.

No obstante, si el nivel de exposición es demasiado elevado y el límite de detección es lo suficientemente bajo, podrían detectarse residuos de medicamentos en los folículos que están en una fase media de crecimiento. Por otro lado, si la sensibilidad del método analítico utilizado es inadecuada, los residuos presentes en el huevo se pueden detectar sólo por un corto período de tiempo, o podrían incluso no ser determinados.

b) Composición de la clara y yema: las propiedades físico-químicas, principalmente de la yema y el pH de los compartimentos, en relación a las propiedades físico-químicas del xenobiótico. Muchos residuos pueden depositarse en la yema o la clara, según las características físico químicas del fármaco, por ej., ciertas propiedades como la afinidad por proteínas plasmáticas, el carácter hidrofóbico o lipofílico y su influencia para atravesar membranas biológicas.

Los compuestos liposolubles persisten en la yema, durante su etapa de desarrollo, incluso después de suspender el tratamiento hasta que se eliminan todos los huevos

contaminados en el ovario, mientras los hidrosolubles se acumulan preferentemente en la clara de huevo. Sin embargo, la disposición de una sustancia no siempre se predice a partir de sus propiedades físico-químicas.

c) La depleción de fármacos en la clara y la yema de huevo depende también de los niveles plasmáticos del fármaco aplicado. Los residuos en clara de huevo suelen reflejar los niveles plasmáticos, y aparecen generalmente en tiempos paralelos o próximos a la aplicación de una terapéutica o tratamiento profiláctico. El tiempo necesario para alcanzar estos niveles promedia 2 a 3 días desde el inicio de exposición al fármaco.

Los residuos en la yema, por lo general, requieren de una exposición previa de 8-10 días para alcanzar niveles constantes. Estos se incorporan a los compartimentos dentro de los folículos en desarrollo. Al alcanzar el tamaño máximo, la yema emite el folículo y es recibida por la primera porción del oviducto, el infundíbulo.

En el trayecto del oviducto a la cloaca, la yema es recubierta por la clara y cáscara. Por lo tanto, los residuos en los huevos son un reflejo del nivel de contaminantes del plasma. Cuando los fármacos son eliminados pronto del organismo, los niveles decrecen de la clara de huevo en 2-3 días después de finalizada la exposición, mientras en la yema los fármacos generalmente toman aproximadamente 10 días en desaparecer.

La producción de un huevo, representada en la figura 1, incluyendo la yema, requiere varios días de modo que existen discrepancias entre las concentraciones plasmáticas y las contenidas en el huevo, de casi una semana. Por lo tanto, es prácticamente difícil administrar tratamientos antimicrobianos en las gallinas en postura, por los tiempos de espera que deben ser respetados.

El impacto potencial que puede tener el consumo de huevos que contienen restos de antibióticos ha llevado a la implementación de los tiempos de retiro para las sustancias que se eliminan por esta vía. Las fluoroquinolonas son antimicrobianos aprobados para uso en animales domésticos pero no se admiten en aves en postura porque generan residuos en huevos que comprometen la seguridad alimentaria aunque suelen aplicarse extrarrótulo con el propósito de salvar la vida de los animales en presencia de enfermedades infecciosas, situación que motivó estudios de disposición con dos integrantes del grupo - danofloxacina y marbofloxacina- con los objetivos de analizar niveles en los compartimentos comestibles del huevo y estimar un periodo de resguardo con ambas sustancias.

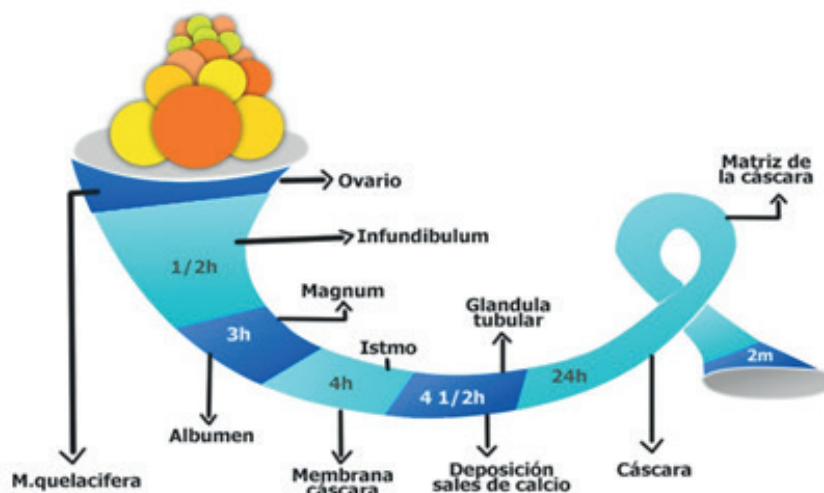


Figura 1: Etapas de formación del huevo

Danofloxacin

Previo a un estudio para la determinación de danofloxacin en compartimentos del huevo, se validó la metodología analítica y el tratamiento de muestra. La metodología propuesta para la determinación es por medio de HPLC con detector de fluorescencia establecido a 295 nm de excitación y 490 nm de emisión. Se registra el uso de varios reactivos tales como una solución homogeneizadora compuesta de agua deionizada: metanol: ácido perclórico: ácido fosfórico (500:500:10:1), se mantiene al igual que otros métodos de extracción descrito anteriormente para fluoroquinolonas en otros tejidos, el reposo de las muestras de 12 horas, para posteriormente centrifugar y filtrar e inyectar en el HPLC.

Los resultados de los ensayos de validación establecieron límites de detección para danofloxacin en clara y yema de 0,002 y 0,004 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, y límites de cuantificación $\leq 0,01 \mu\text{g/g}$. El porcentaje de recuperación fue $\leq 87,3\%$, y los resultados de los ensayos de precisión generaron coeficientes de variación de $\leq 0,38\%$. Los resultados revelan que el tratamiento de muestras y la validación de la técnica analítica es simple, confiable y eficiente, para el desarrollo de estudios de disposición de danofloxacin en compartimentos comestibles del huevo de gallina.

El estudio se realizó con el propósito de estudiar la disposición temporal de danofloxacin en compartimentos del huevo luego de la administración en el agua de bebida de 7,35 mg/kg durante 11 días consecutivos a gallinas Rhode Island Red, en la época de pico de postura (85%) al inicio de la investigación. Las aves fueron mantenidas en condiciones productivas reales. Se colectaron los huevos durante 15 días posteriores a la dosificación. Se determinaron las concentraciones de danofloxacin en yema y clara de huevo (figura 2).

Los niveles residuales declinan significativamente luego del segundo día y son supe-

riores y persistentes en la yema que en clara alcanzando los $14,6 \pm 0,6$ y $8,7 \pm 0,4$ días, respectivamente.

Los datos obtenidos de depleción de danofloxacin en los compartimentos del huevo los analizaron mediante el programa WT 1.4 de la EMEA y conjeturando un riguroso LMR ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$), se estimó un periodo de carencia de 23,94 y 27,59 días para clara y yema, respectivamente

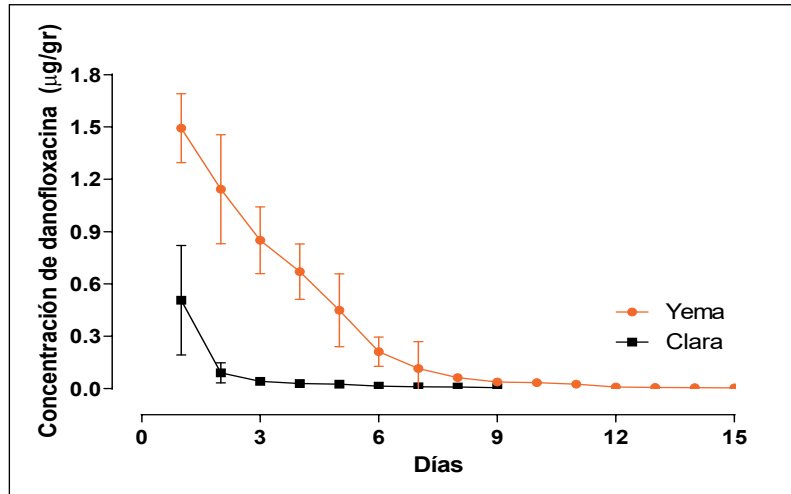


Figura 2: Concentraciones en yema y clara de danofloxacin posterior a una dosis oral de 7.35 mg/kg en el agua de bebida durante 11 días.

Marbofloxacin

Se llevó a cabo un estudio para establecer la depleción en los compartimentos comestibles del huevo y determinar el periodo de carencia de marbofloxacin en ambos compartimentos, previa validación de la técnica analítica utilizada para la determinación de las diferentes concentraciones en yema y clara, similar a la descrita para danofloxacin. Los límites de detección establecidos para clara y yema son de $0,012 \mu\text{g}/\text{g}$ y $0,010 \mu\text{g}/\text{g}$, respectivamente. Los límites de cuantificación (LQ) para marbofloxacin son de $0,037 \mu\text{g}/\text{g}$ en clara y $0,031 \mu\text{g}/\text{g}$ en yema. Los ensayos de precisión para marbofloxacin ambas matrices registraron coeficiente de variación $\leq 2,51\%$ y recuperabilidad de $94,7 \pm 15,3$ y $87,8 \pm 6,9\%$ en clara y yema, respectivamente.

El ensayo para cuantificar marbofloxacin en los compartimentos del huevo se realizó luego de la administración en el agua de bebida de $1,5 \text{ mg}/\text{kg}$ durante 11 días consecutivos a gallinas Rhode Island Red, en la época de pico de postura (85%) al inicio de la investigación. Posteriormente se colectaron huevos durante los 15 días siguientes, para su análisis por HPLC (figura 3).

Los niveles del antimicrobiano declinaron al tercer día en ambas matrices y son superiores y levemente más persistentes en yema, se detectan hasta los 9 días, mientras

que en clara sólo hasta los 8 días. Estos resultados son consistentes con la liposolubilidad de fluoroquinolonas y el tiempo requerido por cada compartimento del huevo para su formación, según la extensión del tratamiento.

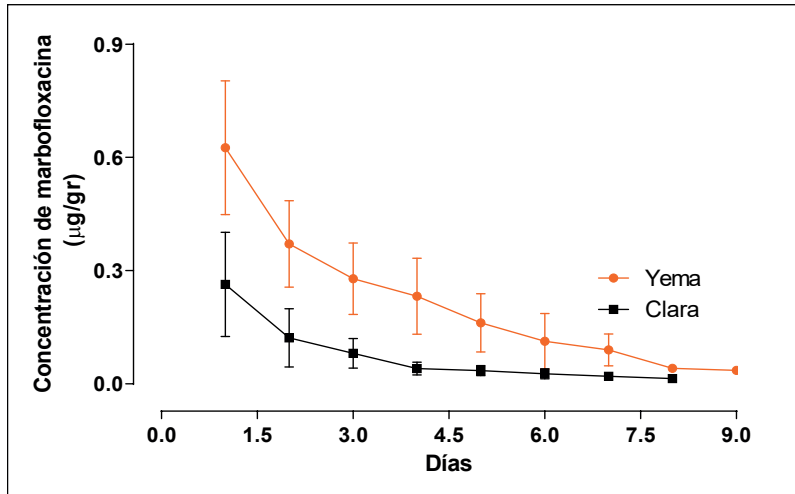


Figura 3: Concentración de marbofloxacin en yema y clara de huevo, posterior a una dosis de 1,5 mg/kg en el agua de bebida durante 11 días.

Similar a lo que sucede con danofloxacin, tomando en cuenta un riguroso LMR de 100 µg/kg se estimó un periodo de carencia de 12 y 17 días para clara y yema, respectivamente, con un 99% de confiabilidad.

Capítulo VI

Experiencias con fluoroquinolonas en cabras lactantes

Cuando se administran antimicrobianos en hembras lactantes que padecen infecciones mamarias, el fármaco debe lograr en leche, tejido mamario y extramamario susceptible de colonización bacteriana, concentraciones efectivas que persistan en la glándula un período de tiempo compatible con la rutina de ordeño.

Los modelos farmacocinéticos determinan parámetros de antimicrobianos en leche, en función de la dosis y las propiedades químicas del fármaco. Es indispensable que los valores referidos a la concentración de antimicrobianos en leche respecto a la concentración plasmática, se consideren cuando los fármacos obtienen el estado de equilibrio en el plasma.

La integración de variables PK/PD son imprescindibles para optimizar la terapéutica antibacteriana, en particular los parámetros: relación $C_{m\acute{a}x}/CMI$ y el período de tiempo que la concentración supera la CMI en la glándula.

La administración parenteral se utiliza durante la lactancia en presencia de mastitis aguda o sobreaguda que impide el vaciado glandular, debido al efecto compresivo que ejerce el edema o cuando los animales enfermos padecen alteraciones anatómicas del pezón, tales como excesiva constricción o dilatación, que dificultan el ingreso o facilitan el escurrimiento retrógrado del medicamento y cuando existe grave compromiso general, que requiere el mantenimiento de CMI en tejidos corporales y en la glándula mamaria.

El antimicrobiano administrado por las vías parenterales debe absorberse de modo adecuado a partir del sitio de aplicación. La tasa y el ritmo de absorción a partir de la aplicación extravascular determinan el ingreso a la circulación general, proceso condicionado no sólo por las características físico-químicas del agente sino también por la vía de administración y la formulación galénica.

A partir de la circulación general la difusión de moléculas a la glándula depende de la capacidad del principio activo para atravesar el endotelio capilar y la capa lipídica de la membrana celular. Los antecedentes disponibles revelan que algunos antimicrobianos consiguen buena disposición como sucede con los macrólidos, mientras en otros es moderada, por ejemplo, tetraciclinas o betalactámicos y en otros es insuficiente, como sucede con los aminoglucósidos.

Experiencias realizadas en hembras bovinas revelan que la perfusión de la mama es intensa: la producción de 20 litros de leche demanda la circulación diaria de 2000 litros

de sangre en la glándula. La perfusión en la misma y los cambios en la permeabilidad son factores importantes en la distribución y eliminación de fármacos.

La aplicación sistémica requiere la valoración clínica del animal: ciertas patologías concomitantes con la mastitis, tales como desórdenes metabólicos, endotoxemia, deshidratación, etc., limitan significativamente la perfusión de la ubre, lo que redundará en disminución de la presión vascular o incremento de la resistencia tisular.

El epitelio de la glándula mamaria representa una membrana biológica conformada como barrera lipídica que contiene poros. Las sustancias hidrosolubles y reducido peso molecular (≤ 200), poseen capacidad para atravesar los poros, mientras que las liposolubles, no ionizadas y no unidas a proteínas plasmáticas, difunden en función de su pKa.

La intensidad del pasaje de fármacos, a partir de la administración sistémica, es función de:

a) Grado de ionización: el gradiente de pH entre el plasma y la mama determina en gran medida la cantidad del fármaco disponible en la glándula.

Los ácidos débiles (betalactámicos), en gran parte ionizados en la sangre (pH= 7,4), difunden escasamente desde el plasma a la glándula. La relación teórica estimada según la ecuación de Henderson-Hasselbach (pH sanguíneo= 7,4, pH de leche normal= 6,6) de concentraciones en leche vs plasma es inferior a la unidad, siempre que el pH de la leche no supere el valor 7,4.

En cambio, la relación teórica previsible para bases débiles (macrólidos) es > 1 , siempre que el antimicrobiano sea liposoluble, de modo que los fármacos de carácter básico alcanzan en la mama concentraciones varias veces superiores a las plasmáticas.

La ionización de antibióticos básicos en el interior de la glándula determina un "atrapamiento iónico", debido a que el pH de la leche normal es de 6,5 a 6,8, aunque es factible un aumento del pH en presencia de inflamación, lo que implica menor concentración, en relación a la glándula sana.

Esta modificación no es tan significativa para los antimicrobianos de carácter ácido como para los básicos e inexistente para los anfóteros. Asimismo, en presencia de mastitis, la integridad funcional de la barrera lipídica está temporalmente alterada, de modo que los antimicrobianos incrementan su disposición en la ubre.

b) Liposolubilidad del fármaco: influencia la excreción mamaria al determinar la capacidad de atravesar barreras biológicas, aún en fármacos de pKa similar, como acontece con macrólidos y aminoglucósidos. Sin embargo, el carácter hidrosoluble de aminoglucósidos condiciona la difusión hacia el tejido mamario y consecuentemente, el porcentaje recuperado en leche, es reducido.

c) Unión a proteínas plasmáticas: los agentes liposolubles, no ionizados, poco unidos a proteínas plasmáticas y de bajo peso molecular, ingresan fácilmente al interior de la

mama, mientras que los antimicrobianos unidos intensamente a proteínas plasmáticas, tienen limitada la difusión tisular.

Sin embargo, es necesario precisar el rol de este parámetro, debido a que no se observan diferencias significativas en las concentraciones en leche de antibióticos que se unen de modo variable a proteínas plasmáticas, pero con diferente liposolubilidad y grado de ionización.

Es aceptado que los xenobióticos llegan a leche por difusión pasiva no iónica y que la magnitud de la distribución está en relación a sus propiedades farmacocinéticas como liposolubilidad, grado de ionización y grado de unión a proteínas en sangre y en la ubre.

Sin embargo, estudios comparativos sugieren que durante la lactación se puede incrementar la tasa de eliminación de fluoroquinolonas desde la sangre, en particular de enrofloxacin y norfloxacin en ovejas, y marbofloxacin en cerdas. En los últimos años se ha estudiado la participación de transportadores de alta capacidad de eflujo y su relación con la concentración elevada de fluoroquinolonas en leche. Estos transportadores cumplen roles importantes en el mantenimiento de la fisiología, protegiendo al organismo de la toxicidad de xenobióticos y metabolitos endógenos. Su disfunción también se asocia a la manifestación de distintas patologías.

Son proteínas de membrana denominadas ATP-Binding Cassettes (ABCs), están presentes en los sistemas biológicos y se expresan en la mayoría de los organismos vivientes desde bacterias a humanos. Transportan un gran número de sustancias, que incluyen azúcares, aminoácidos, toxinas, lípidos, esteroides, metabolitos endógenos, iones, diversas drogas y antibióticos. Están localizadas en las membranas del hígado, intestino, riñón y barrera hemato-encefálica entre otras.

Si bien numerosos, en Medicina Veterinaria son relevantes los ABCs B1, C1, C2, C4 y G2, involucrados en el transporte de fármacos y/o sus metabolitos, siendo sustratos de uno o más de ellos cimetidina, loperamida, macrólidos, ivermectina, fluoroquinolonas y antineoplásicos.

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

Se ha demostrado que el BCRP, tiene una elevada expresión durante la lactancia en bovinos, ovinos, ratas y también en humanos, facilitando la excreción de drogas y xenobióticos. Esto explicaría el pasaje a leche de enrofloxacin y ciprofloxacina en altas concentraciones del cual son sustratos, mientras otros autores proponen también a danofloxacin como sustrato de BCRP.

d) Vía de administración y pauta de dosificación: en este sentido, en los últimos años la industria farmacéutica ha reformulado sus productos comerciales que contienen fluoroquinolonas, con el objetivo de adecuarse a la relación PK-PD. Si bien un objetivo es la búsqueda de eficacia, interesa conocer también como impactan estas nuevas formulaciones en la persistencia de estos agentes o sus metabolitos en los productos destinados a consumo, para evaluar si es necesario readecuar o no los plazos de espera.

Danofloxacin

Los antecedentes cinéticos de danofloxacin tras la administración parenteral en animales domésticos indican pronta absorción y rápida distribución desde la circulación general. En varias especies se comprobó elevada biodisponibilidad ($\geq 89\%$), notable disposición tisular y moderada permanencia en el organismo.

Considerando las propiedades farmacocinéticas y microbiológicas de danofloxacin, este trabajo se desarrolló con los objetivos de establecer parámetros cinéticos, valorar su utilidad terapéutica y determinar el período de resguardo en leche tras la aplicación subcutánea en hembras caprinas en lactación.

Como sujetos experimentales se utilizaron cabras lactantes clínicamente sanas de $36 \pm 4,1$ Kg de peso que recibieron una dosis subcutánea única de 6 mg/kg de mesilato de danofloxacin al 18% (Advocin 180®, Pfizer). Luego se obtuvo muestras de sangre y de leche en distintos tiempos hasta 24 y 120 horas siguientes, respectivamente, conservadas a -20°C hasta su análisis.

El ensayo preparativo consistió en la extracción líquido-líquido del analito utilizando muestra (plasma o leche), agua deionizada y metanol. El conjunto se sometió a agitación por vórtex durante 30" y luego se centrifugaron a 13.500 rpm a 4°C durante 25 minutos.

La separación y cuantificación se realizó por HPLC a temperatura ambiente mediante una elusión isocrática en fase reversa con flujo de 0,8 ml por minuto y la lectura en detector de fluorescencia establecido a 295 nm de excitación y 490 nm de emisión utilizando fase móvil compuesta por agua, acetonitrilo y trietilamina (79:19:1 v/v/v) ajustada a pH 3,0.

Los datos de concentraciones plasmáticas y lácteas obtenidos versus tiempo se procesaron por el software PK Solution 2.0 con el propósito de calcular parámetros cinéticos. La tabla 1 indica parámetros cinéticos robustos obtenidos con danofloxacin al 18% en plasma y leche de caprinos. La figura 1 indica la curva de disposición plasmática hasta las 24 horas siguientes, mientras la figura 2 representa los niveles lácteos que persisten hasta 120 horas post aplicación.

La aplicación subcutánea de danofloxacin al 18% en cabras provee rápida absorción, exhibe excelente distribución tisular y limitada permanencia plasmática. Con la dosis y concentración utilizadas, las características farmacocinéticas de danofloxacin

en caprinos son similares a las observadas en otras especies.

Parámetro	Plasma	Leche
ABCárea ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}/\text{h}$)	$8,70 \pm 2,27$	$92,72 \pm 64,04$
$t_{1/2\text{abs}}$ (h)	$0,29 \pm 0,18$	-
$t_{1/2\alpha}$ (h)	$2,07 \pm 0,81$	-
$t_{1/2\beta}$ (h)	$5,90 \pm 1,52$	$3,65 \pm 0,61$
$t_{1/2\gamma}$ (h)	-	$19,51 \pm 4,81$
TMR (h)	$6,64 \pm 0,91$	-
$C_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$1,2 \pm 0,15$	$14,08 \pm 10,14$
$T_{\text{máx}}$ (h)	$1,3 \pm 0,6$	$2,6 \pm 1,3$

Tabla 1: Parámetros cinéticos obtenidos por la aplicación SC de 6.0 mg/kg de DFX en caprinos

Las respectivas relaciones de $C_{\text{máx}}$ y ABC respecto la CMI de *P. haemolytica* de 31 y 217 obtenidas en el plasma resultan suficientes para asegurar eficacia clínica- microbiológica. Danofloxacina exhibe gran disposición láctea, según las relaciones ABC leche/ plasma de 10,6 y $C_{\text{máx}}$ leche/plasma de 11,7.

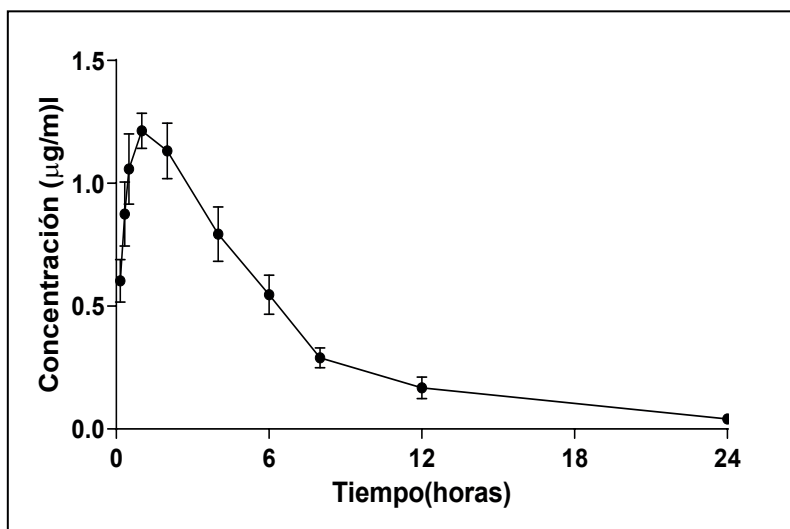


Figura 1: Concentraciones plasmáticas de danofloxacina 18% en cabras

Aplicando valores residuales en el programa WT M 1.4 de la EMEA, el periodo de resguardo para danofloxacina en hembras caprinas se estimó en 6,85 días.

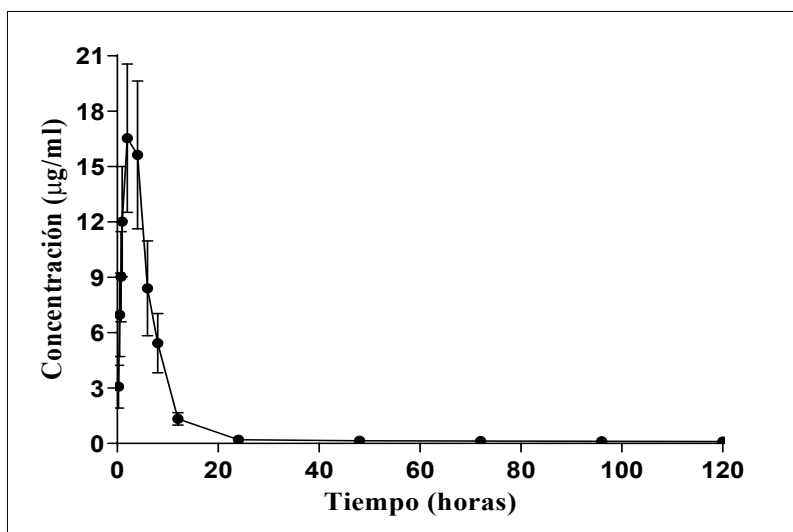


Figura 2: Concentraciones lácteas de danofloxacina 18% en cabras

Difloxacina

Los antecedentes disponibles en animales domésticos con difloxacina indican excelente perfil cinético de este antimicrobiano por aplicación oral y parenteral. Los antecedentes en caprinos son limitados, puede constituir un recurso potencialmente útil en presencia de enfermedades producidas por enterobacterias. Este estudio se realizó con el propósito de establecer parámetros farmacocinéticos séricos luego de la aplicación endovenosa única y obtener datos de disposición en la glándula mamaria.

Como sujetos experimentales se utilizaron 5 hembras caprinas al final del período de lactancia lactantes ordeñadas cada 24 horas. Inmediatamente luego del ordeño se aplicó una dosis de 5 mg/kg de difloxacina al 2,5% por vía intravenosa, posteriormente se obtuvieron muestras de sangre en distintos tiempos hasta las 24 horas siguientes y de leche en distintos tiempos hasta las 120 horas, conservadas a -20°C hasta su análisis.

El ensayo preparativo de las muestras, la separación y cuantificación por HPLC con detector de fluorescencia, es idéntico al utilizado en la experiencia anterior de danofloxacina en cabras.

Los datos obtenidos de concentraciones séricas y lácteas versus tiempo se procesaron con el programa farmacocinético no compartimental PK Solution 2.0. Las curvas de disposición se indican en las figuras 1 y 2 y los parámetros cinéticos obtenidos se señalan en la tabla 1.

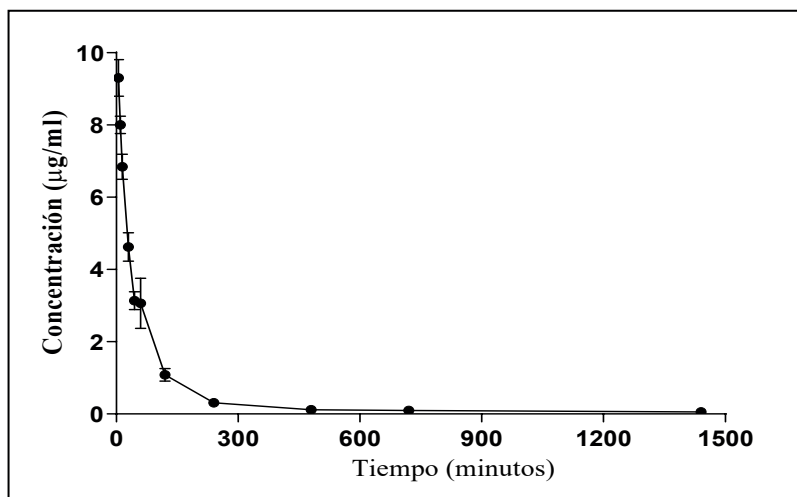


Figura 1: Concentraciones séricas de difloxacin en cabra

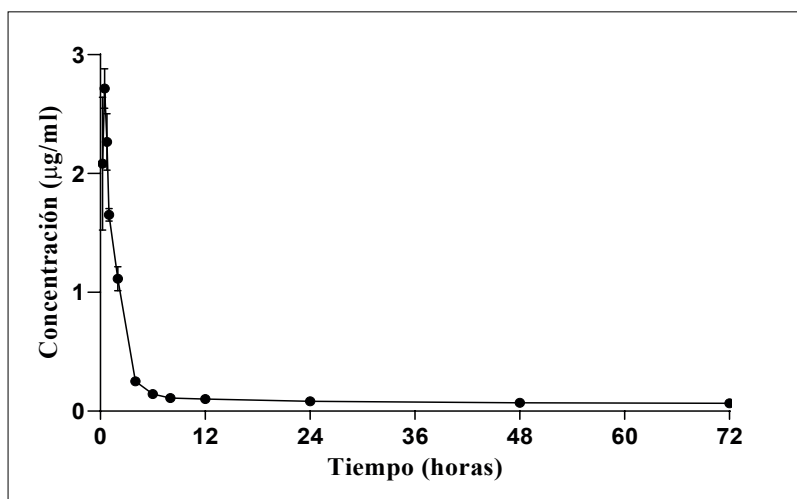


Figura 2: Concentraciones lácteas de difloxacin en cabras vs tiempo

Parámetro	Suero	Leche
ABCárea (µg·ml/h)	11,52 ± 1,93	7,65 ± 0,73
t _{1/2} abs (h)	-	1,50 ± 1,22
t _{1/2} β (h)	0,62 ± 0,15	7,28 ± 2,85
t _{1/2} γ (h)	10,69 ± 1,48	15,52 ± 0,79
TMR (h)	5,63 ± 1,55	7,91 ± 0,52
C _{máx} (µg/ml)	-	2,96 ± 0,60
T _{máx} (h)	-	0,55 ± 0,20
V _{dss} (L/kg)	2,37 ± 0,55	-
Cl _t (ml/min/kg)	7,41 ± 1,42	-

Tabla 1: Parámetros cinéticos en suero y leche tras la aplicación IV de difloxacin

Los resultados obtenidos indican que difloxacin difunde pronto del compartimiento central, logra amplia disposici3n en tejidos y exhibe moderada permanencia en el organismo. Los datos obtenidos en los parámetros cinéticos plasmáticos son acordes con las características cinéticas exhibidas por las fluoroquinolonas.

En leche, difloxacin consigue un $C_{m\acute{a}x}$ de $2,9 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ a las $0,55 \pm 0,2$ horas y exhibe menor disposici3n respecto al plasma segun refleja la relaci3n de ABC leche/plasma de 0,68.

Considerando el LMR establecido en leche bovina para danofloxacin ($30 \mu\text{g/kg}$), debido que este valor no fue determinado para difloxacin y los valores cinéticos obtenidos (tabla 1), aplicando la fórmula de Riviere y Sundlof (2009) se obtuvo un periodo de retirada para leche en caprinos de 5 días.

Levofloxacin

Se estudi3 la disposici3n de levofloxacin con el prop3sito de establecer parámetros farmacocinéticos plasmáticos luego de la aplicaci3n endovenosa única y obtener datos de disposici3n en la glándula mamaria.

Como sujetos experimentales se utilizaron 6 hembras caprinas lactantes ordeñadas cada 24 horas. Inmediatamente luego del ordeño se aplic3 una dosis de 5 mg/kg de levofloxacin por vía endovenosa, luego se obtuvieron muestras de sangre heparinizada en distintos tiempos hasta las 24 horas, centrifugadas a $1200 \text{ g} \times 10$ minutos y de leche a las 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas, conservadas a -20°C hasta su análisis.

El ensayo preparativo consistió en la extracci3n líquido-líquido idéntico a las anteriores experiencias de detecci3n de fluoroquinolonas en leche caprina. La separaci3n y cuantificaci3n de levofloxacin se realiz3 por HPLC con detector de fluorescencia, con las condiciones cromatográficas expuestas anteriormente.

Las concentraciones plasmáticas y lácteas de levofloxacin se registran en la figura 1, transformadas a logaritmo.

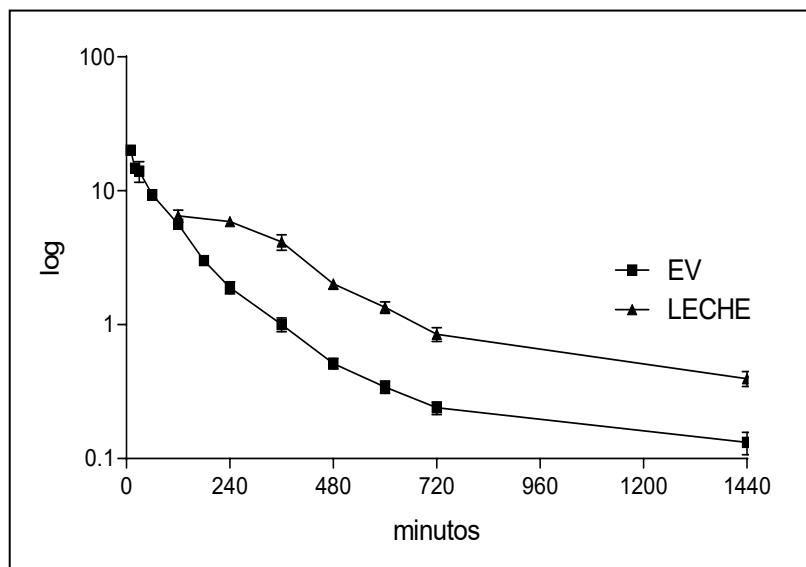


Figura 1: Niveles plasmáticos y lácteos de levofloxacina en caprinos por aplicación EV

En leche, levofloxacina consigue un $C_{máx}$ de $6,7 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$ logrado a las $2,4 \pm 0,89$ horas y exhibe mayor disposición respecto al plasma según refleja la relación de ABC_{leche}/ABC_{plasma} de 1,34 en las primeras 24 horas post aplicación, acorde a sus propiedades lipofílicas.

Parámetro	Plasma	Leche
ABCárea ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}/\text{h}$)	$39,46 \pm 2,63$	$53,1 \pm 6,88$
$t_{1/2} \alpha$ (h)	$1,10 \pm 0,09$	-
$t_{1/2} \beta$ (h)	$11,31 \pm 5,24$	$5,21 \pm 0,54$
Vd área (L/kg)	$2,11 \pm 0,13$	-
Cl área (ml/min/kg)	$2,24 \pm 0,29$	-

Tabla 1: Parámetros cinéticos en plasma y leche tras la aplicación intravenosa de levofloxacina

Considerando el LMR establecido en leche bovina para enrofloxacin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y los valores cinéticos obtenidos (tabla 1), aplicando la fórmula de Riviere y Sundlof (2009) se obtuvo un periodo de retirada para leche en caprinos de 117,2 horas.

Marbofloxacin

Se estudió la disposición de marbofloxacin con el propósito de establecer parámetros cinéticos plasmáticos por aplicación endovenosa y subcutánea, obtener datos de disposición en la glándula mamaria y estimar un periodo de resguardo. Se utilizaron 6 hembras caprinas lactantes ordeñadas cada 24 horas. Inmediatamente luego del ordeño se aplicaron 2 mg/kg intravenosa de marbofloxacin, luego se obtuvieron muestras de sangre en distintos tiempos hasta las 24 horas. Dos semanas después se realizó

idéntico tratamiento por vía subcutánea y se obtuvieron muestras de plasma y leche hasta las 24 y 120 horas siguientes, respectivamente.

La complejidad de las muestras de leche caprina demandó el tratamiento previo con ácido tricloroacético al 50% en relación 2:1 v/v para remover macromoléculas que interfieren en cromatograma, que afectaron la separación de marbofloxacin.

Se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas que en las experiencias anteriores de detección de fluoroquinolonas en leche caprina. El método de HPLC implementado permitió cuantificar el fármaco en plasma durante 24 horas (tabla 1 y figura 1) y en leche, luego de la aplicación subcutánea, hasta las 72 horas posteriores a la aplicación (tabla 3 y figura 2), superando los niveles provistos con marbofloxacin por el método microbiológico en bovinos.

En el ensayo de linealidad, los coeficientes de correlación ($r^2 > 0,99$) acreditan la confiabilidad de las curvas de calibración utilizadas en los cálculos de concentración del analito en las muestras problema. El método de detección implementado es preciso, según indican los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad realizados en plasma y leche. Los CV en ambas matrices estudiadas fueron $\leq 1,5\%$ y $\leq 3,0\%$, respectivamente.

Tiempo (hs)	Subcutánea	Endovenosa
0,16	0,37 ± 0,31	3,03 ± 0,41
0,33	0,69 ± 0,66	2,63 ± 0,53
0,5	0,86 ± 0,79	2,20 ± 0,45
0,75	0,96 ± 0,56	1,92 ± 0,41
1	0,82 ± 0,47	1,52 ± 0,45
2	0,72 ± 0,41	0,92 ± 0,24
3	0,53 ± 0,32	0,62 ± 0,21
4	0,40 ± 0,25	0,41 ± 0,10
6	0,24 ± 0,11	0,24 ± 0,10
8	0,15 ± 0,05	0,18 ± 0,03
12	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,03
24	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,01

Tabla 1: Concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/ml}$) versus tiempo por aplicación subcutánea e intravenosa de 2 mg/kg de marbofloxacin

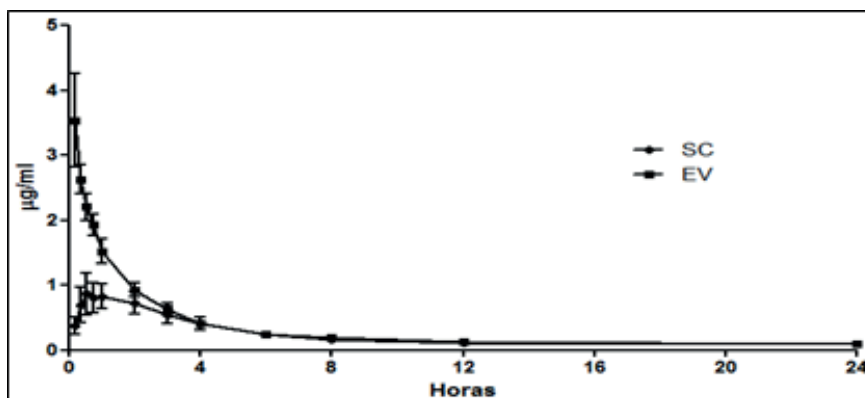


Figura 1: Concentraciones plasmáticas de marbofloxacina por vía EV y subcutánea.

El análisis revela que marbofloxacina difunde pronto desde el compartimento central, según valores de $t_{1/2\alpha}$ y experimenta amplia persistencia en el organismo, según valores obtenidos de $t_{1/2\beta}$, TMR y CI y consigue extensa difusión tisular según expresa el Vd conseguido. La aplicación SC determinó pronta absorción; el $C_{m\acute{a}x}$ fue $0,73 \pm 0,51 \mu\text{g/ml}$, obtenido a las $1,38 \pm 0,39$ horas. La biodisponibilidad plasmática (F) fue del $77,1 \pm 16,3 \%$.

Parámetro	Plasma EV	Plasma SC
$t_{1/2}$ abs (h)	-	$0,17 \pm 0,06$
$t_{1/2\alpha}$ (h)	$0,71 \pm 0,23$	$1,01 \pm 0,84$
$t_{1/2\beta}$ (h)	$9,57 \pm 1,98$	$9,42 \pm 2,25$
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/ml}$)	-	$0,73 \pm 0,51$
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	-	$1,38 \pm 0,39$
ABCárea ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	$8,48 \pm 1,83$	$6,58 \pm 2,19$
TMR (h)	$10,68 \pm 3,44$	$14,06 \pm 5,22$
Vd (L/kg)	$3,46 \pm 1,38$	-
Cl _t (ml/min/kg)	$4,10 \pm 0,94$	$4,12 \pm 0,90$
F %	-	$77,16 \pm 16,33$

Tabla 2: Parámetros cinéticos plasmáticos de marbofloxacina en cabras.

La disposición en la glándula mamaria, luego de la aplicación subcutánea de marbofloxacina es pronta y extensa. El cociente logrado de ABC leche/plasma es de $33 \pm 2,3$. El $C_{m\acute{a}x}$ lácteo provisto por la aplicación subcutánea de 2 mg/kg de marbofloxacina es de $0,83 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$, alcanzado a las $6,6 \pm 4,2$ horas ($T_{m\acute{a}x}$) (tabla 4).

Tiempo (hs)	Concentración (mg/me)
0,25	0,11 ± 0,03
0,5	0,17 ± 0,07
0,75	0,25 ± 0,11
1	0,35 ± 0,20
2	0,41 ± 0,17
3	0,50 ± 0,26
4	0,56 ± 0,35
6	0,60 ± 0,37
8	0,63 ± 0,47
12	0,42 ± 0,36
24	0,31 ± 0,21
48	0,15 ± 0,04
72	0,11 ± 0,01
96	0,10 ± 0,00

Tabla 3: Concentraciones lácteas versus tiempo por aplicación subcutánea de 2 mg/kg de marbofloxacin.

Parámetro cinético	Leche
$t_{1/2\beta}$ (h)	20,5 ± 15,6
C _{máx} (µg/ml)	0,83 ± 0,62
T _{máx} (h)	6,6 ± 4,2
ABC _{área} (µg-h/ml)	20,01 ± 12,55
TMR (h)	31,3 ± 22,5
ABC Leche/plasma	3,30 ± 0,23

Tabla 4: Parámetros cinéticos lácteos provistos por la aplicación de 2 mg/kg de marbofloxacin por vía subcutánea.

Marbofloxacin experimenta extensa permanencia en la secreción láctea, según revelan el $t_{1/2\beta}$ de 20,5 ± 15,6 horas y el TMR de 31,3 ± 22,5 horas. La significativa disposición de marbofloxacin en la leche tendría relación con su naturaleza liposoluble; ciertas modificaciones estructurales en su molécula que le confieren mayor difusión, como la incorporación del anillo oxadiazínico, sus propiedades anfóteras y la reducida unión a proteínas plasmáticas, aspectos que en conjunto promueven la disposición de fármacos en la leche.

Como el pH normal de la leche ($\approx 6,6$) es inferior que el pH del plasma ($\approx 7,4$), las bases débiles, que se encuentran mayormente no ionizadas en la sangre, difundirán con mayor facilidad hacia la leche que las moléculas ácidas, y una vez, en ese medio, el equilibrio deriva hacia la fracción ionizada. Estas características de disposición en la secreción láctea caprina ofrecen variaciones importantes para el conjunto de fluoroqui-

nolonas de uso veterinario y se explicarían por la expresión de transportadores.

Debido que no existe un LMR para marbofloxacina en leche caprina, se consideró un LMR de 75 µg/ml, establecido para este antimicrobiano en leche de bovinos en la Unión Europea.

Aplicando las concentraciones residuales del antimicrobiano obtenidas en leche en cada uno de los animales tratados por vía subcutánea al programa WTM 1.4 de la EMEA se estimó un periodo de resguardo de 61,8 horas.

El periodo de retirada calculado es ventajoso, compatible con las condiciones de explotación y similar al recomendado por la industria farmacéutica veterinaria cuando este antimicrobiano se utiliza en vacas lecheras en producción (Marbocyl 10%^o, solución inyectable, Laboratorio Vetoquinol, España).

El método aplicado es sensible por cuanto el LD estimado en leche caprina, si bien excede el informado en leche bovina, es inferior al LMR establecido para marbofloxacina por la UE, en consecuencia, es válido para estudios de residuos.

Asimismo, el método es sencillo, requiere pocas etapas en su desarrollo, con escasa demanda de solventes, y es económico porque la extracción líquido-líquido no requiere insumos de alto costo como son los cartuchos de extracción en fase sólida, es suficientemente sensible para estudios cinéticos y para establecer niveles residuales, dada la sencillez en el procesamiento de las muestras, y versatilidad, pues se adapta a las matrices estudiadas, constituye una opción en los planes de monitoreo de residuos.

Enrofloxacin y ciprofloxacina

Debido que en caprinos es habitual la extrapolación de información de otras especies, en este ensayo se procuró establecer la disposición plasmática y láctea de una nueva formulación de enrofloxacin al 10% y su principal metabolito, ciprofloxacina y en leche y, determinar un periodo de resguardo.

Como sujetos experimentales se utilizaron 6 hembras caprinas clínicamente sanas al final de la lactancia ordeñadas cada 24 horas. Luego del ordeño se aplicó por vía subcutánea 7,5 mg/kg de enrofloxacin al 10%. Posteriormente se obtuvieron muestras en distintos tiempos de sangre hasta 24 horas y de leche hasta 120 horas, éstas tratadas con ácido tricloroacético al 20% en relación 1:1 v/v.

El ensayo preparativo es el mismo utilizado para las otras experiencias con fluoroquinolonas en caprinos. El método de HPLC utilizado permitió establecer niveles de enrofloxacin y ciprofloxacina en plasma y leche hasta 48 y 72 horas post aplicación, respectivamente. Los datos obtenidos de plasma y leche fueron analizados en cada animal con el programa cinético no compartimental PK Solution 2.0 y se indican en la tabla 1. La figura 1 representa la disposición plasmática de enrofloxacin y ciprofloxacina, mientras la figura 2 indica niveles lácteos.

La aplicación subcutánea de 7,5 mg/kg de enrofloxacin a al 10% en cabras en lactancia determinó lenta absorción, produjo el $C_{m\acute{a}x}$ plasmático a las 5 horas, difunde ampliamente a los tejidos y exhibe moderada permanencia en el organismo (tabla 1).

La conversión a ciprofloxacina es del $6,4 \pm 5,9 \%$, que indica reducida capacidad de biotransformación en estos animales. Ciprofloxacina experimenta más permanencia que enrofloxacin en el organismo y mayor distribución tisular, acorde los antecedentes disponibles.

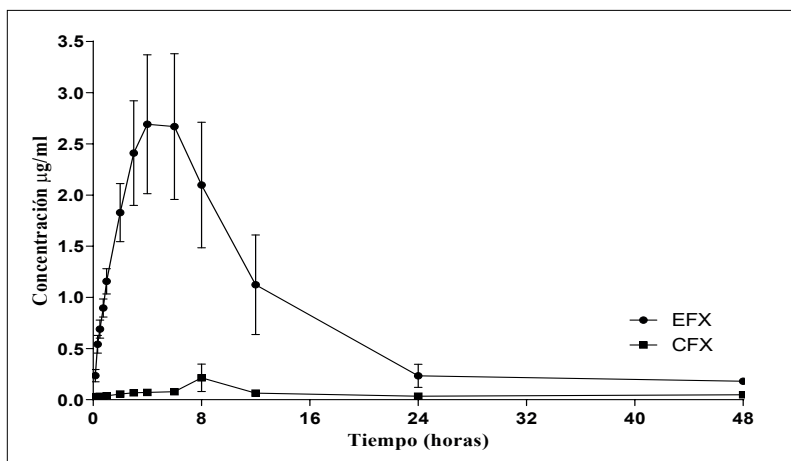


Figura 1: Curvas de disposición plasmática de enrofloxacin y ciprofloxacina

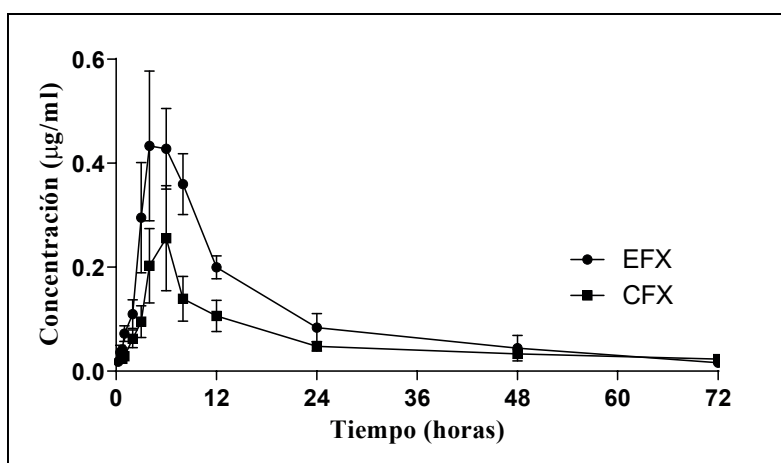


Figura 2: Curvas de disposición láctea de enrofloxacin y ciprofloxacina

La disposición láctea de enrofloxacin fue inmediata a su aplicación, logra el $C_{m\acute{a}x}$ luego del plasmático. La comparación ABC leche/plasma de enrofloxacin arroja cocientes de $0,2 \pm 0,1$, mientras ciprofloxacina es más persistente y provee cocientes lácteos de $1,4 \pm 1,1$, en ambos casos inferiores a los reportados en cabras en otros estudios. Las discrepancias en la disposición láctea de enrofloxacin con su metabolito, se explicarían por sus diferencias estructurales o por la interacción de ciprofloxacina con

transportadores.

Parámetro	PLASMA		LECHE	
	Efx	Cfx	Efx	Cfx
t _{1/2} abs (h)	1,4 ± 0,3	2,5 ± 1,5	1,2 ± 0,8	-
t _{1/2} α (h)	1,4 ± 0,3	2,5 ± 1,7	1,1 ± 0,9	1,4 ± 0,6
t _{1/2} β (h)	4,6 ± 1,1	2,9 ± 4,6	9,1 ± 5,3	12,4 ± 5,6
C _{máx} (µg/ml)	2,8 ± 1,6	0,2 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,2
T _{máx} (h)	5,0 ± 1,5	6,5 ± 1,9	5,6 ± 1,5	5,5 ± 1,2
ABCárea (µg-h/ml)	33,1 ± 25,1	2,2 ± 1,5	6,6 ± 2,7	3,4 ± 1,7
TMR (h)	8,5 ± 1,6	16,3 ± 6,6	15,7 ± 8,3	20,2 ± 9,0

Tabla 1: Parámetros cinéticos en plasma y leche tras la aplicación SC de EFX en cabras.

Utilizando los valores residuales, el período de retiro se estimó con el programa WTM 1.4 según el LMR establecido en leche caprina en 100 µg/kg para la suma de enrofloxacin y ciprofloxacina. El período de retiro de leche se estimó en 4,06 días, compatible con condiciones de explotación y con las recomendaciones de la industria farmacéutica veterinaria.

Capítulo VII

Experiencias con fluoroquinolonas en truchas Arco iris

Marbofloxacin

En este estudio poblacional el protocolo de trabajo contempló el manejo de peces anestesiados que recibieron una dosis única de 2 mg/kg de una solución comercial al 2 %, para la vía endovenosa en la vena caudal mientras la aplicación oral se realizó con una jeringa de tuberculina acoplada con una cánula gástrica, luego de un período de ayuno comprendido entre las 12 horas previas a la administración y 3 horas posteriores a la misma, o sin ayuno previo, según corresponda. Los lotes, según la vía de administración y estación se conformaron según se detalla en la tabla 1. La extracción de sangre se realizó hasta las 24 horas mientras las muestras de músculo y piel se obtuvieron hasta 120 horas post aplicación.

Estación	Vía de administración / lote	Peso (\pm D.E.) gr.	(n)
Invierno	Endovenosa / L1	328,29 \pm 33,57	36
Invierno	Oral con ayuno / L2	328,69 \pm 32,73	42
Invierno	Oral sin ayuno / L3	332,71 \pm 28,56	42
Verano	Endovenosa / L4	346,13 \pm 35,01	36
Verano	Oral con ayuno / L5	326,36 \pm 23,76	42
Verano	Oral sin ayuno / L6	327,89 \pm 31,82	42

Tabla 1: Conformación de lotes (L), por estación

La cuantificación de marbofloxacin se realizó según la metodología descrita por Böttcher et al., (2001), con modificaciones. Cada muestra se preparó en un tubo Eppendorf con plasma problema, agua deionizada, enrofloxacin como standard interno y metanol; el conjunto fue sometido a agitación con vórtex, luego reposo durante 1 hora a temperatura ambiente y finalmente centrifugado durante 20 minutos, el sobrenadante se filtró con membrana de nylon y listo para eluir en el cromatógrafo.

Para músculo y piel el procedimiento fue similar, las muestras se incorporaron en un tubo Eppendorf con agua deionizada, enrofloxacin como standard interno y una solución homogenizadora conformada por metanol, ácido perclórico, ácido fosfórico y agua. El conjunto fue homogeneizado y luego sometido a agitación por vórtex. Las muestras tratadas permanecieron 1 hora a temperatura ambiente, luego se las mantuvo en helado.

dera por 12 horas y finalmente se centrifugaron, el sobrenadante se filtró con membrana de nylon e inyectó en el cromatógrafo.

El procedimiento de separación y cuantificación se llevó a cabo a temperatura ambiente, mediante elución isocrática en fase reversa empleando una columna octadecilsilano C-18. La lectura del detector de fluorescencia se ajustó a 490 nm de emisión y 295 nm de excitación.

Se determinó límites de detección para plasma, músculo y piel de 0,011, 0,006 y 0,012, respectivamente, y límites de cuantificación (LQ) 0,036, 0,001 y 0,037 µg/ml o g, respectivamente. La recuperabilidad obtenida fue entre 84,9 a 92 %. Los resultados obtenidos corroboran la suficiencia del procedimiento de extracción del analito del plasma y de las muestras de tejido.

Luego de la administración intravascular, no se observaron reacciones adversas en los tratamientos de verano e invierno lo que refleja el perfil de seguridad que presenta marbofloxacin, coincidentes con los antecedentes toxicológicos en animales domésticos.

Tiempo (h)	Verano (± DE)	Invierno (± DE)
0,08	7,13 ± 0,62	9,42 ± 0,44
0,25	3,55 ± 0,33	4,29 ± 1,31
0,5	2,67 ± 0,29	1,76 ± 0,38
0,75	1,97 ± 0,31	1,23 ± 0,04
1	1,55 ± 0,53	1,00 ± 0,39
2	0,88 ± 0,02	0,89 ± 0,14
4	0,56 ± 0,05	0,53 ± 0,09
6	0,49 ± 0,01	0,37 ± 0,02
8	0,41 ± 0,03	s/d
12	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,01
24	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,01

Tabla 2: Concentraciones plasmáticas (mg/ml) de marbofloxacin por vía EV (2 mg/kg), en verano e invierno

En la tabla 2 y figura 1 se registran las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin posterior a una dosis única endovenosa, en las tablas 3 y figuras 2 y 3 se registran las concentraciones plasmáticas por aplicación oral. El análisis de los datos de concentración plasmática versus tiempo por la aplicación intravenosa con el programa PK Solution 2.0, generó valores de parámetros cinéticos robustos que se reseñan en la tabla 4.

Las concentraciones plasmáticas estivales e invernales (tabla 2, figura 1), exhiben una evolución bifásica con un descenso rápido y marcado, hasta 1 hora post aplicación, lo que indica rápida distribución desde el compartimento central, para luego continuar de forma gradual, también informado en la especie con ácido oxolínico, enrofloxacin y levofloxacin.

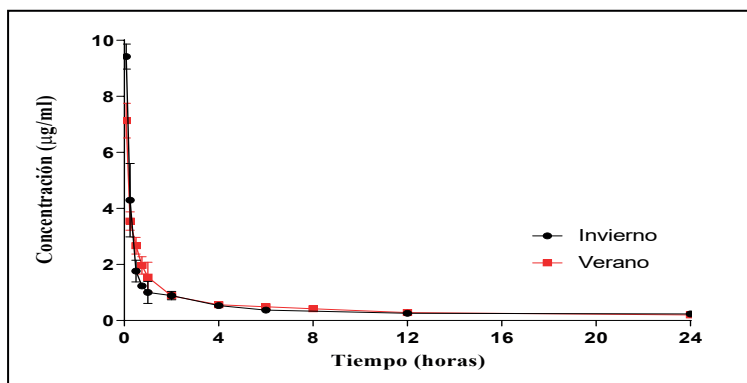


Figura 1: Niveles plasmáticos de marbofloxacina por vía EV (2 mg/kg), en verano e invierno

El Vd de 2,3 y 2,4 L/kg estimado en verano e invierno, respectivamente, se corresponde con las propiedades químicas de marbofloxacina, debido que es molécula anfótera, poco ionizada a pH fisiológico, particularidad que asociada a su carácter lipofílico y la limitada unión a proteínas plasmáticas favorece la distribución tisular.

	Verano	Invierno
C _{máx} (µg/ml)	7,13	9,42
ABC (µg-hr/ml)	15,6	15,9
t _{1/2 β} (h)	12,89	13,36
TMR	14,4	17,1
Vd (L/kg)	2,39	2,42

Tabla 4: Parámetros cinéticos plasmáticos de marbofloxacina por vía EV (2 mg/kg).

La vida media plasmática es más extensa en invierno que en verano (12,6 h), situación que tiene su correlato con lo que ocurre con otras quinolonas y en otras especies y muestra la influencia de la temperatura del agua en las funciones bioquímicas y fisiológicas de los animales ectotermos.

Horas	Invierno		Verano	
	Sin Ayuno	Con Ayuno	Sin Ayuno	Con Ayuno
0,25	0,017 ± 0,000	0,018 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,022 ± 0,002
0,5	0,018 ± 0,000	0,021 ± 0,003	0,027 ± 0,000	0,024 ± 0,000
0,75	0,019 ± 0,002	0,026 ± 0,005	0,031 ± 0,007	0,047 ± 0,012
1	0,021 ± 0,000	0,037 ± 0,003	0,034 ± 0,002	0,050 ± 0,009
2	0,024 ± 0,000	0,056 ± 0,036	0,043 ± 0,005	0,055 ± 0,017
4	0,033 ± 0,000	0,066 ± 0,011	0,044 ± 0,009	0,188 ± 0,098
6	0,058 ± 0,010	0,189 ± 0,020	0,092 ± 0,036	0,672 ± 0,268
8	0,209 ± 0,017	0,296 ± 0,041	0,271 ± 0,102	0,693 ± 0,063
12	0,103 ± 0,029	0,186 ± 0,020	0,063 ± 0,008	0,120 ± 0,048
24	0,099 ± 0,008	0,174 ± 0,013	0,040 ± 0,008	0,071 ± 0,018

Tabla 5: Concentraciones plasmáticas de marbofloxacina por vía oral (2 mg/kg).

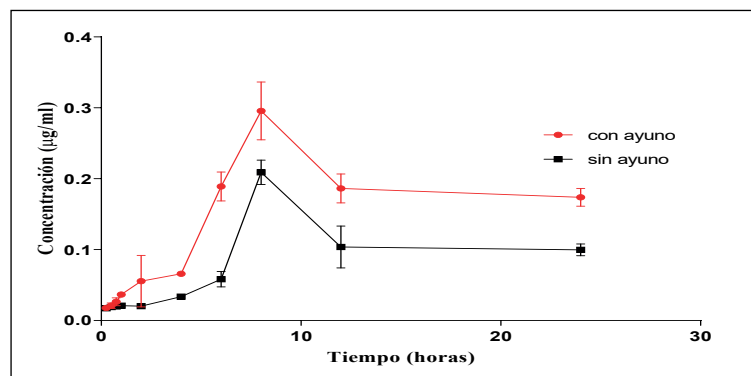


Figura 2: Concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía oral (2 mg/kg), en invierno

La administración por vía oral en condiciones de ayuno evidencia diferencias en las concentraciones plasmáticas respecto de la aplicación sin ayuno previo en verano e invierno (tablas 5, figuras 2 y 3), registran menores concentraciones en invierno y en los animales no ayunados en ambas épocas del año, los parámetros cinéticos se registran en la tabla 6.

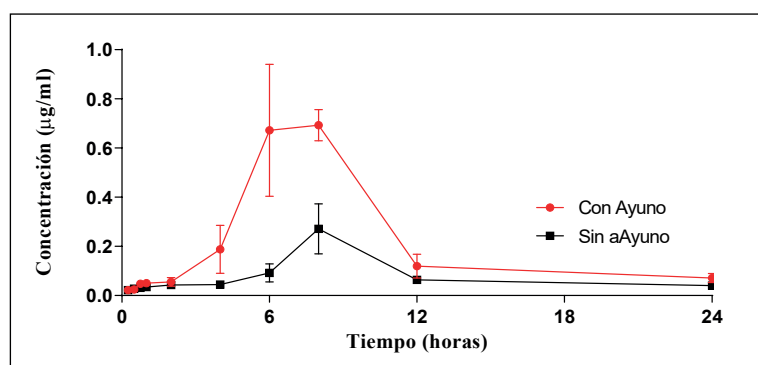


Figura 3: Niveles plasmáticos de marbofloxacin por vía oral en verano

Parámetro	Verano		Invierno	
	c/ayuno	s/ayuno	c/ayuno	s/ayuno
C _{máx} (µg/ml)	0,69 ± 0,06	0,27 ± 0,10	0,29 ± 0,04	0,20 ± 0,01
T _{máx} (h)	8	8	8	8
t _{½ α} (h)	0.96	2.1	3,46	7,71
t _{½ β} (h)	21.1	24.1	27.8	27.5
TMR (h)	28.4	46.3	34.1	39.5

Tabla 6: Parámetros cinéticos en plasma para marbofloxacin por vía oral (2 mg/kg), en verano e invierno.

Las concentraciones musculares luego dosis única oral, se registran en la tabla 7 y figuras 4 y 5. Además los parámetros cinéticos musculares demuestran la afinidad del fármaco por el tejido independiente la época del año (tabla 8).

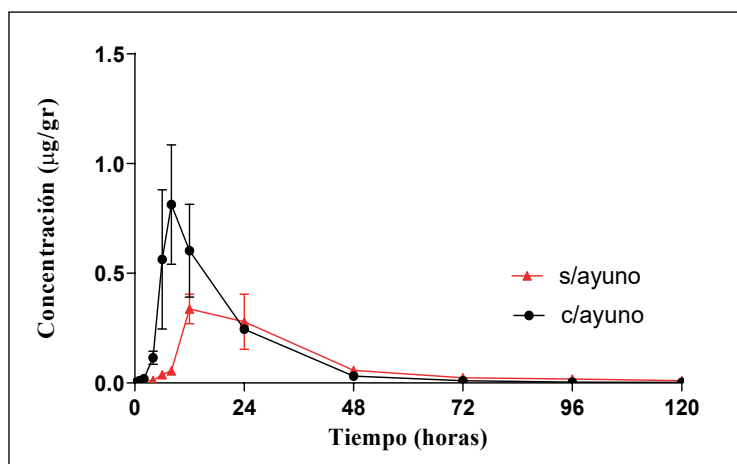


Figura 4: Concentraciones en músculo de marbofloxacina tras la aplicación oral de 2 mg/kg con y sin ayuno en verano

Horas	Músculo verano		Músculo invierno	
	c/ayuno	s/ayuno	c/ayuno	s/ayuno
0,08	n/d	n/d	n/d	n/d
0,25	n/d	n/d	n/d	n/d
0,5	0,007 ± 0,000	n/d	0,023 ± 0,000	n/d
0,75	0,008 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,024 ± 0,001	0,024 ± 0,006
1	0,010 ± 0,001	0,008 ± 0,000	0,027 ± 0,003	0,025 ± 0,000
2	0,019 ± 0,010	0,010 ± 0,010	0,056 ± 0,020	0,026 ± 0,001
4	0,115 ± 0,029	0,012 ± 0,010	--	0,048 ± 0,018
6	0,564 ± 0,317	0,038 ± 0,015	0,098 ± 0,006	0,078 ± 0,009
8	0,813 ± 0,272	0,055 ± 0,050	0,712 ± 0,254	0,549 ± 0,358
12	0,603 ± 0,211	0,337 ± 0,067	0,520 ± 0,173	0,248 ± 0,089
24	0,245 ± 0,009	0,279 ± 0,126	0,351 ± 0,009	0,196 ± 0,158
48	0,031 ± 0,015	0,057 ± 0,015	0,096 ± 0,018	0,080 ± 0,011
72	0,011 ± 0,001	0,023 ± 0,014	0,056 ± 0,009	0,038 ± 0,004
96	n/d	0,018 ± 0,006	0,026 ± 0,001	0,025 ± 0,001
120	n/d	0,010 ± 0,013	0,025 ± 0,001	0,024 ± 0,001

Tabla 7: Concentraciones de marbofloxacina en músculo (mg/g), por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en verano e invierno

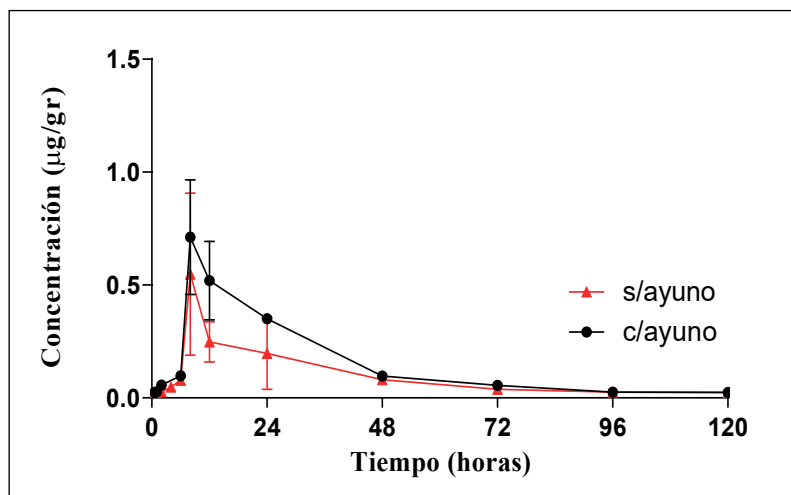


Figura 5: Concentraciones de marbofloxacin en músculo, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en invierno

La disposición en el tejido luego de la administración oral en verano presentó un comportamiento modificado por la presencia del alimento; así cuando se respeta un período de ayuno, la vida media de absorción es mucho más breve ($t_{1/2abs}$) mientras la $C_{m\acute{a}x}$ es más elevada y el $T_{m\acute{a}x}$ se obtiene antes; a la vez que se comprueba absorción más lenta en presencia de alimento, que produce una mayor permanencia ($t_{1/2\beta}$ y TMR), según refiere la tabla 8.

La tabla 9 y las figuras 6 y 7 indican los niveles obtenidos de marbofloxacin en la piel en ambas estaciones. La disposición exhibe niveles mayores del antimicrobiano que en músculo, pero no escapa a la influencia del alimento ni de la temperatura. Son apreciables las diferencias en las concentraciones alcanzadas y la mayor permanencia.

Parámetro	Verano		Invierno	
	c/alimento	c/ayuno	c/alimento	c/ayuno
$t_{1/2abs}$ (h)	5,22	2,36	7,85	7,13
$t_{1/2\beta}$ (h)	21,27	10,11	41,62	25,1
TMR (h)	33,6	17,7	50,3	36
$C_{m\acute{a}x}$ (µg/g)	0,3	0,8	0,5	0,7
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	12	8	8	8

Tabla 8: Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin en músculo.

Horas	Verano		Invierno	
	s/ayuno	c/ayuno	s/ayuno	c/ayuno
0.25	n/d	0,068 ± 0,001	n/d	n/d
0.5	0,026 ± 0,003	0,127 ± 0,086	n/d	0,024 ± 0,000
0.75	0,027 ± 0,000	0,247 ± 0,167	0,230 ± 0,000	0,025 ± 0,001
1	0,030 ± 0,004	1,240 ± 0,520	0,240 ± 0,000	0,028 ± 0,002
2	0,030 ± 0,002	1,515 ± 0,574	0,240 ± 0,001	0,038 ± 0,003
4	0,047 ± 0,008	1,744 ± 0,917	0,028 ± 0,002	1,060 ± 0,816
6	0,567 ± 0,333	1,783 ± 0,323	0,029 ± 0,001	1,390 ± 0,149
8	0,794 ± 0,509	2,294 ± 1,937	0,054 ± 0,008	0,668 ± 0,136
12	0,589 ± 0,514	0,817 ± 0,368	0,356 ± 0,134	0,383 ± 0,197
24	0,151 ± 0,073	0,578 ± 0,165	0,357 ± 0,240	0,292 ± 0,058
48	0,095 ± 0,023	0,388 ± 0,201	0,220 ± 0,173	0,176 ± 0,046
72	0,063 ± 0,010	0,157 ± 0,043	0,156 ± 0,031	0,087 ± 0,003
96	n/d	0,071 ± 0,000	0,117 ± 0,018	0,036 ± 0,007
120	n/d	0,062 ± 0,002	0,057 ± 0,013	0,031 ± 0,004

Tabla 9: Concentraciones de marbofloxacina en piel por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en verano e invierno. Referencias: (n/d): no detectable

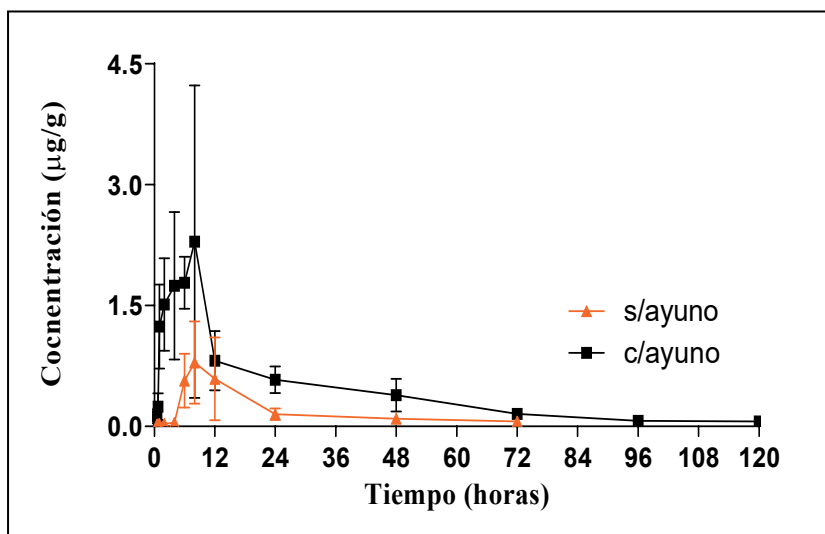


Figura 6: Concentraciones de marbofloxacina en piel, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en verano.

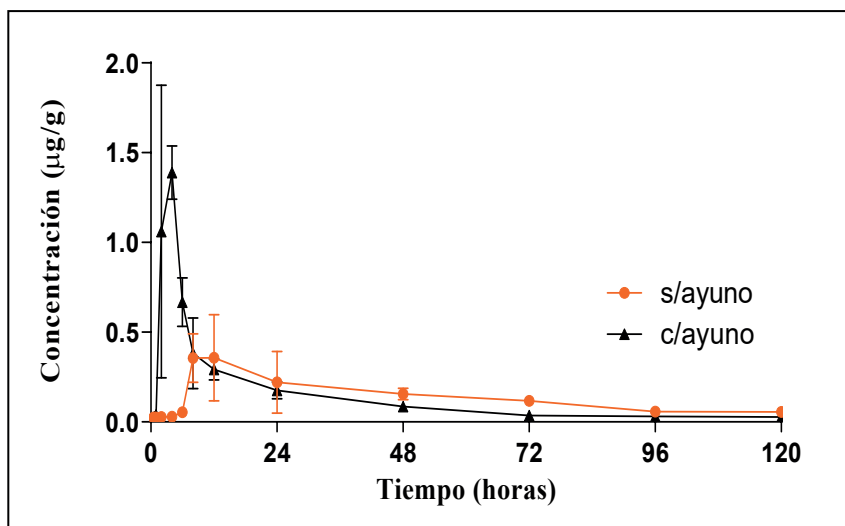


Figura 7: Concentraciones de marbofloxacin en piel, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en invierno.

Parámetro	Verano		Invierno	
	c/alimento	c/ayuno	c/alimento	c/ayuno
$t_{1/2abs}$ (h)	3,26	1,09	8,11	4,04
$t_{1/2\beta}$ (h)	38,04	27,02	44,67	34,78
TMR (h)	43,6	34,3	67,8	39,6
$C_{m\acute{a}x}$ (µg/g)	0,8	2,3	0,4	1
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	8	8	12	4

Tabla 10: Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin en músculo.

El período de resguardo calculado para piel y músculo en cada estación, tomando como referencia un Límite Máximo de Residuos de 30 µg/kg, se indica en la tabla 11.

	Músculo Verano		Músculo Invierno		Músculo Verano		Músculo Invierno	
	Ayuno	s/Ayuno	Ayuno	s/Ayuno	Ayuno	s/Ayuno	Ayuno	s/Ayuno
Días	3,40	4,96	5,55	7,39	7,67	11,91	5,99	13,8
UTA	64,73	94,43	67,15	89,41	146,03	226,76	72,47	166,98

Tabla 11: Cálculo del período de retiro, expresado en días o UTA

Enrofloxacin

El objetivo del estudio fue determinar los niveles de enrofloxacin en plasma, músculo, piel e hígado de truchas Arco iris tras la administración por vía oral y en baños de inmersión con diferentes dosis y tiempo de exposición y establecer el periodo de resguardo.

La metodología analítica utilizada fue por HPLC con detector de fluorescencia con longitudes de onda de emisión 218 nm y excitación de 477 nm. En el proceso de extracción del analito en las diferentes matrices estudiadas (plasma, piel, músculo, e hígado) se utilizaron reactivos como el ácido tricloroacético y metanol, posteriormente fueron centrifugadas para la obtención del sobrenadante para inyectar en el HPLC.

Se establecieron límites de detección y cuantificación para enrofloxacin en las diferentes matrices $\leq 0,03$ y $\leq 0,07$ $\mu\text{g/ml}$ o g, respectivamente. Los ensayos de precisión registraron coeficientes de variación $\leq 2,49\%$ y el porcentaje de recuperabilidad fue $\leq 99,2\%$, valores que reflejan que la metodología analítica aplicada fue sencilla, eficiente, y confiable, para establecer concentraciones de enrofloxacin en las matrices estudiadas.

El estudio cinético poblacional de enrofloxacin en trucha Arco iris se concretó en un criadero comercial ubicado en Las Tapias, provincia de Córdoba utilizando truchas de 190 ± 25 g de peso distribuidas en lote A que recibieron una dosis oral de 10 mg/kg de enrofloxacin, lote B una dosis en el agua de 20 mg/L/2,5 horas y el lote C una dosis de 100 mg/L/0,5 horas. Los niveles determinados en cada matriz posterior a la aplicación según se muestran en las figuras 1, 2 y 3.

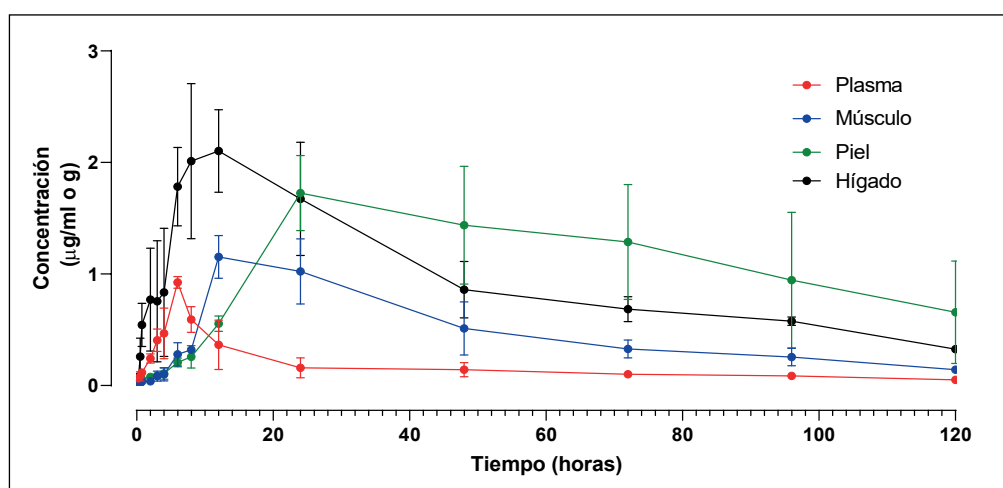


Figura 1: Concentraciones vs tiempo de enrofloxacin en plasma y tejidos en trucha Arco iris, posterior a una dosis oral de 10 mg/kg (Lote A).

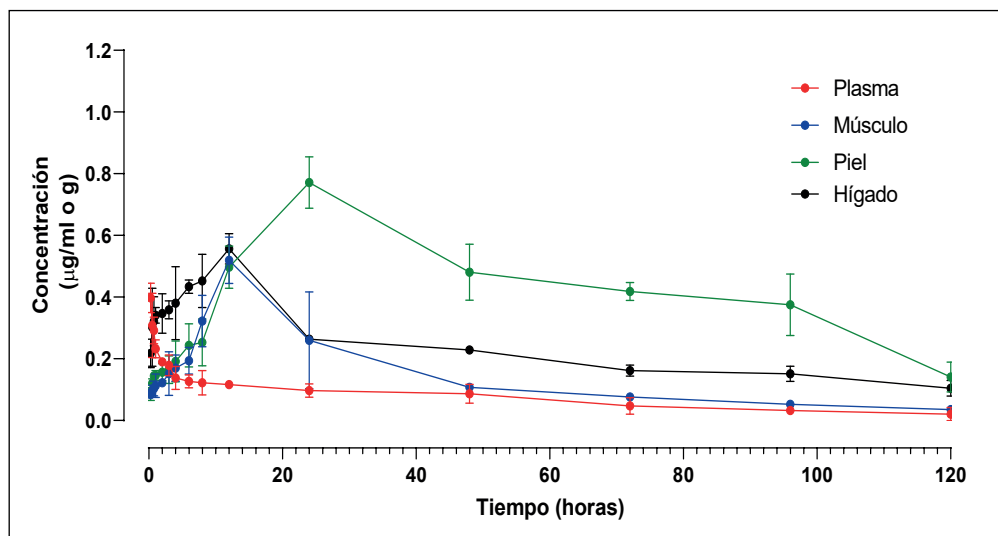


Figura 2: Concentraciones vs tiempo de enrofloxacina en plasma y tejidos en trucha, posterior a una dosis en el agua de 20 mg/L/2,5 horas (Lote B).

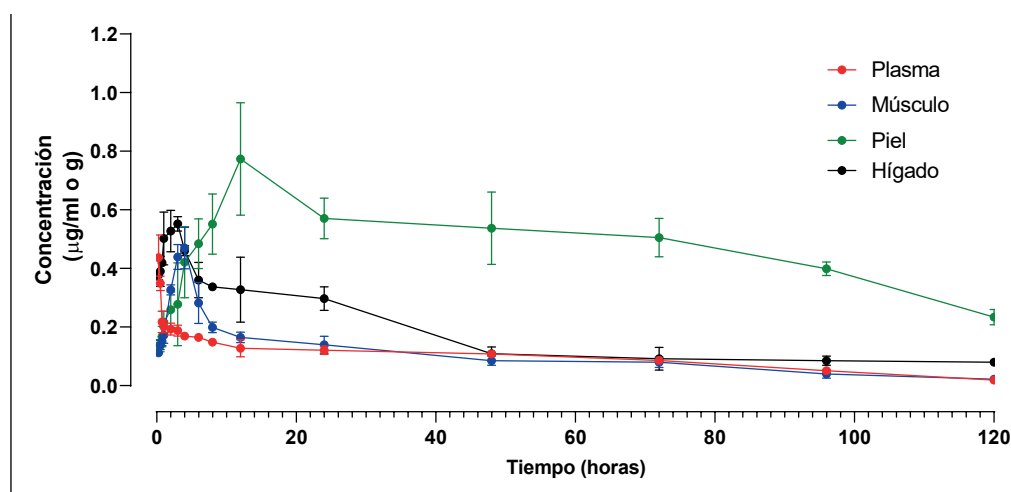


Figura 3: Concentraciones vs tiempo de enrofloxacina en plasma y tejidos en trucha, posterior a una dosis en el agua de 100 mg/L/0,5 horas (Lote C).

Es importante destacar que en plasma y en todos los tejidos estudiados el fármaco es cuantificado hasta las 120 horas post-aplicación, aunque por vía oral se establecieron los mayores niveles de enrofloxacina en relación a los baños de inmersión. La persistencia de enrofloxacina en trucha Arco iris es prolongada respecto los antecedentes en aves y mamíferos. Por vía oral, los niveles más elevados se consiguieron en piel y en hígado, mientras que por baños de inmersión los niveles más significativos se hallaron en la piel.

Los parámetros cinéticos de enrofloxacina en plasma y tejidos, según el modo de aplicación (lotes A, B o C) se describen en las tablas 1 (plasma), 2 (músculo) y 3 (piel).

Parámetro	Lote A	Lote B	Lote C
C _{máx} (µg/ml)	0,90	0,40	0,44
T _{máx} (h)	6,00	0,25	0,25
t _{1/2abs} (h)	2,17	0,21	0,10
t _{1/2α} (h)	2,93	-	-
t _{1/2β} (h)	42,98	42,77	44,67
ABCárea (µg-h/ml)	21,80	9,83	12,23
TMR (h)	54,50	59,00	58,10

Tabla 1: Parámetros cinéticos plasmáticos de enrofloxacin en trucha Arco iris según el modo de aplicación oral (lote A), baño de inmersión de larga (lote B) y corta duración (lote C).

En plasma, los comportamientos farmacocinéticos de enrofloxacin difieren según el modo de aplicación; por vía oral provee una C_{máx} de 0,9 µg/ml establecida a las 6 horas (T_{máx}), mientras que, por baños de inmersión independiente de la dosis la C_{máx} fue para ambos de 0,4 µg/ml obtenida a las 0,25 horas. La absorción es más pronta por aplicación en baños, las cuales presentaron una semivida de absorción ≤0,2 horas, mientras que por vía oral fue de 2,1 horas.

Las altas concentraciones de enrofloxacin registradas en los peces con aplicación oral, coinciden con las ABCárea establecidas. La eliminación del fármaco es prolongada e independiente de la vía de aplicación; se determinó una semivida de eliminación 59 horas por la aplicación oral y para baños de inmersión de 44,67 horas.

Parámetro	Lote A	Lote B	Lote C
C _{máx} (µg/g)	1,15	0,51	0,50
T _{máx} (h)	12,00	12,00	4,00
t _{1/2 ing} (h)	4,87	3,20	1,02
t _{1/2β} (h)	39,97	29,79	30,69
ABCárea (µg-h/ml)	65,70	18,50	12,90
TMR (h)	60,30	46,10	48,10

Tabla 2: Parámetros cinéticos musculares de enrofloxacin en trucha Arco iris según modo de aplicación: oral (lote A), baño de inmersión de larga (lote B) y corta duración (lote C).

En el tejido muscular, luego de la dosis oral se determinó una C_{máx} de 1,1 µg/g, mayor a la observada por baños de inmersión de 0,5 µg/g. La aplicación oral brindó un ABCárea superior al de baños de inmersión, aunque las semividas de eliminación en todos los casos exceden las 29 horas y el TMR se ubica entre 46 a 60 horas.

En piel, como podemos observar en la tabla 3, continúa la tendencia que por vía oral se logre la mayor C_{máx} de 1,73 µg/g, y por baños de inmersión solo es de 0,77 µg/g, con un ingreso lento acorde con los valores hallados en todos los lotes de semivida de ingreso ≤ 7,8 horas. Además, registraron un elevado ABCárea en comparación a los

otros tejidos evaluados. La eliminación es lenta, con una semivida de eliminación de los lotes A, B y C fue de 71,8, 45,4 y 60,8 horas, respectivamente.

Parámetros	Lote A	Lote B	Lote C
C _{máx} (µg/g)	1,73	0,77	0,77
T _{máx} (h)	24,00	24,00	12,00
t _{1/2ing} (h)	7,85	7,25	6,17
t _{1/2β} (h)	71,88	45,45	60,84
ABCárea (µg-h/ml)	191,00	61,40	87,20
TMR (h)	104,4	62,4	81,25

Tabla 3: Parámetros cinéticos en piel de enrofloxacin en trucha arco iris según el modo de aplicación oral (lote A), baño de inmersión de larga (lote B) y corta duración (lote C).

Parámetros	Lote A	Lote B	Lote C
C _{máx} (µg/g)	2,10	0,60	0,60
T _{máx} (h)	12,00	12,00	3,00
t _{1/2ing} (h)	2,68	2,36	1,48
t _{1/2β} (h)	45,38	49,98	41,65
ABCárea (µg-h/ml)	134,9	35,40	26,60
TMR (h)	64,00	69,70	60,10

Tabla 4: Parámetros cinéticos hepáticos de enrofloxacin en trucha Arco iris según el modo de aplicación oral (lote A), baño de inmersión de larga (lote B) y corta duración (lote C).

Por la vía oral en el hígado se consigue la C_{máx} de 2,1 µg/g, la cual coincide que las mayores concentraciones de los peces del lote A en el tejido hepático, es tardío ya que se registra a las 12 horas, mientras que en los peces que se les administró el fármaco en el baño, independiente de la forma consiguen una C_{máx} de 0,6 µg/g, aunque presentan diferentes T_{máx} en baños de larga duración es a las 12 horas, mientras que los de corta duración es de 3 horas, lo que implica variaciones según el modo de aplicación.

En los peces del lote A se encontró un ABCárea muy superior al registrado por los del lote B y C, y pesar de aquellas diferencias la semivida de eliminación es ≤ 49,9 horas, similar en todos los lotes, independiente de la vía de administración.

Los periodos de carencia estimados son correlativos con las semividas de eliminación, al ser prolongadas estos también se extienden como podemos observar en la tabla 5, el LMR utilizado fue de 100 µg/kg.

	Periodo de carencia (días)		
Tejido	Lote A	Lote B	Lote C
Músculo	22	14	15
Piel	33	20	27
Hígado	25	26	20

Tabla 5: Periodo de carencia de enrofloxacin en músculo, piel e hígado, según el modo de aplicación, lote A (oral de 10 mg/kg), lote B (baño de 20 mg/L/2,5 h) y el lote C (baño de 100 mg/L/0,5 h).

Según la dosis/modo de aplicación se modifican los periodos de carencia del fármaco, para una dosis única oral de 10 mg/kg de enrofloxacin se estimó un periodo de carencia de 33 días, para los baños de inmersión de 20 mg/L/2,5 horas fue de 26 días y mientras con la exposición al baño de inmersión de 100 mg/L/0,5 fue de 27 días, estos datos reflejan que para garantizar la inocuidad de los alimentos provenientes de truchas Arco iris medicada con enrofloxacin se requieren extensos periodos de carencia.

Levofloxacin

Los estudios de disposici3n fueron realizados por las vías oral, intraperitoneal y endovenosa a 17,6 °C de temperatura del agua, con los objetivos de establecer el perfil de disposici3n del antimicrobiano en plasma y tejidos comestibles por distintas vías de aplicaci3n y establecer un periodo de resguardo.

La metodologí analítica utilizada fue por HPLC con detector de fluorescencia con longitudes de onda de emisi3n 300 nm y excitaci3n de 500 nm, mediante eluci3n isocrática.

El ensayo preparativo para cuantificar levofloxacin consistió en suero adicionado con buffer fosfato, diclorometano y enrofloxacin como estándar interno. La muestra se agitó en vórtex, se centrifugó y posteriormente se eliminó la capa fase orgánica, el resto fue transferido y filtrado para luego ser evaporado a sequedad en baño térmico con flujo de nitr3geno. El residuo seco fue resuspendido con fase móvil y se inyectó en el HPLC.

Las concentraciones tisulares (músculo y piel) establecidas se registran en las figuras 1 y 2, mientras que los parámetros cinéticos plasmáticos y tisulares según la vía de administraci3n se describen en las tablas 1, 2 y 3.

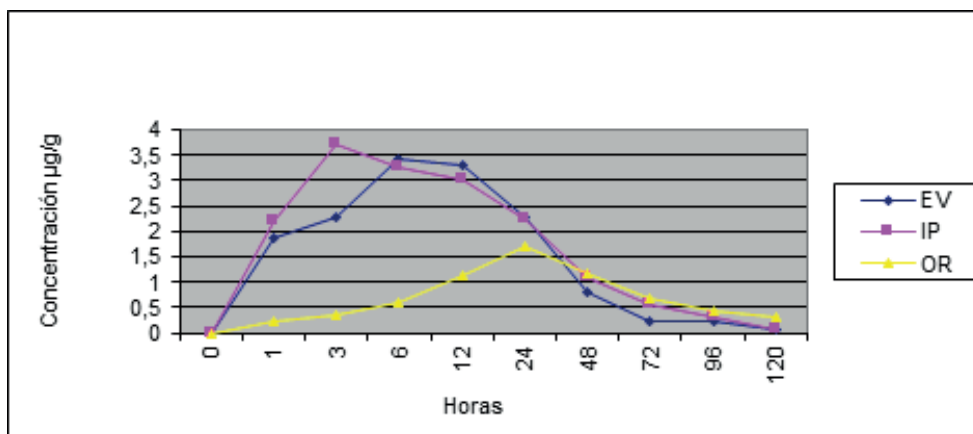


Figura 1: Curvas concentración - tiempo de levofloxacin en músculo de trucha Arco iris para las vías endovenosa (EV), intraperitoneal (IP) y oral (O).

Parámetro	EV	IP	Oral
$t_{1/2\beta}$ (h)	34,66	33,57	96,57
Cmáx (µg/mL)	22,48	16,7	2,7
Tmáx (h)	-	1,0	3,0
TMR (h)	34,4	34,6	131,4
F (%)		74	62
Vdárea (L/kg)	1,2	1,1	1,3
Pr grados días / días (99% de la media)	473/26,8		

Tabla 1: Parámetros cinéticos de levofloxacin en plasma en trucha Arco iris para las vías endovenosa (EV), intraperitoneal (IP) y oral (O).

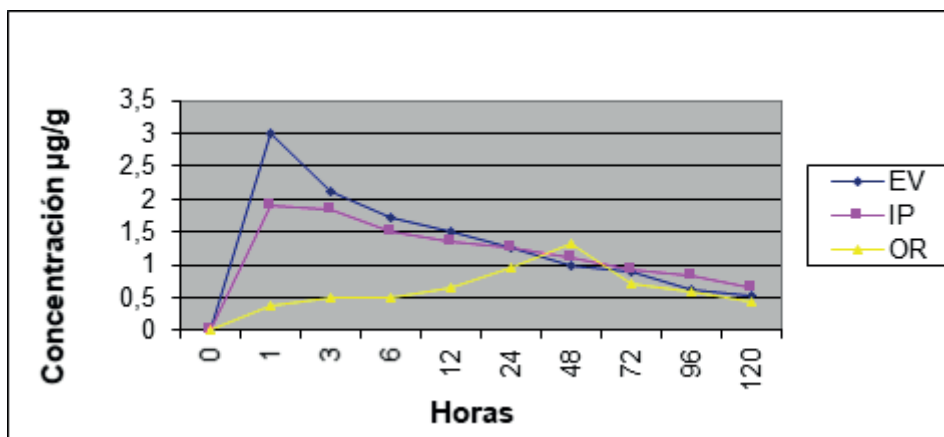


Figura 2: Curvas concentración - tiempo de levofloxacin en piel de trucha Arco iris tras la administración endovenosa (EV), intraperitoneal (IP) y oral (O).

Parámetros	EV	IP	O
t _{1/2} β (h)	19,4	22,16	38,4
C _{máx} (μg/mL)	3,4	3,7	1,7
T _{máx} (h)	6,0	3,0	24,0
TMR (h)	28,7	3,2	65,7
Pr grados días / días (99% de la media)	350/19,88		

Tabla 2: Parámetros cinéticos de levofloxacina en músculo de trucha Arco iris para las vías endovenosa (EV), intraperitoneal (IP) y oral (O).

Parámetro	EV	IP	O
t _{1/2} pt (h)	1,73	0,41	15,10
t _{1/2} β (h)	64,84	93,56	48,32
C _{máx} (μg/mL)	3	1,9	1,3
T _{máx} (h)	1,0	1,0	48,0
TMR (h)	96,4	135,6	88,0
Pr Grados días / días (99% de la media)	535/30,39		

Tabla 3: Parámetros cinéticos de levofloxacina en piel de trucha Arco iris para las vías endovenosa (EV), intraperitoneal (IP) y oral (O).

Bibliografía consultada

- Aladjadjian, A. (Ed.). (2011). Food production: approaches, challenges and tasks. Rijeka, Croatia: InTech.
- Baynes, R.E y Riviere, J.E. (Eds.). (2014). Strategies for reducing drug and chemical residues in food animals: international approaches to residue avoidance, management, and testing. New Jersey. USA: John Wiley & Sons.
- Baynes, R.E y Riviere, J.E. (2014). «Importance of veterinary drug residues» En: Baynes, R.E y Riviere, J.E (Eds.). Strategies for Reducing Drug and Chemical Residues in Food Animals. (pp. 1-8). New Jersey. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Beyene, T. (2016). «Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health ». Journal of veterinary science and technology, 7: 1-7.
- Botsoglou, N. y Fletouris D. (Eds.). (2001). Drug residues in foods, Pharmacology, Food Safety, and Analysis. New York. USA: Marcel Dekker, Inc.
- Böttcher, S. Baum, H. Hoppe-Tychy, T. y Benz, C. (2001). An HPLC assay and microbiological assay to determine levofloxacin in soft tissue, bone, bile and serum. Journal Pharmacology Biomedical Anals, 25: 197-203.
- De Backer, P. (2006). Comparative pharmacokinetics in avian species. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics. 29, Suppl. 1: 239-301
- Farrier, D.S. (1999). PK Solutions 2.0, Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis. Summit Research Services. Ashland, USA.
- Gama Macedo Pinto, M. (2011). Segurança alimentar - Resíduos químicos ovo - alimento seguro? (tesis de maestría). Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Girardi, C. y Odore, R. (2008). Pharmacological treatments and risks for the food chain. Veterinary Research Communications. 32, (suppl. 1): 11-18.
- Gouvêa, R F., Dos Santos, F. y De Aquino, M. (2015). Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a review. Revista Brasileira de Ciência Avícola. 17, 1: 1-10.
- Haritova, A. y Lashev, L. (2009). Comparison of the pharmacokinetics of seven fluoroquinolones in mammalian and bird species using allometric analysis. Bulgarian Journal Veterinary Medicine.12, 1: 3-24.
- Hekman, P. (1996). WT1.4 Withdrawal time calculation program. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), London, UK.
- Landoni, M. F. y Albarelllos, G. (2015). The use of antimicrobial agents in broiler chickens. The Veterinary Journal. 205, 1: 21-27.
- Lees, P. y Toutain, P.L. (2012). The role of pharmacokinetics in veterinary drug residues. Drug Testing and Analysis. 4: 34-39.
- Lehotay, S. y Mastovská, K. (2005). «Detecting veterinary drug residues in feed and cattle». Improving the safety of fresh meat (pp.1-10) en Sofos, J. (Ed). Londres, Inglaterra: Woodhead Publishing Limited Cambridge.
- Lozano, M. y Arias, D. (2008). Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. Revista Colombiana Cs Pecuarias. 21: 121-135.

- Lozano, M. y Trujillo, M. (2012). «Chemical residues in animal food products: an issue of public health» en Maddock, J. (Ed.). *Public Health-Methodology, Environmental and Systems Issues* (pp.166-184). Bogota. Colombia: Intech.
- Márquez Lara, D. (2008). Residuos químicos en alimentos de origen animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 9,1: 124-135.
- Mason, S. (2011). «Tissue residues and withdrawal times» en Riviere, (Ed.). *Comparative Pharmacokinetics Principles, Techniques, and Applications* (pp.413-425). New Jersey, USA: Wiley & Sons, Inc.
- Modi, C.H., Patel. S. and Mody, S. (2013). Animal husbandry practice to contaminants and residues of chemical in animal origin foods and health hazard. *International Journal of Molecular Veterinary Research*. 3, 10: 55-61.
- Modric S (2014). «Pharmacokinetic Principles for Understanding Drug Depletion as a Basis for Determination of Withdrawal Periods for Animal Drugs», en: Baynes, R.E y Riviere, J.E (Eds.). *Strategies for Reducing Drug and Chemical Residues in Food Animals*. (pp. 9-34). New Jersey. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Motarjemi Nyon, Y. y Lelieveld, S. (Eds.). (2014). *Food safety management: a practical guide for the food industry*. Londres, UK: Academic Press.
- Mund, M. D., Khan, U. H., Tahir, U., Mustafa, B. E., y Fayyaz, A. (2017). Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. *International Journal of Food Properties*, 20, 7: 1433-1446.
- Rao, G. y Malik, K. (2006). «Drug residues in poultry products - monitoring for safety and quality assurance». En Sasidhar, P. (Ed.). *National Seminar Poultry Research Priorities to 2020* (pp. 211-217). Izatnagar, India.
- Reeves, P. (2010). «Drug Residues in Comparative and Veterinary Pharmacology», en Cunningham F. et al. (Eds.). *Handbook of Experimental Pharmacology* (pp. 265-290). Berlin, Alemania: Springer-Verlag.
- Reig, M. y Toldrá F. (2009). «Veterinary Drug Residues», en Nollet, L y Toldrá, F. (Eds.). *Handbook of processed meats and poultry* (pp. 647-665) London- New York: CRC Press
- Riviere, E. J. (2018). «Pharmacokinetics», en Riviere, J. and Papich, M. (Eds.). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (pp. 41-61). Iowa, USA: Willey-Blackwell.
- Riviere, J. (Ed.). (2011). *Comparative pharmacokinetics: principles, techniques and applications*. Iowa. USA: John Wiley & Sons.
- Riviere, J. (2018). «Chemical residues in tissues of food animals», en Riviere, J. y Papich, M. (Eds.). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (1269-1480). New York, USA: John Wiley & Sons.
- 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* (pp. 1459-1465). Iowa, USA: Willey-Blackwell.
- Sanders, P., Henri, A. y Laurentie, M. (2016). Tools to evaluate pharmacokinetics data for establishing maximum residue limits for approved veterinary drugs: examples from JECFA's work. *Drug Testing and Analysis*. 8: 565-571.
- Schrenk, D. y Cartus, A. (Eds.). (2017). *Chemical contaminants and residues in food*. Londres, UK: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition

- Toutain, J.P. (2018) «Mechanism of drug action and pharmacokinetics/ pharmacodynamics integration in dosage regimen: optimization for Veterinary Medicine» en Riviere, J. y Papich, M. (Eds.). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (pp. 65-71). Iowa, USA: Willey-Blackwell.
- Woodward, K. (2008). Assessment of user safety, exposure and risk to veterinary medicinal products in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 50, 1: 114-128.
- World Health Organization (2009). Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. *Environmental Health Criteria*. WHO Press, Geneva, Switzerland.
- Yan, D. (2014). Evaluation of Drug Residue Depletion in the Edible Products of Food Producing Animals for Establishing Withdrawal Periods and Milk Discard Times, En: Baynes, R.E y Riviere, J.E (Eds.). *Strategies for Reducing Drug and Chemical Residues in Food Animals*. (pp. 35-47). New Jersey. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Sobre los autores

Dr. Carlos ERRECALDE

Profesor Titular, Farmacología, Facultad de Agronomía y Veterinaria,
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

M Sc. Guillermo PRIETO

Profesor Asociado, Farmacología, Facultad de Agronomía y Veterinaria,
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Dra. Natalia URZÚA

Becaria Posdoctoral, Farmacología, Facultad de Agronomía y Veterinaria,
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Dr. Carlos LUDERS

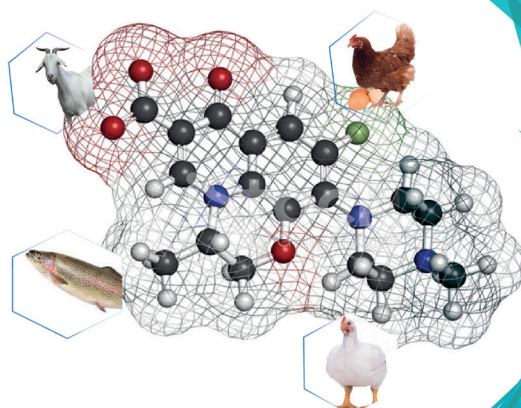
Profesor Asociado, Farmacología, Facultad de Recursos Naturales,
Universidad de Temuco, Chile

M Sc. Rosendo LIBOA

Profesor Asociado, Bromatología, Facultad Agronomía y Veterinaria,
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Residuos de fluoroquinolonas en animales domésticos

Carlos Errecalde, Guillermo Prieto, Natalia Urzúa,
Carlos Lüders y Rosendo Liboa



Los residuos de fármacos en animales destinados al consumo humano, en este caso fluoroquinolonas de uso veterinario, producen alimentos de baja calidad, algunos relacionados con eventos indeseables como la manifestación creciente de resistencia bacteriana como sucede con cepas de *Escherichia coli* o de *Campilobacter yeyuni*. Considerando que los niveles residuales de los fármacos se relacionan directamente con las etapas que influyen en la disposición de los mismos, es clara la necesidad realizar de estudios cinéticos de fluoroquinolonas con el propósito de estimar un periodo de resguardo necesario para proteger al consumidor de alimentos. Esta publicación comprende diferentes experiencias realizadas en animales de producción con este propósito, utilizando fluoroquinolonas de uso veterinario, financiadas por organismos oficiales y desarrolladas por el grupo de trabajo del Laboratorio de Farmacología de Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Ministerio de
**CIENCIA
Y TECNOLOGÍA**

 GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE
CÓRDOBA  **ENTRE
TODOS**

 **FAV
UNRC**
 **INTA**
Instituto Nacional
de Tecnología Agropecuaria
PROTRI 

ISBN 978-987-688-511-9



9 789876 885119

UniRío
editora



**Universidad Nacional
de Río Cuarto**