

**Prieto, Guillermo Fermín**

## **Disposición plasmática-tisular de marbofloxacina en trucha arco iris (*oncorhynchus mykiss*) en condiciones estivales e invernales**

---

**Tesis para la obtención del título de posgrado de  
Doctor en Ciencias Agropecuarias**

Director: Errecalde, Carlos Alberto

Co-director: Mancini, Miguel Alberto

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



Universidad Católica de Córdoba

Doctorado en Ciencias Agropecuarias

DISPOSICIÓN PLASMÁTICA-TISULAR DE MARBOFLOXACINA EN  
TRUCHA ARCO IRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) EN CONDICIONES  
ESTIVALES E INVERNALES

Guillermo Fermín Prieto

TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE POSGRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Córdoba

20 de Diciembre de 2020

Universidad Católica de Córdoba

Doctorado en Ciencias Agropecuarias

DISPOSICIÓN PLASMÁTICA-TISULAR DE MARBOFLOXACINA EN  
TRUCHA ARCO IRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) EN CONDICIONES  
ESTIVALES E INVERNALES

Guillermo Fermín Prieto

Director

Carlos Alberto Errecalde

Co-Director

Miguel Alberto Mancini

Jurados

Dra. Marcela Rebuelto

Dr. Eduardo Eliseo Baroni

Dr. Eduardo Jesús Picco

## DEDICATORIA

A mi señora e hijo por todo el apoyo brindado, durante el desarrollo de este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Repito las palabras de un gran amigo, el Dr. Juan Carlos Boggio, ...“las dedicatorias pueden ser un problema si alguien queda en el tintero”...

Todos aportaron lo suyo para que esto se concretara.

A los Doctores Carlos Errecalde y Miguel Mancini, que más que directores son dos grandes amigos, por todas sus enseñanzas.

A los miembros del Jurado de Evaluación, Dra. Marcela Rebuelto y Dres. Eduardo Baroni y Eduardo Picco.

A la Doctora Natalia Urzúa Pizarro (Naty), por su inmensa colaboración en las tareas de laboratorio y por sus consejos.

A Sergio Salas propietario del Establecimiento Boca de Río que nos apoyó en todo momento.

A las Dras. Georgina Díaz Napal, Edith Taleisnik, Claudia Rodriguez y en su nombre a las Universidades Católica de Córdoba y Nacional de Río Cuarto.

Al Dr. Carlos Luders, quien desde Chile estuvo siempre a la hora de solucionar problemas técnicos.

A la Dra. Patricia Bertone, MV Víctor Salinas y MS Jimena Messina.

ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
SUMMARY	xiii

## ÍNDICE GENERAL

Título	Página
CAPITULO I. INTRODUCCION	1
1.1 Pesca y acuicultura, aspectos generales	2
1.2 Trucha arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	5
1.3 Antimicrobianos en piscicultura	6
1.4 Hipótesis	9
1.5 Objetivos	9
1.5.1 General	9
1.5.2 Específicos	9
CAPITULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Terapéutica antimicrobiana	12
2.1.1 Farmacodinamia	13
2.1.2 Farmacocinética	14
2.1.2.1 Absorción	14
2.1.2.2 Distribución	16
2.1.2.3 Metabolismo y Excreción	17

2.1.3 Integración farmacocinética - farmacodinamia (PK/PD)	18
2.2 Regulación de fármacos de uso veterinario	19
2.2.1 Valoración de riesgos	19
2.2.2 Residuos, implicancias, definiciones	20
2.2.3 Aspectos regulatorios, organismos de control nacionales e internacionales	22
2.3 Fluoroquinolonas	25
2.3.1 Relación estructura-actividad	28
2.3.2 Mecanismo de acción	29
2.3.3 Resistencia bacteriana	30
2.3.4 Perfil toxicológico	31
2.3.5 Características generales de marbofloxacina	32
2.3.6 Antecedentes de fluoroquinolonas en piscicultura	35
2.3.7. Vías de administración de antimicrobianos en acuicultura	40
CAPITULO III. MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1 Características del establecimiento y acondicionamiento del lugar de trabajo	44
3.2 Alimentación de los peces	46
3.3 Procedimientos de trabajo comunes para invierno y verano	46
3.4 Aspectos éticos en la obtención de muestras	48
3.5 Registro de peso y longitud de los lotes de invierno y verano	49
3.6 Condiciones de pH, temperatura y oxígeno disuelto en el agua	49
3.7 Soluciones	50
3.8 Equipos y Material de Laboratorio	50
3.9 Software	51

3.10 Tratamiento de muestras	51
3.11 Muestras para las curvas de calibración y recuperabilidad	52
3.12 Procedimiento de separación y cuantificación	52
3.13 Validación del método analítico	52
3.14 Cálculo de las concentraciones en plasma, músculo y piel	54
3.15 Análisis farmacocinético	55
3.16 Integración farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD)	55
3.17 Cálculo del período de resguardo	56
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS</b>	<b>57</b>
4.1 Estado Sanitario y administración de medicamentos	58
4.2 Administración de marbofloxacin, registro de peso y longitud, resultados de la anestesia	58
4.3 Peso de los lotes de invierno y verano	58
4.4 Tasa de recambio	58
4.5 Características del agua	59
4.6 Factor de condición de Fulton (K)	60
4.7 Validación de la técnica	61
4.8 Recuperabilidad y precisión en las distintas matrices	61
4.9 Límites de detección y cuantificación	61
4.10 Resultados de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía EV, en verano e invierno	62
4.11 Resultados de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía oral con y sin ayuno, en verano e invierno	64
4.12 Resultados de las concentraciones en músculo por vía oral con y sin ayuno, en verano e invierno	67
4.13 Resultados de las concentraciones en piel por vía oral con y sin ayuno, en verano e invierno	68



4.14 Parámetros farmacocinéticos 0-120 horas, para músculo y piel en verano e invierno	70
4.15 Integración farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD)	72
4.16 Período de Resguardo	74
CAPITULO V. DISCUSIÓN	75
5.1 Registro de peso, longitud, administración de marbofloxacina y resultado de la anestesia	76
5.2 Características del agua	76
5.3 Índice de Fulton (K)	78
5.4 Diseño experimental	79
5.5 Cinética por aplicación intravenosa	82
5.6 Cinética plasmática por vía oral	84
5.7 Cinética en músculo	88
5.8 Cinética en piel	89
5.9 Integración farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD)	92
5.10 Período de resguardo	93
5.10.1 Músculo	94
5.10.2 Piel	95
CAPITULO VI. CONCLUSIONES	97
CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Límite máximo de residuos para quinolonas en acuicultura, según país	24
2	Peso ( $\pm$ D.E.) y número de peces por lote (n), según estación	58
3	Valores de temperatura, pH y oxígeno disuelto en agua en invierno	59
4	Valores de temperatura, pH y oxígeno disuelto en agua en verano	59
5	Resultados test de condición de Fulton verano	60
6	Resultados test de condición de Fulton invierno	60
7	Ensayos de linealidad en plasma, músculo y piel.	61
8	Recuperabilidad y precisión de marbofloxacina en plasma, músculo y piel	61
9	Límites de Detección (LD) y de Cuantificación (LQ) en plasma, músculo y piel	62
10	Concentraciones plasmáticas de marbofloxacina por vía EV (2 mg/kg), en verano e invierno	62
11	Parámetros farmacocinéticos en plasma para marbofloxacina por vía EV (2 mg/kg), en verano e invierno	63
12	Concentraciones plasmáticas de marbofloxacina por vía oral (2 mg/kg), en verano e invierno, con y sin ayuno	64
13	Parámetros farmacocinéticos en plasma para marbofloxacina por vía oral (2 mg/kg), en verano e invierno.	66
14	Concentraciones de marbofloxacina en músculo, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en verano e invierno..	67
15	Concentraciones de marbofloxacina en piel, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en verano e invierno	69
16	Parámetros farmacocinéticos en músculo para marbofloxacina por vía oral (2 mg/kg), en verano e invierno	71

17	Parámetros farmacocinéticos en piel para marbofloxacin por vía oral (2 mg/kg), en verano e invierno	71
18	Índice ABC/CIM de marbofloxacin, luego de la administración intravenosa (EV) y oral con y sin ayuno previo (2 mg/kg) en verano en plasma.	72
19	Índice ABC/CIM de marbofloxacin, luego de la administración intravenosa (EV) y oral con y sin ayuno previo (2 mg/kg) en invierno en plasma	72
20	Índices CIM/Cmáx de marbofloxacin, después de la administración intravenosa (EV) y oral con y sin ayuno previo (2 mg/kg) en verano en plasma	73
21	Índices CIM/Cmáx de marbofloxacin, después de la administración intravenosa (EV) y oral con y sin ayuno previo (2 mg/kg) en invierno en plasma	73
22	Período de resguardo para marbofloxacin en músculo, en verano e invierno	74
23	Período de resguardo para marbofloxacin en piel, en verano e invierno	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Consumo de pescado en relación a la proyección del aumento de población mundial	3
2	Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura en el periodo 1950-2016	3
3	Producción acumulada en acuicultura en el periodo 1996-2015	4
4	Producción por acuicultura en Argentina en el año 2016	5
5	Clasificación taxonómica de la trucha arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	5
6	Relación antimicrobiano, bacteria y huésped	6
7	Representación gráfica de los parámetros cinéticos $C_{máx}$ , $T_{máx}$ y ABC	15
8	EMEA y organismos de interacción	25
9	Estructura general del anillo de las fluoroquinolonas	25
10	Generaciones de fluoroquinolonas	27
11	Efectos de las sustituciones en las fluoroquinolonas	28
12	Estructura química de marbofloxacina y la influencia de las sustituciones	33
13	Ubicación geográfica del establecimiento Boca de Río	44
14	Establecimiento Boca de Río	45
15	Estanque de trabajo y disposición de separadores	45
16	Esquema del flujo de trabajo	46
17	Lugares de extracción de muestras: músculo, piel y sangre	48
18	Medición de longitud total en truchas	49

19	Concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía EV (2 mg/kg), en verano e invierno	63
20	Concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía oral (2 mg/kg), en invierno	65
21	Concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía oral (2 mg/kg), en verano	65
22	Concentraciones de marbofloxacin en músculo, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en invierno	68
23	Concentraciones de marbofloxacin en músculo, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en verano	68
24	Concentraciones de marbofloxacin en piel, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en invierno	70
25	Concentraciones de marbofloxacin en piel, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en verano	70

## RESUMEN

Marbofloxacin es una fluoroquinolona de uso exclusivo en Medicina Veterinaria, indicada para especies mayores y menores. Sus características farmacocinéticas permiten la administración por distintas vías, con buena biodisponibilidad, distribución tisular y prolongada permanencia en el organismo. Los peces al ser poiquiloterms tienen una temperatura corporal que no difiere sustancialmente de la del entorno, siendo un factor fundamental dentro de la fisiología, ya que las variaciones térmicas modifican el metabolismo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de la temperatura en el comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Se trabajó en verano e invierno, con tres grupos de peces en cada temporada por vía endovenosa (n=39), oral sin ayuno (n=42) y oral con ayuno previo (n=42), administrando una dosis única de 2 mg/kg de marbofloxacin. Se tomaron muestras de plasma, músculo y piel en diferentes tiempos: de 0,08 a 72 horas (endovenosa) y 0,25 a 120 horas (oral), que tras el tratamiento correspondiente, se eluyeron por HPLC con detección por fluorescencia. Las concentraciones plasmáticas, de músculo y piel se analizaron con el programa PK Solution 2.0 y el plazo de espera se calculó mediante el programa WT 1.4. El perfil cinético se corresponde con lo descrito para el conjunto de las fluoroquinolonas en diferentes especies domésticas. Por vía endovenosa se observan niveles detectables hasta las 24 horas en ambas temporadas. Mientras que por administración oral, las concentraciones en verano son más elevadas que en invierno, con o sin ayuno previo y detectables hasta las 72 horas. Las concentraciones en músculo y piel, son detectables hasta las 120 horas y superiores a las plasmáticas. De acuerdo a los resultados, el perfil cinético de marbofloxacin en *O. mykiss* es afectada por la temperatura del medio, independiente de presentar ayuno previo o no para la aplicación oral. La dosis utilizada es claramente insuficiente para asegurar eficacia terapéutica, debiéndose considerar un ajuste posológico. Considerando que la trucha arco iris se comercializa con piel, para el cálculo del plazo de espera se tomó como base este tejido, donde es mayor la permanencia, resultando 11,9 días (227 grados/día) para verano y 13,8 días (167 grados/día) para invierno.

Palabras claves: marbofloxacin, trucha arco iris, farmacocinética

## PLASMA-TISSUE DISPOSITION OF MARBOFLOXACIN IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) IN SUMMER AND WINTER CONDITIONS

### SUMMARY

Marbofloxacin is a fluoroquinolone for exclusive use in Veterinary Medicine, indicated for larger and smaller species. Its pharmacokinetic characteristics allow administration by different routes, with good bioavailability, tissue distribution and prolonged permanence in the body. Fish being poikilotherms have a body temperature that does not differ substantially from that of the environment, being a fundamental factor in physiology, since thermal variations modify metabolism. The objective of this work was to evaluate the influence of temperature on the pharmacokinetic behavior of marbofloxacin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Work was carried out in summer and winter, with three groups of fish in each season intravenously (n = 39), orally without fasting (n = 42) and orally with previous fasting (n = 42), administering 2 mg / kg single dose of of marbofloxacin. Plasma, muscle and skin samples were taken from 0.08 to 72 hours (intravenous) and 0.25 to 120 hours (oral), which after the corresponding treatment, were eluted by HPLC with fluorescence detection. Plasma, muscle and skin concentrations were analyzed with PK Solution 2.0 program and the withdrawal period was calculated using WT 1.4 software. The kinetic profile corresponds to that described for fluoroquinolones in different domestic species. Through intravenous route, detectable levels are observed up to 24 hours in both seasons. While by oral administration, concentrations in summer are higher than in winter, with or without prior fasting and detectable up to 72 hours. Muscle and skin concentration are detectable up to 120 hours being higher than in plasma. According to the results, the kinetic profile of marbofloxacin in *O. mykiss* is affected by medium temperature, with or without prior fasting for oral application. The dose used is clearly insufficient to ensure therapeutic efficacy, and a dosage adjustment should be considered. Considering that rainbow trout is marketed with skin, for the calculation of the waiting period this tissue was considered, where the permanence is greater, resulting in 11.9 days (227 degrees / day) for summer and 13.8 days (167 degrees / day) for winter.

Keywords: marbofloxacin, rainbow trout, pharmacokinetics

## **CAPITULO I. INTRODUCCION**



### **1.1. Pesca y acuicultura, aspectos generales**

La pesca y la acuicultura son actividades que aportan importantes fuentes de alimentos, ingresos y medios de vida para millones de personas en el mundo dedicadas a esta actividad. La piscicultura es una rama de la acuicultura, referida a la producción de peces cuyo proceso abarca desde el manejo de reproductores, obtención de larvas, recría tanto de alevines y juveniles, hasta el engorde o terminación, para lograr un producto apto para su comercialización y el consumo humano.

Las proyecciones estimadas sobre el crecimiento de la población mundial, implican una mayor disponibilidad en cantidad y calidad de alimentos. En este sentido, es reconocida la alta calidad que posee la proteína de los organismos acuáticos, cuya importancia será mayor en el futuro, al contribuir de forma destacada a la seguridad alimentaria y la nutrición adecuada de la población mundial, que se prevé, alcance los 9,700 millones de habitantes en el año 2050 según el informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2016).

En la década anterior, la estimación de consumo de pescado y subproductos pesqueros en relación a la proyección del aumento de población mundial, se contraponen con la disminución del rendimiento de la pesca de captura por sobreexplotación y el paulatino agotamiento de las poblaciones naturales (Luchini & Panné Huidobro, 2008; FAO, 2016) (Figuras 1 y 2).

El aumento de la producción mundial de la acuicultura ha dado como resultado nuevas y mejoradas especies de cultivo que totalizan más de 580 (362 especies de peces y 62 de crustáceos), con una amplia gama de crecimiento y condiciones de producción intensiva (Naylor *et al.*, 2000; Pauly & Zeller, 2017).

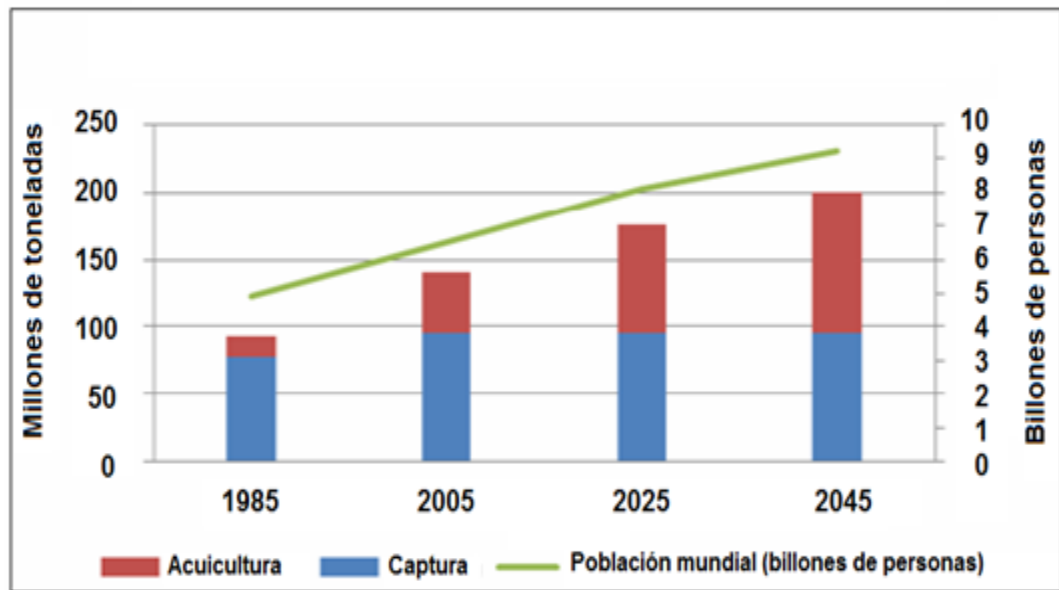


Figura 1: Consumo de pescado en relación a la proyección del aumento de población mundial (Luchini & Panné Huidobro, 2008).

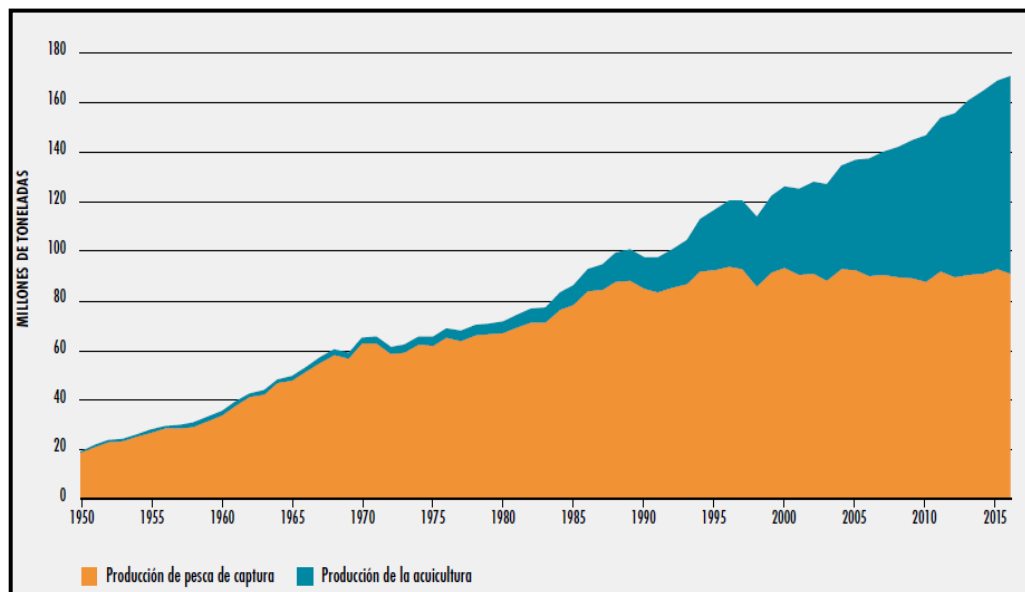


Figura 2: Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura en el periodo 1950-2016 (FAO, 2016).

En nuestro país, desde el Estado Nacional, se promueve la capacitación teórico-práctica y se apoya el desarrollo de tecnologías para especies autóctonas y exóticas existentes. En el 2007 se puso en marcha la ejecución del Plan Nacional de Sanidad Animal, inicialmente dedicado a peces salmónidos, que involucra la

incorporación de tecnología y la multiplicación de pequeñas explotaciones mediante la aplicación de programas de fomento (Luchini, 2007; Luchini & Panné Huidobro, 2008; Panné Huidobro, 2016), y la aprobación de la Ley de Acuicultura a fines de 2015.

En este contexto, existe un potencial de crecimiento de la producción de proteína de origen acuático respaldado por la existencia de recursos naturales, aguas de calidad, disponibilidad de insumos para producción de alimento balanceado y la existencia de instituciones de enseñanza, investigación y desarrollo (Sánchez Chopa, 2012; Panné Huidobro, 2016).

La producción acuícola nacional destinada al consumo humano ha evolucionado en los últimos 20 años, desde las 1,000 Tn en el año 1996 hasta las 4,027 Tn en el 2014, con una ligera disminución en el 2015 (3,681 Tn). Aún así, el período 2010-2015 presenta un crecimiento acumulado en acuicultura del 38,3 % como se puede observar en la Figura 3 (Panné Huidobro, 2016).

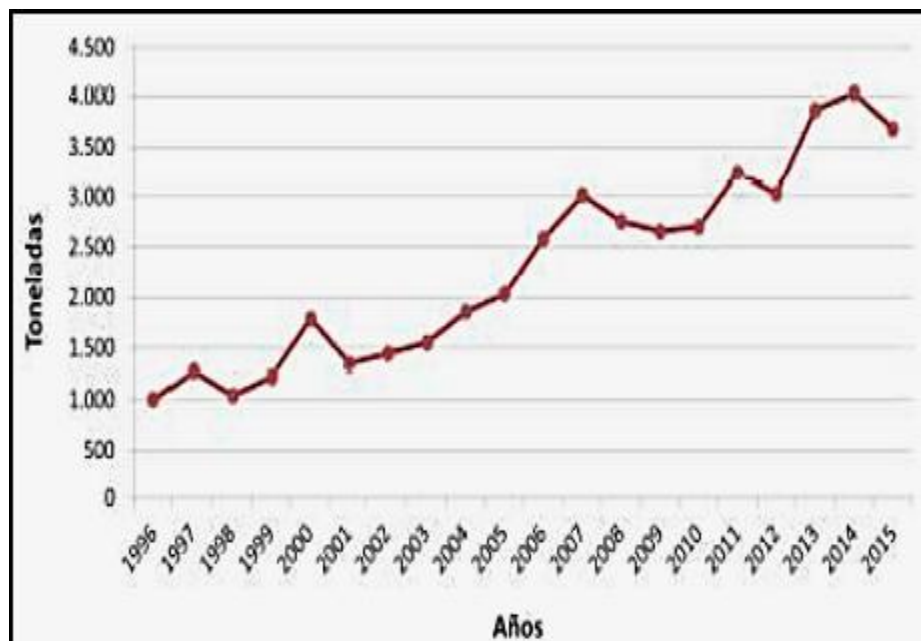


Figura 3: Producción acumulada en acuicultura en el periodo 1996-2015 (Panné Huidobro, 2016).

De las 23 especies que se producen, que incluyen peces, moluscos bivalvos, anfibios y reptiles, el pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y la trucha arco iris (*O.*

*mykiss*), representan en conjunto el 88,6 % de la producción nacional según los registros de 2016 (Figura 4) y algo menor (87,1%) en 2018 (Panné Huidobro, 2018).

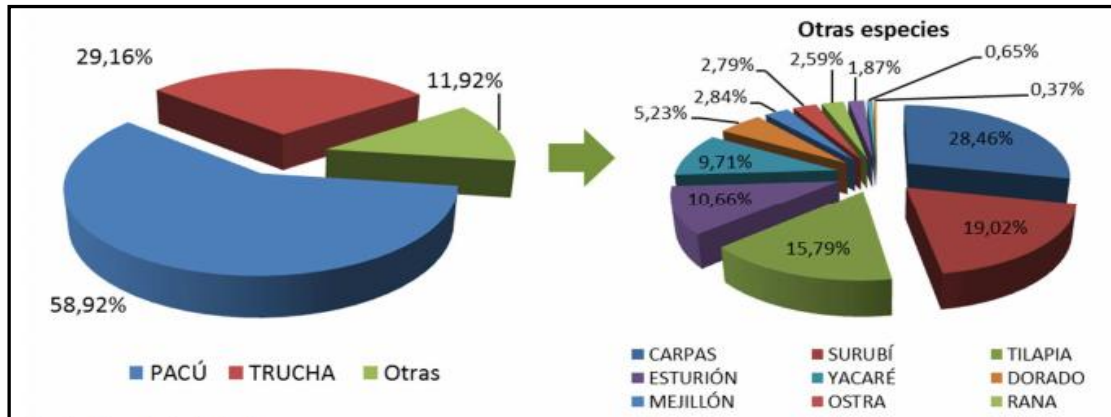


Figura 4: Producción por acuicultura en Argentina en el año 2016 (Panné Huidobro, 2016).

## 1.2. Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

La trucha arco iris, inicialmente ubicada por relación filogenética en el género *Salmo* (*Salmo gairdneri*), fue incorporada posteriormente en base a estudios fósiles dentro del grupo de los salmones del Pacífico, ubicada en la familia de los salmónidos con la denominación *O. mykiss* (Figura 5).

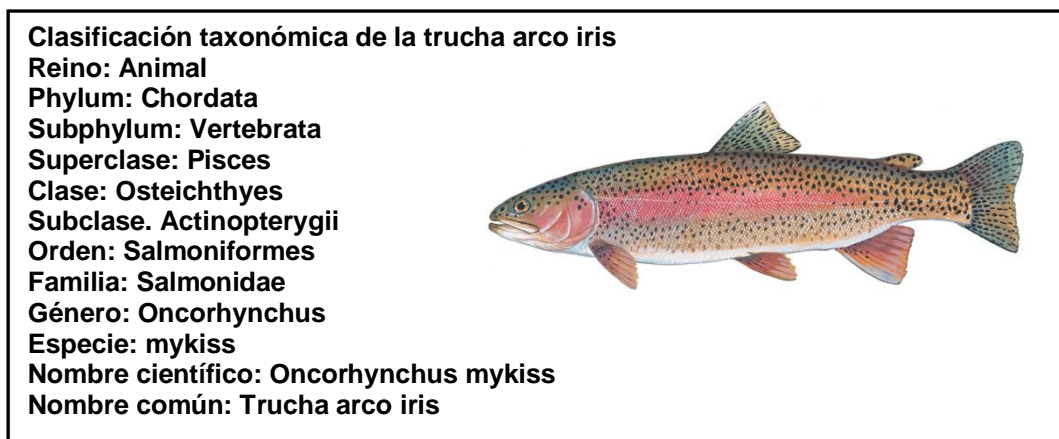


Figura 5: Clasificación taxonómica de la trucha arco iris (Camacho *et al.*, 2000).

Es una especie originaria de la costa oeste del océano Pacífico distribuida desde Alaska hasta México, su hábitat comprende aguas dulces, limpias y con bajas temperaturas. Su alimentación natural está basada en invertebrados, insectos y moluscos; en tanto los ejemplares adultos pueden consumir peces y anfibios (Pillay & Kutty, 2005).

En Argentina, prosperaron cinco de las diez especies introducidas a partir de 1904 en el sur del país y en otras zonas que cuentan con condiciones agroecológicas con diversidad de clima, calidad de agua y disponibilidad de alimento para la producción ictícola (Sakai & Espinós, 1992; Luchini, 2004).

Actualmente los principales emprendimientos de cultivo intensivo se encuentran situados en los embalses de Alicurá (Neuquén), Piedra del Águila (Río Negro) y sobre el Canal de Beagle (Tierra del Fuego), mediante el sistema de jaulas suspendidas. En menor magnitud, hay establecimientos en las provincias de La Pampa, Jujuy, Salta, Tucumán, Mendoza, Córdoba y San Juan, mediante cultivos en estanques de cemento o de tierra con elevadas tasas de renovación de agua de excelente calidad (Luchini, 2009; Sánchez Chopa, 2012; Panné Huidobro, 2016).

La trucha arco iris puede desarrollarse en temperaturas que oscilan entre 3 y 21°C, no obstante, se considera ideal cuando se ubica entre 7 y 16°C (Blanco Cachafeiro, 1984; Del Valle, 1990). Con relación a otros peces de la familia, *O. mykiss* exhibe mayor tolerancia frente diferentes condiciones ambientales como temperatura, pH y salinidad del agua, que le permite habitar en ambientes acuáticos restrictivos para otras especies de truchas (Kerr & Lasenby, 2000).

### **1.3. Antimicrobianos en piscicultura**

La piscicultura es uno de los sectores de producción de alimentos de más rápido crecimiento en todo el mundo. Los informes de la FAO publicados en el año 2016, revelan que la producción acuícola mundial de pescado se incrementó un 13% durante la década 2004-2014, hasta llegar a 73,8 millones de Tn y contribuir con el 46% del suministro total de pescado para alimento (Kumar & Roy, 2017). Los peces implican un consumo aparente de 26,8 kg per cápita que representa el 6,7% de todas las proteínas consumidas por los seres humanos (FAO, 2016).

A medida que los peces se han convertido en una fuente importante de alimentos, el uso de productos terapéuticos, especialmente antimicrobianos, ha

aumentado con la expansión de la piscicultura intensiva para tratar de mitigar y controlar el efecto de las enfermedades (Rodgers & Furones, 2009; Park *et al.*, 2012; Reimschuessel *et al.*, 2013; Ranjan *et al.*, 2017).

Dada la gran diversidad que caracteriza al sector de la piscicultura, las consideraciones de uso de antimicrobianos como una categoría única, sólo permite hacer generalizaciones amplias en cuanto a cantidades utilizadas, gama de agentes empleados y justificación de su uso (Smith *et al.*, 2008).

Es conocido que el empleo sin control de antimicrobianos, extrapolar datos o experiencias adquiridas en otras especies, conduce al fracaso terapéutico, eventual toxicidad, la presencia de residuos indeseables en la ictiofauna y su medio, además de favorecer la manifestación de patógenos resistentes (Alderman, 2002).

Según Reimschuessel *et al.* (2013), antes de que un antimicrobiano sea prescrito apropiadamente como tratamiento, deben considerarse factores como la fisiología de los peces, información sobre farmacocinética en la especie a utilizarlo y realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* para proporcionar información que permita una terapéutica eficaz.

Si bien todavía se carece de un conocimiento adecuado sobre la farmacocinética y la farmacodinamia en una gran proporción de las especies de peces cultivados (Smith *et al.*, 2008); en las últimas décadas se han logrado avances considerables hacia la obtención de información sobre tratamientos en piscicultura que incluyen formularios para dosificación y regímenes terapéuticos (Stoskopf, 1993; Carpenter, 2005; Noga, 2010).

A nivel mundial, lo mismo que en otros sectores de la producción animal, la crianza intensiva de peces se asocia con elevadas densidades poblacionales. Si bien con mejoras genéticas, el cultivo de trucha no escapa a las consecuencias derivadas de las grandes aglomeraciones. En los sistemas de confinamiento, aun disponiendo de agua de calidad, los peces confrontan por mantener un espacio vital, que conduce a la descamación por roces y frotamientos, además de heridas por agresiones especialmente para consumir el alimento, sumándose la manipulación a la que son sometidos en diferentes medidas de manejo.

Los piscicultores, conocedores de estos problemas, mantienen altas densidades guardando un equilibrio poblacional sin sobrepasar los límites de las condiciones ambientales; en éste contexto aun cuando se tiene un mayor

conocimiento sobre patologías, la implementación de medidas de manejo y la vacunación, permanece latente la predisposición a padecer de infecciones y en consecuencia se necesita recurrir a los antimicrobianos para el control de patologías bacterianas (Lüders *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008).

Los estudios cinéticos de los xenobióticos susceptibles de aplicación en acuicultura son útiles para la caracterización cuantitativa de su potencial acumulación y eliminación, biodisponibilidad, bioconcentración y/o bioacumulación, agotamiento de residuos, distribución tisular y toxicidad en las distintas especies. La información que se genere puede lograr un manejo racional de los recursos para acreditar eficacia terapéutica e inocuidad en los animales destinados a consumo humano, interpretada a partir de experiencias farmacocinéticas (Alderman, 2002).

## 1.4. Hipótesis

H1) Dadas las diferentes condiciones de cultivo que se registran en verano e invierno, principalmente en función de la temperatura del agua, las características farmacocinéticas de marbofloxacin en *O. mykiss* son diferentes, producto de las modificaciones propias del metabolismo de los peces.

H2) La dosis utilizada de marbofloxacin es suficiente para asegurar eficacia terapéutica frente a una amplia gama de agentes bacterianos frecuentes en peces.

H3) Dado que el fármaco permanece menor tiempo en músculo que en piel, se toma a este último tejido de *O. mykiss* para establecer el período de resguardo expresado en grados días.

## 1.5. Objetivos

### 1.5.1. General

Describir la cinética plasmática y tisular de marbofloxacin administrada por las vías endovenosa y oral, en trucha arco iris (*O. mykiss*) cultivadas en condiciones de verano e invierno.

### 1.5.2. Específicos

Describir el perfil farmacocinético de marbofloxacin en las condiciones de explotación de verano e invierno.

Determinar las concentraciones temporales alcanzadas en piel y músculo en condiciones de explotación de invierno y verano.

Establecer la biodisponibilidad de marbofloxacin para la vía oral en ayunas y con alimento.

Estimar la utilidad terapéutica de marbofloxacin en trucha arco iris con una dosis de 2 mg/kg.



Establecer el tiempo de retiro para el fármaco en piel y músculo en las condiciones de explotación de invierno y verano.

Desarrollar una metodología analítica para determinar marbofloxacina y otras fluoroquinolonas en plasma y tejidos de *O. mykiss*.

## CAPITULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 2.1. Terapéutica antimicrobiana

El objetivo de la terapia antimicrobiana 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 seleccionado por cuanto requiere niveles suficientes en el tejido afectado que permitan eliminar o controlar el crecimiento microbiano (Baggot, 2007; Walker & Giguère, 2007; Leekha *et al.*, 2011; Page & Gautier, 2012; Onufrak *et al.*, 2016).

En consecuencia, la elección del fármaco, el régimen y el modo de aplicación dependen del agente causal de la enfermedad (Prescott & Baggot, 2002; Beltrán, 2004; Lees *et al.*, 2008). Sin embargo, una terapéutica eficaz está condicionada por la interacción entre el animal, la actividad antimicrobiana y la farmacocinética, según se representa en la Figura 6 (Song, 2003; McKinnon & Davis, 2004; Leekha *et al.*, 2011; Onufrak *et al.*, 2016).

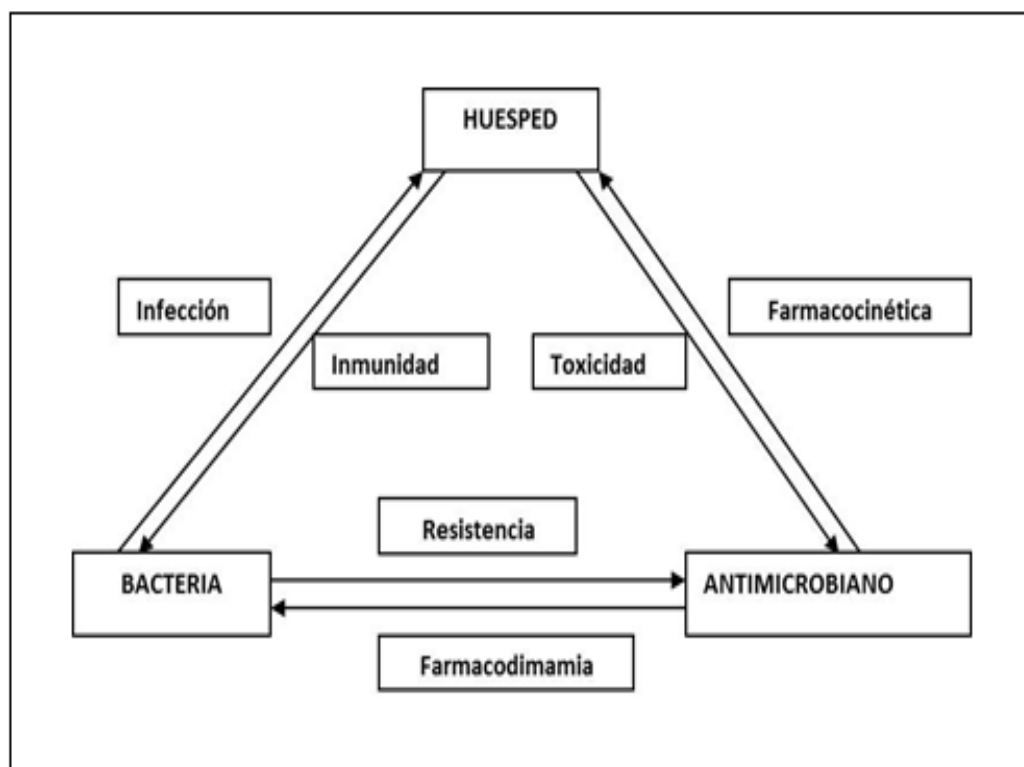


Figura 6: Relación antimicrobiano, bacteria y huésped.

### 2.1.1. Farmacodinamia

La farmacodinamia implica la selectividad del fármaco sobre el agente patógeno de tipo bactericida o bacteriostática, interfiriendo procesos metabólicos, con componentes estructurales: membrana celular, pared, ácidos nucleicos e inclusive acciones intracelulares que interrumpen el desarrollo bacteriano y permiten la participación de los mecanismos inmunitarios del huésped (Beltrán, 2004; San Andrés Larrea & Boggio, 2007; Lees *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, se han utilizado la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) como predictores de la potencia de la interacción antibiótico-microorganismo. Sin embargo, estos parámetros no brindan información sobre el comportamiento en el tiempo de la actividad antimicrobiana ni del efecto post antibiótico (Song, 2003; Onufrak *et al.*, 2016).

Ciertas aproximaciones farmacodinámicas/farmacocinéticas colaboran con la seleccionar la dosis de un antibiótico y su ritmo de administración. Los parámetros que mejor se correlacionan con eficacia terapéutica son: -el cociente entre la máxima concentración alcanzada por el antibiótico ( $C_{máx}$ ) y la concentración inhibitoria mínima (CIM), expresado como  $C_{máx}/CIM$ ; -el área bajo la curva (ABC) de 0-24 horas/ $CIM$  y -el tiempo que las concentraciones séricas superan la CIM del patógeno ( $t > CIM$ ).

Empleando adecuadamente estos parámetros, los antibióticos pueden clasificarse en:

- Antibióticos con efecto dependiente de la concentración: son aquellos cuya eficacia se correlaciona con concentraciones séricas elevadas ocasionando un efecto persistente y prolongado. Dosis elevadas de estos antibióticos, producen un elevado cociente inhibitorio y un efecto bactericida marcado. El parámetro  $ABC/CIM$  también predice la eficacia de estos antibióticos. Son representativos del grupo los aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Craig, 2000; Song, 2003; Onufrak *et al.*, 2016).

- Antibióticos con efecto tiempo-dependiente y diferente persistencia, el grupo incluye betalactámicos y macrólidos. Para estos antimicrobianos el parámetro farmacodinámico que mejor se correlaciona con la eficacia es el  $t > CIM$  (Craig, 2001; Song, 2003; Onufrak *et al.*, 2016).

### **2.1.2. Farmacocinética**

La farmacocinética es la disciplina que describe la evolución temporal de las concentraciones de un fármaco dentro de un organismo, determina las variaciones en las concentraciones de fármacos y/o sus metabolitos en función del tiempo en fluidos, tejidos y excretas. Esto es dependiente de una serie de procesos simultáneos que comprenden la absorción, distribución, metabolismo y excreción, que resultan en una curva de concentración plasmática en función del tiempo que difiere según la vía de administración del fármaco (Escobar, 2016; Rosenbaum, 2017 c).

Habitualmente, los ensayos cinéticos se realizan tras la aplicación de un fármaco en dosis únicas o múltiples por una o más vías de administración a un grupo homogéneo de animales para colectar luego muestras de sangre, fluidos o tejidos en diferentes tiempos, en los cuales se cuantifica el fármaco (Lees & Shojaee AliAbadi, 2002; Escobar, 2016; Rosenbaum, 2017c). Los datos conseguidos en función del tiempo son interpretados mediante relaciones matemáticas y el desarrollo de modelos cinéticos (Gibaldi & Perrier, 1975; Riviere, 2009; 2011; Escobar, 2016).

#### **2.1.2.1. Absorción**

Este proceso comprende el ingreso del fármaco desde su lugar de aplicación hasta la circulación general. Es influenciado por ciertas características del fármaco, como la liposolubilidad, el grado de ionización y las particularidades de las membranas celulares y el flujo sanguíneo local (Baggot, 2001; Jerzsele, 2012; Martín-Jiménez, 2015a; Sutton, 2017).

En ese sentido, la absorción por vía oral depende de las características del sistema digestivo, como el pH gastrointestinal, presencia de alimentos, tasa de vaciado gástrico, flujo sanguíneo, motilidad intestinal, biotransformación intestinal y/o hepática y la presencia de transportadores gastrointestinales (Baggot, 2001; Jerzsele, 2012; Martín-Jiménez, 2015a; Sutton, 2017).

Escobar (2016), señala que con el propósito de cuantificar el ingreso de un fármaco a la circulación general y la velocidad del proceso, se utilizan parámetros como la concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ); el tiempo en que se alcanza dicha concentración ( $T_{m\acute{a}x}$ ) y el área bajo la curva (ABC), representados en la Figura 7.

Estos parámetros que indican la capacidad para alcanzar la circulación sistémica, resultan del equilibrio dinámico que se establece entre diferentes procesos cinéticos que regulan la disposición del fármaco en el organismo, según la dosis administrada y la relación entre las constantes de velocidad de absorción ( $K_a$ ) y de eliminación ( $K_e$ ) (Baggot, 2001; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004a; Escobar, 2016). El  $t_{1/2abs}$  corresponde al periodo de tiempo que requiere la absorción del 50% del fármaco, y se establece a partir de una constante de velocidad de absorción ( $K_a$ ), mediante la ecuación:

$$t_{1/2abs} = \ln 2 / K_a$$

donde  $\ln$  es logaritmo natural y  $K_a$ , es la constante de absorción.

El parámetro área bajo la curva (ABC) corresponde a la sumatoria del conjunto de todas las posibles concentraciones plasmáticas calculado por el método trapezoidal mediante la unión por rectas de las concentraciones encontradas (Baggot, 2001; Lees & Toutain, 2012; Martín-Jiménez, 2015a).

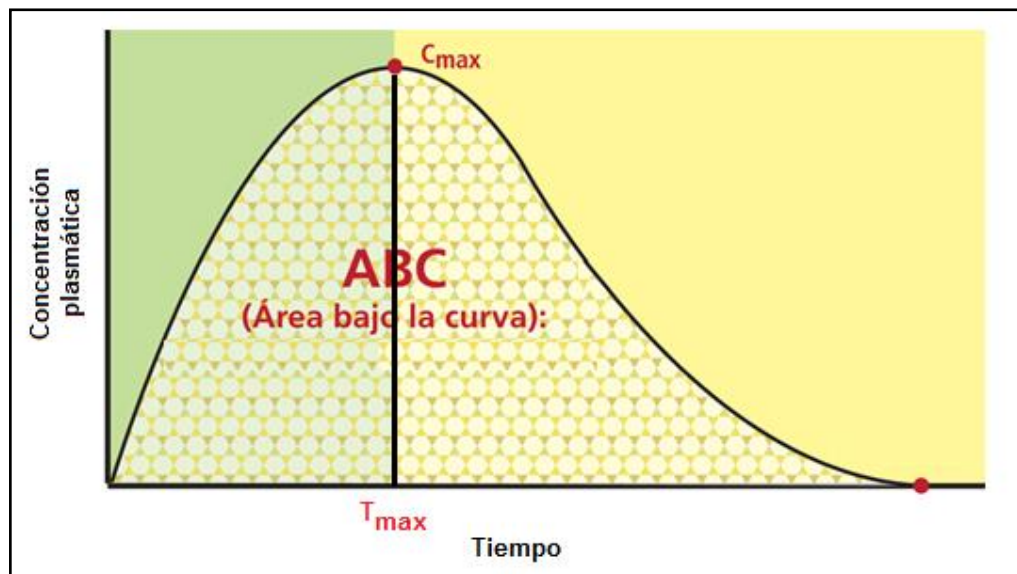


Figura 7: Representación gráfica de los parámetros cinéticos  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  y ABC.

El ABC permite calcular otros parámetros farmacocinéticos como el clearance total ( $Cl_t$ ), el clearance renal ( $Cl_r$ ), el volumen de distribución ( $V_d$ ) y el tiempo medio de residencia (TMR) para realizar cálculos de biodisponibilidad ( $F$ ) (Baggot, 2001; Jerzsele, 2012; Escobar, 2016). Esta última, describe la extensión y la tasa de absorción del fármaco sin alteraciones desde el sitio de aplicación. Luego de la administración intravenosa el valor de  $F$  es del 100%, mientras que por vía oral la

fracción absorbida depende de los eventos que afectan su exposición sistémica, incluso el metabolismo pre-sistémico (Baggot, 2001; Jerzsele, 2012; Lees & Toutain, 2012; Escobar, 2016) y se calcula mediante la ecuación:

$$F (\%) = (ABC_{\text{Coral}} / ABC_{\text{Civ}}) \cdot 100$$

### 2.1.2.2. Distribución

Corresponde a la transferencia de fármacos desde la circulación general hacia los tejidos; la velocidad y magnitud del evento está condicionado por procesos a favor de gradiente y depende de las propiedades fisicoquímicas del fármaco (peso molecular, coeficiente de partición, pKa) y por la afinidad por las proteínas plasmáticas o tisulares (Beltrán, 2004; Jerzsele, 2012; Lees & Toutain, 2012; Modric, 2014; Rosenbaum, 2017 b).

El parámetro que describe la distribución es el volumen aparente de distribución ( $V_d$ ), que expresa la magnitud de la distribución sin un significado fisiológico en cuanto a espacio real, debido que se refiere al tamaño de un compartimiento hipotético necesario para contener la cantidad de fármaco existente en el organismo si éste presenta igual concentración que en el plasma (Toutain & Bousquet-Melou, 2004b; Brown, 2005; Riviere, 2011; Rosenbaum, 2017 b).

El  $V_d$  se expresa en L/kg de peso corporal y sólo estima el grado de distribución de un fármaco sin revelar el patrón de distribución, posible únicamente cuando se cuantifica en distintos órganos y tejidos (Baggot, 2001; Escobar, 2016; Rosenbaum, 2017 b). El  $V_d$  relaciona la dosis total ( $D$ ) aplicada con la concentración en plasma ( $C_p$ ) o sangre:

$$V_d = D / C_p$$

Se expresa como:  $V_{d\text{área}} = (D \times F) / ABC_{0-\infty} \times \beta$

dónde  $D$ = dosis administrada,  $F$ = fracción absorbible,  $ABC_{0-\infty}$ = área bajo la curva desde la aplicación hasta el infinito y  $\beta$ = constante de velocidad de eliminación

El volumen de distribución también puede ser expresado como  $V_{dss}$ , corresponde al estado estable o "*steady state*" ( $V_{dss}$ ), cuando la velocidad de ingreso del fármaco a la circulación general es igual al egreso y la administración se realiza en bolus intravenoso, que se establece mediante la ecuación:

$$V_{d\text{ss}} = (D_{\text{ev}} \times ABC_M) / (ABC_{0-\infty})^2$$

dónde:  $Dev$ = dosis extravascular,  $ABCM$ =área bajo la curva en el primer momento y  $ABC0-\infty$ = área bajo la curva desde la aplicación hasta el infinito.

### 2.1.2.3. Metabolismo y Excreción

La mayoría de los fármacos se metabolizan en el organismo a metabolitos activos, parcialmente activos o inactivos. Sufren transformaciones químicas que tienden a favorecer su excreción (Jerzsele, 2012).

A nivel hepático se producen reacciones metabólicas de Fase I, Fase II y recientemente se han incluido reacciones de Fase III (Coleman, 2007; Modric, 2014). Las primeras inducen cambios en la molécula mediante oxidación, reducción, hidrólisis o hidratación; en tanto los eventos de la Fase II producen la conjugación de los metabolitos con compuestos como el ácido glucurónico, sulfatos, glutatión, grupos metilo y aminoácidos (Brown, 2005; Jerzsele, 2012; Rosenbaum, 2017a; Martín-Jiménez, 2015b).

El metabolismo de Fase II implica un procesamiento de los conjugados, que involucra sistemas de bombas de eflujo que eliminan los productos del metabolismo de las células, la sangre y, en última instancia del organismo (Jerzsele, 2012; Modric, 2014; Rosenbaum, 2017a).

La Fase III involucra un procesamiento adicional de los conjugados, que incluye a los transportadores de eflujo, residentes principalmente en la membrana canalicular, que concluyen el aclaramiento hepático mediante la secreción de fármacos sin cambios, metabolitos de fármacos y conjugados de glucorónido, sulfato y glutatión en la bilis (Modric, 2014; Coleman, 2007; Rosenbaum, 2017a). La excreción en conjunto con los procesos que se desarrollan en el metabolismo, conduce a la exclusión del fármaco del organismo (Lees *et al.*, 2008; Jerzsele, 2012; Rosenbaum, 2017a).

El clearance (Cl) o aclaramiento expresa la eliminación y representa la relación existente entre la velocidad de eliminación ( $K_{el}$ ) y la concentración en plasma ( $C$ ), ( $Cl = K_{el}/C$ ) (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004a; Jerzsele, 2012; Rosenbaum, 2017a). Esta relación es constante para cada fármaco e indica volumen del mismo que se depura del plasma por unidad de tiempo. Se calcula mediante la fórmula:

$$Cl_t = (Vd_{\text{área}} \times \beta) / ABC0-\infty$$



dónde:  $Cl_t$ = clearance total,  $V_d$ = volumen de distribución,  $\beta$ = constante de velocidad de eliminación,  $ABC_{0-\infty}$ = área bajo la curva desde la aplicación hasta el infinito.

Cuando se considera el proceso de eliminación global se hace referencia al clearance plasmático ( $Cl_p$ ), que es la suma de diferentes  $Cl$  (renal, metabólico y biliar, entre otros). Este parámetro cinético evalúa la eliminación, si bien no indica el tiempo que demora un fármaco en eliminarse del organismo (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004a; Brown, 2005; Jerzsele, 2012; Rosenbaum, 2017a).

Un parámetro derivado del anterior, denominado vida media biológica ( $t_{1/2\beta}$ ), denota el tiempo requerido para que cualquier concentración medida en la fase de eliminación de la curva de disposición decline hasta la mitad. El  $t_{1/2\beta}$  permite valorar la permanencia en el organismo y sustenta la selección del intervalo de dosis para un fármaco (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b; Jerzsele, 2012; Rosenbaum, 2017a). La ecuación que relaciona ambos parámetros:

$$t_{1/2\beta} = 0,693 \cdot V_d/Cl$$

dónde:  $V_d$ = volumen aparente de distribución y  $Cl$ = aclaramiento plasmático.

El tiempo medio de residencia (TMR), representa el tiempo medio que un fármaco reside en el organismo luego de la administración de una dosis única. El TMR es la analogía del momento estadístico de la vida media y puede variar con la vía de administración (Baggot, 2001). La estimación del TMR se fundamenta en las áreas totales debajo de las curvas de disposición, mediante la integración numérica empleando la regla trapezoidal desde el tiempo cero hasta la última concentración medida, con extrapolación al tiempo infinito:

$$TMR: ABCM / ABC$$

dónde:  $ABC$ = área bajo la curva,  $ABCM$ = área bajo la curva en el primer momento de la curva y tiempo versus el tiempo de cero a infinito.

### 2.1.3. Integración farmacocinética - farmacodinamia (PK/PD)

Según Martínez *et al.* (2006) y Carrillo Espera *et al.* (2013), la interacción entre la farmacocinética y la actividad antibacteriana de los antimicrobianos, también conocida como PK/PD, se estudia con modelos *in vitro* o animales para representar la actividad del antibiótico en un ambiente dinámico, a los efectos de establecer la dosis necesaria para lograr un adecuado resultado clínico.

Las fluoroquinolonas son antimicrobianos concentración dependiente (Aguilar Alfaro *et al.*, 2013). Por lo tanto, es necesario no sólo asegurar una exposición adecuada luego de una dosis inicial, sino también obtener niveles superiores a la CIM en el sitio de localización de los microorganismos.

Diferentes estudios expusieron que la relación ABC/CIM necesaria para alcanzar eficacia terapéutica respecto a las fluoroquinolonas deben ser  $\geq 125$  y  $\geq 30$  para infecciones producidas por microorganismos Gram negativos o Gram positivos, respectivamente. Mientras que la relación  $C_{\text{máx}}/CIM$  se ubica en  $\geq 10$  (Soriano, 2002; Soloaga, 2011; Aguilar Alfaro *et al.*, 2013).

## **2.2. Regulación de fármacos de uso veterinario**

### **2.2.1. Valoración de riesgos**

Al establecer regímenes de administración de fármacos en animales deben contemplarse los eventuales residuos en los tejidos comestibles ya que pueden impactar negativamente la salud del consumidor o implicar sanciones de orden económico (Arboix & Martín-Jiménez, 2002; Riviere & Sundlof, 2003).

En consecuencia, es indispensable establecer para cada fármaco la ingesta diaria admisible (IDA), que atañe a la máxima cantidad del medicamento que la especie experimental puede recibir sin ningún tipo de manifestación toxicológica, mediante factores de seguridad de 100 a 1000 veces para el NOEL (dosis más alta que no produce efecto tóxico) -según el riesgo de los antecedentes toxicológicos disponibles- que avalen inocuidad al consumidor de alimentos (Riviere & Sundlof, 2003; Errecalde, 2004; Palermo Neto, 2006).

Con esta información, los organismos nacionales e internacionales de control establecen para cada fármaco y cada tejido comestible de una especie determinada un límite máximo de residuos o LMR. Este 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 permisible o reconoce como aceptable dentro de un alimento o en la superficie del mismo” según el Manual de Procedimientos de la Comisión del Codex Alimentarius (FAO, 2015). El LMR es establecido por estudios de toxicidad crónica en animales

de laboratorio que contemplan un nivel de dosis sin efecto o NOEL (Miller & Flynn, 2002; Palermo Neto, 2006).

### **2.2.2. Residuos, implicancias, definiciones**

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

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

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

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

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

\* Comercio de alimentos: satisfacer la demanda global de proteínas comestibles, especialmente de origen animal, implica mejorar la producción y la eficiencia en los sistemas productivos agroganaderos. El uso de plaguicidas en los cultivos, la utilización de fármacos veterinarios y drogas que permitan mejorar la conversión alimenticia y la producción de carne y leche, son herramientas que hoy disponen los productores y que seguramente no abandonarían, pues suponen beneficios productivos y económicos conexos. Sin embargo, la venta local de

alimentos y la exportación, presume la ausencia de residuos. Es importante destacar que las exigencias a este respecto son cada vez mayores y determinantes para acceder a los mercados internacionales de alimentos.

\* Procesos tecnológicos de elaboración: se han desarrollado investigaciones orientadas a determinar la influencia de los residuos químicos en los procesos de producción de alimentos.

\* Salud Pública: existen antecedentes que han demostrado capacidad de provocar alergias, sinergismo o inhibiciones terapéuticas, resistencia microbiana, teratogenicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad y cambios morfo-fisiológicos por inducción de sustancias hormonales, entre otros (Arboix & Martín-Jiménez, 2002; Riviere & Sundlof, 2003).

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

Las fluoroquinolonas se consideran seguras, aun con reportes de casos de problemas hepáticos, reacciones alérgicas y renales. Según Budiati (2010), estas complicaciones se vinculan con ciertos miembros del grupo, sin que por ello deban generalizarse a todas las fluoroquinolonas y posiblemente donde deba ponerse los mayores recaudos en niños y mujeres embarazadas.

Se considera de mayor riesgo el desarrollo de resistencia en las bacterias de los animales que pueden dar lugar a fallos terapéuticos en tratamientos veterinarios con el consiguiente riesgo de transferencia de bacterias resistentes de los animales al hombre, o de genes portadores de información que codifican resistencia de bacterias de animales a bacterias humanas (Errecalde, 2004; Muylaert & Mainil, 2013).

El incremento de la demanda de fluoroquinolonas y en algunos casos su uso desmedido, ha originado un aumento de casos de resistencia de *Campylobacter*

*jejuni*, *Salmonella* y *Escherichia coli* sobre todo en aves de corral, que ha llevado en el caso de la Unión Europea a establecer sucesivas reglamentaciones sobre el empleo de fluoroquinolonas de uso veterinario (Luangtongkum *et al.*, 2009; Sproston *et al.*, 2018).

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

La depleción completa de un fármaco en el organismo es difícil de establecer. Con el propósito de aminorar el impacto de los residuos y brindar seguridad al consumidor de alimentos, se estipula para cada fármaco y especie animal tratada, un periodo de retirada o de resguardo (TR) (Riviere & Sundlof, 2003; Rao & Malik, 2006), interpretado como el tiempo que debe transcurrir entre la última aplicación del medicamento hasta que los residuos del mismo se encuentren en un nivel inferior al límite máximo admitido legalmente para el aprovechamiento de los productos y/o subproductos obtenidos del animal tratado (LMR). Son pertinentes entonces los estudios de disposición para establecer finalmente parámetros que garanticen la producción y el consumo de alimentos que respeten el tiempo de espera o retiro.

En algunos países los criterios regulatorios son más permisivos, por lo tanto, el problema de los residuos adquiere dimensiones disímiles 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 y el ritmo de aplicación (Miller & Flynn, 2002).

### **2.2.3. Aspectos regulatorios, organismos de control nacionales e internacionales**

El empleo de fármacos antibacterianos en la acuicultura mundial tiene contrastes respecto a las sustancias autorizadas y en los límites de residuos para quinolonas según el país (Tabla 1).

Si bien los volúmenes de producción en Argentina son mucho menores, no hay una legislación clara en cuanto al empleo de estos recursos. En 2015 los Ministerios de Salud y de Agricultura, Ganadería y Pesca, emitieron la Resoluciones

conjuntas 834/15 y 391/15, sobre control de resistencia antimicrobiana, que en su punto 6 hace alusión a la regulación del uso de antimicrobianos en salud animal y producción agroalimentaria.

El SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), es el organismo sanitario rector de la República Argentina, que fiscaliza y certifica los productos y subproductos de origen animal y vegetal, sus insumos y residuos agroquímicos, así como la prevención, erradicación y control de enfermedades animales, incluyendo las transmisibles al hombre, y de las plagas vegetales que afectan a la producción agropecuaria del país.

Para implementar y promover estas acciones, el SENASA elabora normas, controla su cumplimiento y asegura la aplicación del Código Alimentario Argentino dentro de las normas internacionales exigidas. Asimismo, el organismo planifica, organiza y ejecuta programas y planes específicos que reglamentan la producción, con el propósito de obtener alimentos inocuos para el consumo humano y animal. En la actualidad, en nuestro país se encuentra en vigencia la Resolución 559/11, que establece los LMR.

<b>Límite máximo de residuos (LMR), para quinolonas en acuicultura</b>		
<b>Región</b>	<b>Quinolona</b>	<b>LMR (µg/kg)</b>
<b>Brasil</b>	Enrofloxacin	100
	Ciprofloxacin	100
	Sarafloxacin	30
	Difloxacin	300
	Ácido Oxolínico	100
	Flumequina	600
<b>Europa</b>	Enrofloxacin	100
	Danofloxacin	100
	Sarafloxacin	30
	Difloxacin	300
	Ácido Oxolínico	300
	Flumequina	600
<b>Japón</b>	Danofloxacin	40-600
	Sarafloxacin	30-100
	Ácido Oxolínico	60-100
	Flumequina	50
<b>Asia</b>	Enrofloxacin	100
	Ácido Oxolínico	50-100
	Flumequina	500
<b>Chile</b>	Flumequina	600
<b>Ecuador</b>	Enrofloxacin	100
	Danofloxacin	100
	Ácido Oxolínico	100
	Flumequina	200-600

Tabla 1: Límite máximo de residuos para quinolonas en acuicultura en diversos países (Adaptado de Cabello, 2003; Pilco Quesada *et al.*, 2013)

A nivel internacional son dos los referentes, la FDA (Federal Drug Administration) y la EMEA (European Medicines Evaluation Agency). La EMEA emite resoluciones que se originan de la interacción de tres organismos oficiales. Regula la aprobación de medicamentos y los problemas de residuos en alimentos de origen animal en los diferentes mercados (Figura 8).

En Estados Unidos, la FDA regula una amplia serie de ítems, entre los que se cuentan alimentos, medicamentos de uso humano, aditivos alimenticios, medicamentos y dispositivos para animales domésticos, animales de granja y otros animales.

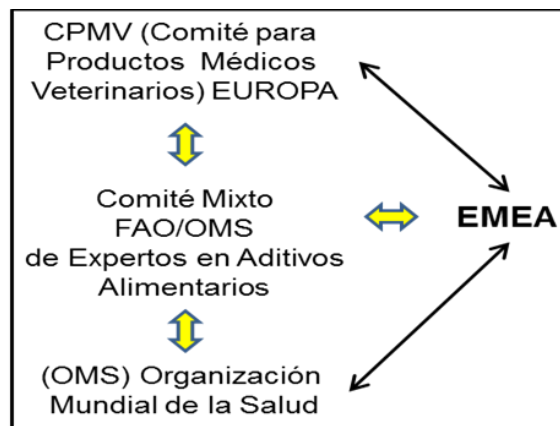


Figura 8: EMEA y organismos de interacción.

### 2.3. Fluoroquinolonas

El nombre quinolonas identifica un grupo de compuestos antimicrobianos sintéticos de acción bactericida que derivan de una estructura básica común, el ácido 4-quinolín-3-carboxílico o 4-quinolona (Figura 9).

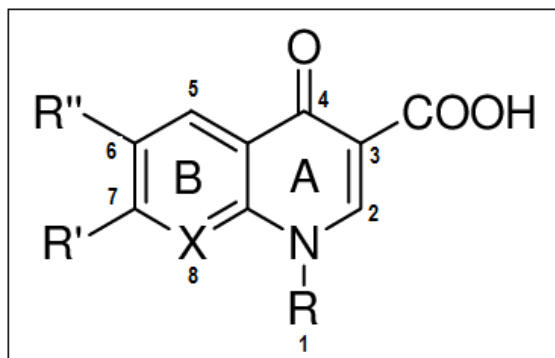


Figura 9. Estructura general del anillo de las fluoroquinolonas (Modificado de Leyva & Leyva, 2008)



Con el descubrimiento e introducción de antimicrobianos a partir de la segunda mitad del siglo XX, la medicina pudo contar con fármacos que cambiaron la evolución y el pronóstico de las infecciones. A fines de la década de 1940 se descubrieron alcaloides con estructura similar a quinolonas carentes de actividad antibacteriana (Takahashi *et al.*, 2003; Emmerson & Jones, 2003).

En 1960, en la búsqueda de drogas para el tratamiento de la malaria, se descubren propiedades antibacterianas en derivados de la naftiridina y a partir de la modificación de la cloroquina, Leshner *et al.* en 1962, obtienen el ácido nalidíxico, considerado precursor del grupo aprobado para su uso clínico en humanos en 1967 (Emmerson & Jones, 2003) y para forunculosis producida por *Aeromonas salmonicida* en peces de granja (Lees & Aliabadi, 2002).

El empleo clínico estuvo condicionado por su escasa absorción oral, elevada unión a proteínas plasmáticas (92-97%) con moderadas concentraciones tisulares, contrapuestas a las elevadas concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) requeridas para ser efectivo y un reducido espectro antimicrobiano (Bryskier, 2005; Guigère & Dowling, 2013).

Quedando como un recurso limitado al tratamiento de infecciones entéricas y urinarias por *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp. (Martínez *et al.*, 2006; González-Gómez & Martínez, 2007; Sepúlveda, 2008; Leyva & Leyva, 2008; Sharma *et al.*, 2009; Gardner, 2010; Pallo-Zimmerman, 2010); desafortunadamente la expresión de resistencia al ácido nalidíxico fue rápida (Sarkozy, 2001; Muylaert & Mainil, 2014).

Hacia fines de los 60 y principios de los 80 se realizaron modificaciones estructurales en la búsqueda de agentes con propiedades farmacocinéticas superiores, dando origen a las primeras 4-quinolonas: los ácidos oxolínico y pipemídico, piromídico y cinoxacina, con actividad antibacteriana similar, aunque efectivos contra algunos patógenos resistentes a nalidíxico, sin otras diferencias apreciables y sólo utilizados como antisépticos urinarios (Giguère & Dowling, 2013).

En 1973, se sintetiza flumequina, la primera quinolona que incorpora un átomo de flúor en la posición C6, modificación estructural que incrementó la actividad sobre Gram positivos (Emami *et al.*, 2005; Leyva & Leyva, 2008; Muylaert & Mainil, 2014).

A mediados de la década del 70 se produjo un intenso desarrollo de nuevas moléculas, focalizado en tres aspectos: 1- incrementar la actividad sobre cepas resistentes, anaerobios y microorganismos atípicos, 2- reducir la tasa de resistencia emergente y 3- mejorar el perfil farmacocinético y farmacodinámico (Sharma *et al.*, 2009; Muylaert & Mainil, 2014).

Durante los años ochenta, se originaron nuevas estructuras con mejoras en la actividad biológica y en las propiedades cinéticas; incremento de la absorción oral, la ampliación del espectro antibacteriano sobre enterobacterias, *Pseudomonas spp.*, cocos Gram positivos, concentraciones plasmáticas y tisulares bactericidas y escasa incidencia de efectos adversos (Marin Carrillo, 2008; Giguère & Dowling, 2013; Muylaert & Mainil, 2014).

De este modo, se constituyeron en fármacos de primera línea frente a diferentes infecciones, en particular los agentes de segunda generación, piperazinil-fluoroquinolonas o simplemente fluoroquinolonas, aprobadas para uso clínico en humanos como norfloxacin, ciprofloxacina y ofloxacina (Leyva & Leyva, 2008). A finales de la década se incorpora además la utilización de enrofloxacin en animales domésticos (Martínez *et al.*, 2006). Las investigaciones se han mantenido, estimándose en más de 10,000 las moléculas investigadas y/o sintetizadas, agrupadas actualmente en cuatro generaciones (Figura 10).

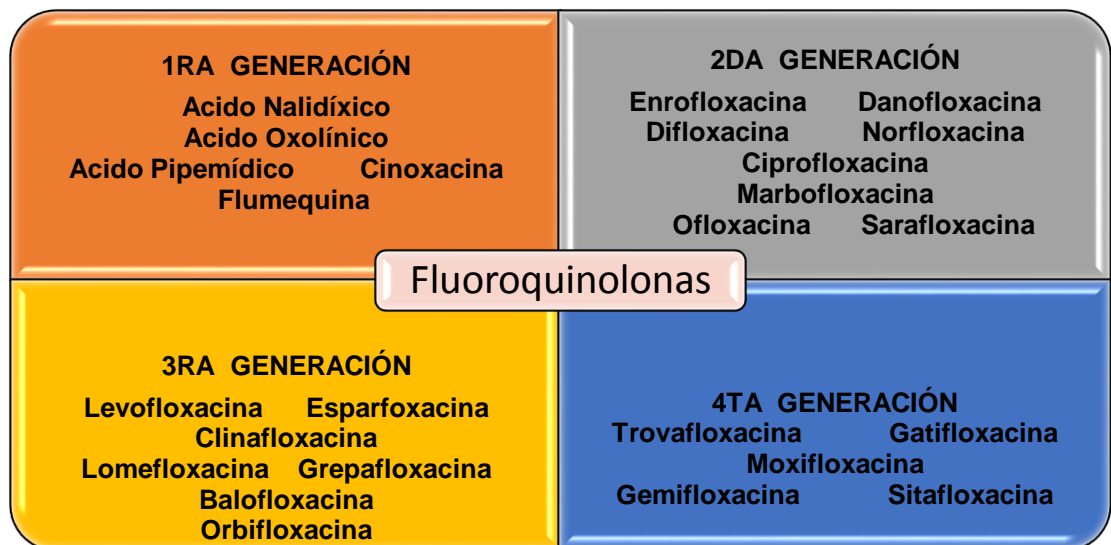


Figura 10: Generaciones de fluoroquinolonas

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

Entre las propiedades más relevantes se destacan la disolución rápida en el medio gastrointestinal con una adecuada y rápida absorción intestinal, concentraciones máximas en cortos períodos de tiempo, elevados volúmenes de distribución con altas concentraciones a nivel pulmonar, renal, aparato reproductor, vesícula y líquido biliar, en macrófagos y otras células fagocíticas, que superan a las plasmáticas. Otro aspecto relevante lo constituye la prolongada vida media, que permite la administración cada 24 horas (Ball, 2003; Martínez *et al.*, 2006).

Su actividad antimicrobiana es amplia y abarca bacterias Gram negativas, incrementada hacia Gram positivas, anaerobios y micobacterias (Grobbel *et al.*, 2007; Leyva & Leyva, 2008; Muylaert & Mainil, 2014).

### 2.3.1. Relación estructura-actividad

Las fluoroquinolonas están conformadas por un anillo bicíclico que combina el núcleo  $\beta$ -piridona, ácido carboxílico y un anillo aromático: naftidina, quinolina,

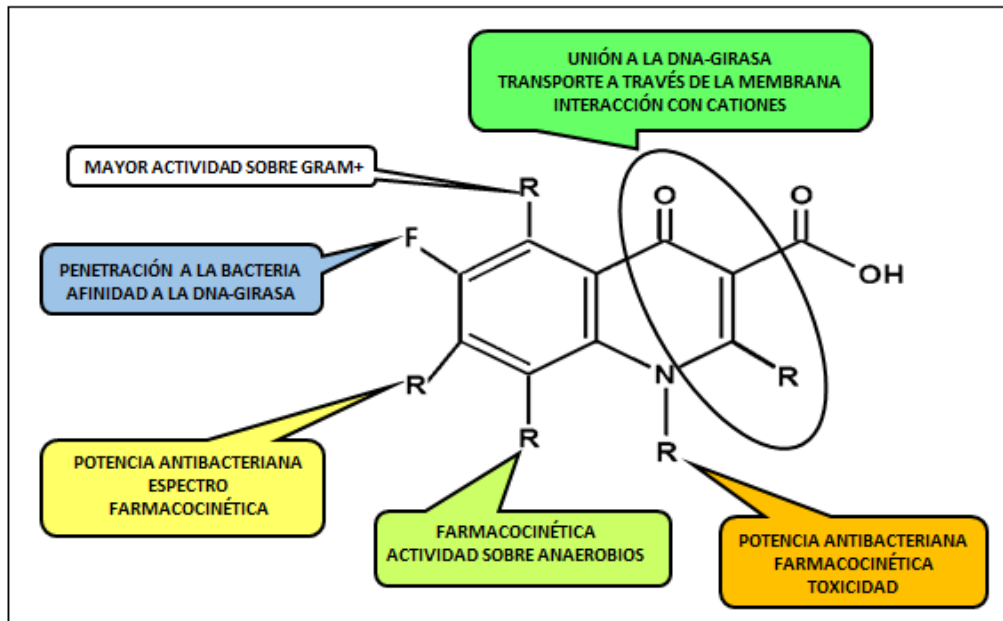


Figura 11. Efectos de las sustituciones en las fluoroquinolonas (adaptado de González Gómez & Martínez, 2007).

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

Las sustituciones en la estructura en distintas posiciones pueden ser constantes, habituales o variables. Constantes son las que definen al grupo, habituales son aquellas que tienen pocas opciones de cambio, generalmente ocurren en las posiciones 2 y 6 y las sustituciones variables pueden estar en N1 y R5 (esenciales) y R7 y X8 (importantes, aunque accesorias), donde las posibilidades de sustitución son mayores (Muylaert & Mainil, 2014).

El conjunto de sustituciones puede actuar de forma positiva o negativa entre sí en cuanto a la actividad antibacteriana, farmacocinética, toxicidad y perfil de interacciones.

### **2.3.2. Mecanismo de acción**

Estas sustancias desarrollan su actividad microbiológica inhibiendo la enzima ADN girasa o Topoisomerasa II bacteriana, involucrada en la transcripción, recombinación, replicación y reparación del ADN (Emami *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2009; Elshaboury *et al.*, 2016). Esta enzima es responsable de un superenrollamiento helicoidal negativo en la molécula de ADN y es crítica en el mantenimiento de la densidad genómica. Las quinolonas inhiben además a la Topoisomerasa IV, esencial en la segregación cromosómica en células procarióticas (Elshaboury *et al.*, 2016).

Las quinolonas interactúan con la ADN girasa en organismos Gram negativos y con la Topoisomerasa IV en organismos Gram positivos, enzimas esenciales para la replicación y transcripción del ADN, cuya inhibición por parte de estos antimicrobianos conduce a la muerte celular (Sharma *et al.*, 2009; Elshaboury *et al.*, 2016). Considerando que las enzimas difieren en sus funciones, es probable que las

bacterias difieran también en sus respuestas a las quinolonas de acuerdo a cuál sea la diana principal (Otero *et al.*, 2001).

Aun cuando las bacterias, como las células de los mamíferos, poseen material genético ADN de tipo bicatenario, existen diferencias en su estructura. Las bacterias contienen sólo un cromosoma formado por una combinación ADN, ARN y proteína (ARN polimerasa). El cromosoma bacteriano no está envuelto por una membrana y se concatena en un número variable de dominios o zonas condensadas. En cambio, en los mamíferos superiores posee un número definido de dominios y el ADN se encuentra rodeado por una membrana. Otra diferencia es que la enzima mamífera está compuesta por dos subunidades, en lugar de cuatro. Estas diferencias estructurales determinan que para inhibir a la girasa de los mamíferos se necesite una concentración 100 veces superior a la que corresponde a la enzima bacteriana (Stahlmann & Lode, 2000; González Gómez & Martínez, 2007).

### **2.3.3. Resistencia bacteriana**

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

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

-Alteración del sitio blanco, de tipo cromosómica, con mutaciones en sitios específicos conocidos como RDRQ (Regiones Determinantes de Resistencia a Quinolonas). Las mutaciones resultan en sustituciones críticas de aminoácidos, que disminuyen la interacción de las quinolonas con las enzimas (Rodríguez Martínez, 2005; Marín-Carrillo, 2008; Moudgal & Kaatz, 2009; Aldred *et al.*, 2014).

-Ingreso reducido: las quinolonas deben atravesar la membrana externa, espacio periplásmico, pared celular y la membrana citoplásmica para alcanzar a las topoisomerasas (Emami *et al.*, 2005; Hopkins *et al.*, 2005; Moudgal & Kaatz, 2009; Coyne *et al.*, 2011)

- Expulsión del antibacteriano desde el medio intracelular al extracelular por acción de transportadores endógenos activos, conocidos como ABCs (ATP-Binding Cassette). Estos constituyen un grupo de proteínas muy evolucionadas que utilizan energía a partir de la hidrólisis del ATP para traslocar un amplio espectro de sustratos a través de membranas celulares (Cattoir, 2004; Jacoby, 2005; Kaminsky *et al.*, 2006; Aldred *et al.*, 2014; Gouvêa *et al.*, 2015).

#### **2.3.4. Perfil toxicológico**

Después de varias décadas de utilización, se considera a las fluoroquinolonas agentes seguros y bien tolerados, con un perfil similar al exhibido por los antibióticos betalactámicos y macrólidos (Stahlmann & Lode, 2000; Sprandel & Rodvold, 2003; Bolon, 2009).

Los efectos adversos que pueden observarse entre sus integrantes, responden a modificaciones realizadas en la estructura molecular y también por la disposición tisular (Bertino & Fish, 2000; Scholar, 2002; Ball, 2003). Es posible la manifestación de reacciones dermatológicas, particularmente fototoxicidad (Dall'Acqua *et al.*, 2007; Nix, 2016) y alteraciones digestivas y nerviosas (Stahlmann & Lode, 2000).

También se describe neurotoxicidad luego de la aplicación intravenosa, sobre todo cuando la aplicación es rápida, con excitación hasta inducción de convulsiones (Nix, 2016), postulándose dos mecanismos diferentes, uno de ellos es la activación del receptor N-metil-D-aspartato o NMDA, reversible cuando se discontinúa la administración (Bertino & Fish, 2000; Stahlmann 2002; González Gómez & Martínez, 2007). En tanto otros estudios refieren que evitan la unión del GABA antagonizando el receptor GABA-A (Owens & Ambrose, 2005).

En individuos jóvenes es controvertido el uso de fluoroquinolonas, el efecto nocivo relevante es la erosión del cartílago articular en animales en crecimiento (Martínez *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2012; Giguère & Dowling, 2013). Esta artropatía afecta especialmente a las articulaciones que soportan peso, aunque sólo fue documentada en caninos, la toxicidad fue extrapolada a humanos y por este motivo no se administran en sujetos inmaduros o mujeres gestantes (Rosanova *et al.*, 2010; Nix, 2016).

El mecanismo del daño no es bien conocido; se postula que puede originarse en una estimulación temprana por parte de las fluoroquinolonas del metabolismo oxidativo en los condrocitos inmaduros, con formación de moléculas reactivas de O<sub>2</sub> que lleva a la muerte celular. Adicionalmente, se acumularían en el cartílago formando complejos con cationes divalentes, fundamentalmente reducen la biodisponibilidad de magnesio afectando la síntesis de colágeno y proteoglicano (Mašlanka *et al.*, 2004; González Gómez & Martínez, 2007; Kato, 2008).

También se ha reportado inflamación e incluso ruptura de tendones en humanos, independiente de la edad y se verificada con todas las quinolonas, principalmente con ofloxacina (Van der Linden *et al.*, 1999) y ciprofloxacina (Khaliq & Zhanel, 2003).

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

Algunos integrantes del grupo fueron excluidos del mercado farmacéutico mundial debido que inducen diferentes patologías: hemólisis, trombocitopenia y falla renal por temafloxacina (Stahlmann, 2002; Ball, 2003; Rouveix, 2003); hepatotoxicidad por trovafloxacina (Ball, 2003; Rouveix, 2003) y problemas cardiovasculares por temafloxacina y grepafloxacina (Rouveix, 2003).

### **2.3.5. Características generales de marbofloxacina**

Marbofloxacina es una fluoroquinolona sintética de segunda generación desarrollada por Aoki *et al.* en 1986 (Rubio Langre, 2011) y aprobada para uso veterinario exclusivo en 1995 (Gupta *et al.*, 2012; Fernández Palacios O'Connor, 2013; Papich, 2016). Químicamente, marbofloxacina corresponde 9-fluoro-2,3dihidro-2-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7-H-pirido [3,2,1-ij] [4,1,2] benzosadiacina-6-ácido carboxílico. Su fórmula molecular es C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> y su peso molecular de 362,4 g.mol<sup>-1</sup> (Figura 12).

De acuerdo a lo planteado por Haritova *et al.* (2006), Goudah & Mouneir (2008), Marín *et al.* (2009), Rubio Langre (2011) y Fernández Palacios O'Connor,

(2013), presenta una serie de sustituciones en la estructura que le confieren una serie de ventajas sobre otras fluoroquinolonas:

- Exhibe una destacada potencia antibacteriana, producto del átomo de flúor en posición C6, que incrementa la actividad sobre agentes Gram positivos.

- El anillo piperazínico (N-metil piperazina), presente en el C10, mejora el ingreso a la célula bacteriana y la formación del complejo con la ADN-girasa.

- La adición del grupo metilo al anillo piperazínico incrementa la liposolubilidad del fármaco y consecuentemente el volumen de distribución, como así también actividad sobre *Pseudomonas* spp.

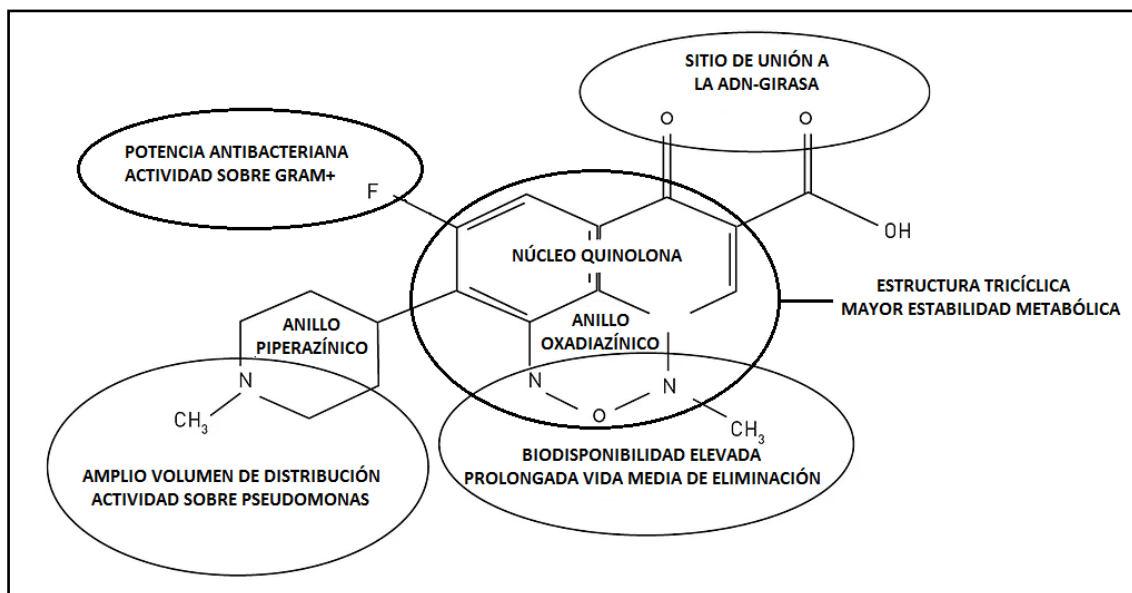


Figura 12: Estructura química de marbofloxacin y la influencia de las sustituciones

- Un átomo de oxígeno en posición 1, da origen a un anillo oxadiazínico que le confiere prolongada semivida de eliminación, mayor biodisponibilidad e incrementa el espectro frente a bacterias anaeróbicas y Gram positivas

- Comparada con otras quinolonas veterinarias (bicíclicas), la estructura tricíclica de marbofloxacin, producto de la unión del anillo oxidiazínico al núcleo quinolónico, incrementa la biodisponibilidad y le confiere mayor estabilidad metabólica, con un período más extenso de semivida de eliminación.

Marbofloxacin exhibe propiedades anfóteras, su punto isoeléctrico de 6,85 permite la solubilidad tanto en soluciones ácidas como básicas ( $pK_a = 5,7$ ;  $pK_b = 8$ ).



El carácter ácido débil proviene del ácido carboxílico en posición C6, mientras el carácter básico débil lo aporta el anillo piperazínico, estas propiedades redundan en mínima ionización a pH fisiológico de 7,4, condición que facilita la distribución tisular (Martínez *et al.*, 2006; Fernández Palacios O'Connor, 2013).

Marbofloxacin es considerado un fármaco seguro, según los reportes de la EMEA (1999), en ratones la  $DL_{50}$  por vía oral se sitúa entre 1781 y 3772 mg/kg, mientras que por vía subcutánea la misma es de 972 mg/kg.

Las anormalidades en cartílagos articulares mencionadas para las fluoroquinolonas en animales jóvenes, ocurren para marbofloxacin con dosis de 40 mg/kg/día, administrada por un período de 13 semanas, valores que exceden la dosis terapéutica y el período convencional de tratamiento (EMEA, 1999). Aplicada hasta 80 mg/kg/día en conejos no hubo evidencia de teratogenicidad (EMEA, 1999). Los efectos adversos se limitan la mayoría de las veces, a la disfunción gastrointestinal, que comprende vómitos, náuseas, deposiciones blandas e hipersalivación (Fernández Palacios O'Connor, 2013; Papich, 2016).

Marbofloxacin comparte el modo de acción de fluoroquinolonas, desarrollando actividad bactericida, concentración dependiente sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluso algunos patógenos anaeróbicos. Su acción se estableció en presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Haemophilus somnus*, *Klebsiella* spp., *Mycoplasma* spp, *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., y *Streptococcus* spp (Papich, 2016).

En acuicultura, marbofloxacin mostró una actividad bactericida efectiva en *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas sobria* (Zhiqiang & Lin, 2005). Según Dalsgaard & Bjerregaard (1991), la CIM para fluoroquinolonas se estableció en un rango de 0,0064 a 0,032  $\mu\text{g/mL}$ .

Los antecedentes cinéticos revelan que luego de la aplicación endovenosa exhibe pronta distribución desde el compartimento central. El  $V_d$  es superior a 1 L/kg (Papich, 2016). Luego de la aplicación oral, la absorción en pequeños animales es cercana al 100% mientras que prerrumiantes es mayor al 90 % y es afectada por cationes bivalentes de origen alimentario (Plumb, 2011; Papich, 2016). Su vida media es variable, los valores más bajos son de 4-7 horas en rumiantes adultos y hasta 13 horas en cerdos (Papich, 2016).

Aunque en algunos países la aplicación oral de marbofloxacin no se permite en animales en producción, para la dosis de 2 mg/kg se estableció un periodo de resguardo de 6 días para carne (Papich, 2016).

### **2.3.6. Antecedentes de fluoroquinolonas en piscicultura**

En la gran gama de los terapéuticos antimicrobianos empleados en la producción intensiva de peces, se encuentran quinolonas y fluoroquinolonas. Esta familia se comenzó a utilizar a mediados de la década de 1980 (Burka, 1997), los primeros agentes utilizados fueron los ácidos nalidíxico y oxolínico, de espectro reducido y orientados a patógenos Gram negativos.

La administración intravenosa de ácido nalidíxico a 15°C en trucha (*O. mykiss*), presenta un rápido descenso de los niveles iniciales en las primeras 8 horas, que se advierte por una vida media distribución de 1,35 horas. El Vd informado fue de 1,01 L/kg y la vida media de eliminación alcanzó a 12,8 horas (Uno *et al.*, 1992).

La aplicación oral de ácido nalidíxico en *O. mykiss* determina absorción completa (Uno *et al.*, 1992; Jarboe *et al.*, 1993), C<sub>máx</sub> plasmático a las 24 horas (Jarboe *et al.*, 1993), presencia en distintos tejidos a partir de los 30 minutos post administración y C<sub>máx</sub> en músculo provista a las 24 horas.

Por su parte, la aplicación intravascular de ácido oxonílico a 16°C generó un t<sub>1/2β</sub> de 78,2 horas, un TMR de 98,2 horas y un Vd de 2,01 L/kg (Bjorklund & Bylund, 1991). Mientras Hustvedt & Salte (1991), a 8,5°C obtuvieron para los mismos parámetros 52,6 y 59 horas y 2,9 L/kg, respectivamente. Bjorklund *et al.* (1992), destacan que el C<sub>máx</sub> y el T<sub>máx</sub> plasmático se reducen en temperaturas bajas del agua cuando el fármaco se aplica por vía oral.

La biodisponibilidad oral del ácido oxolínico en acuicultura es variable según la especie y las condiciones de vida, cuando se administra en peces de agua dulce, entre los que se encuentra *O. mykiss*, puede superar el 90% (Lunestad & Samuelsen, 2008). En diversos ensayos en *O. mykiss*, los niveles tisulares de ácido oxonílico exceden a los séricos (Archimbault *et al.*, 1988; Ueno *et al.*, 1988). En ésta especie, Bjorklund *et al.* (1992), describieron el perfil cinético por vía oral incorporado al alimento, aplicado en dosis única a diferentes temperaturas, los

niveles séricos alcanzados fueron de 3,6 µg/mL a las 24 horas a 16°C, en tanto a 10 y 5°C llegaron a 2 µg/mL a los 4 y 6 días, respectivamente. Los autores sugieren que el proceso de absorción del fármaco está influenciado por la temperatura y no por la presencia del alimento. Incluso se observa que a dosis elevadas ocurre una saturación del proceso de absorción; Bjorklund *et al.* (1992) en una experiencia realizada a 16°C, tras la aplicación en ayunas, obtienen el T<sub>máx</sub> a las 24 horas. Treves-Brown (2000), informó para el ácido oxolínico, un perfil cinético semejante al ácido nalidíxico y describe también la influencia de la temperatura sobre la cinética de absorción, lo cual es consistente con el metabolismo de los poiquiloterms, el cual está fuertemente asociado a la temperatura del agua.

Respecto de la eliminación y su impacto en el plazo de espera, existen resultados contradictorios. Treves-Brown (2000), menciona que estos procesos son independientes de la temperatura, en tanto Jacobsen (1989) y Bjorklund *et al.* (1992), afirman que son inversamente proporcionales. Por su parte, Jacobsen (1989), comprobó en trucha arco iris que el ácido oxolínico ante temperaturas bajas incrementa el tiempo de eliminación y por consiguiente impacta también en un mayor plazo de espera.

Tanto para nalidíxico como oxolínico, el desarrollo rápido de resistencia fue el principal inconveniente que limitó su utilización (Treves-Brown, 2000). El desarrollo de nuevos fármacos en el grupo motivó la incorporación de otras sustancias como la flumequina que desplazó progresivamente a los anteriores. Esta última, contiene un átomo de flúor en la posición 6 y es considerada una quinolona de segunda generación. La fluoración incrementa la potencia antibacteriana e incluye actividad contra bacterias Gram positivas y protozoos (Treves-Brown, 2000; Lunestad & Samuelsen, 2008). Este antimicrobiano posee un perfil cinético caracterizado por niveles elevados durante un tiempo razonablemente extenso y provee mayor biodisponibilidad que oxolínico (Treves -Brown, 2000; Samuelsen, 2006; Lunestad & Samuelsen, 2008; Miller, 2018).

Sohlberg *et al.* (1994), estudiaron la cinética de flumequine en trucha arco iris luego de la administración por vía intraarterial a 3 y 13°C. En las primeras 24 horas los niveles en plasma descienden rápidamente, atribuido a una rápida distribución tisular y en menor escala a la eliminación por branquias, hígado y riñón. El t<sub>1/2</sub>β se estableció en 52,5 y 10,3 horas a 3° y 13°C, respectivamente y el t<sub>1/2</sub>β de la fase

terminal fue de 569 y 137 horas a 3° y 13°C, justificado por un Clt que estuvo influenciado por la temperatura de los ensayos cuyos valores fueron de 0,005 y 0,018 L/h/kg con bajas y altas temperaturas, respectivamente (Sohlberg *et al.*, 1994).

El comportamiento cinético de flumequina luego de la aplicación oral en *O. mykiss* fue investigado por Sohlberg *et al.* (1994), quienes establecieron una C<sub>máx</sub> plasmática a las 54,5 horas y un t<sub>1/2β</sub> de 736 horas a 3°C, mientras que a 13°C los registros fueron a las 19,1 y 285 horas, respectivamente. Sohlberg *et al.* (1990), luego de la administración oral con temperaturas fluctuantes entre 1,8 y 6,8°C, detectaron niveles plasmáticos de flumequina de 0,45 µg/mL después de 600 horas.

Si bien no están aprobados para su uso en acuicultura en algunos países, enrofloxacin, difloxacin, sarafloxacin y danofloxacin exhiben un mejor efecto bactericida contra los patógenos más comunes (Martinsen *et al.*, 1992). Enrofloxacin es activa sobre *A. salmonicida* (Bowser & House, 1990) y presenta una vida media superior a otras quinolonas utilizadas en peces (Treves Brown, 2000; Della Rocca *et al.*, 2004), siendo este aspecto muy importante debido a la patogenicidad y el daño que provoca esta bacteria en salmónidos (Noga, 2010).

Luego de la aplicación intravenosa de enrofloxacin en *O. mykiss* a temperaturas de 17,9 y 11,2°C en verano e invierno, respectivamente, se observó que los niveles plasmáticos decayeron en forma biexponencial, el t<sub>1/2α</sub> fue de 0,5 y 0,83 horas y el Vd de 3,91 y 2,46 L/kg, respectivamente (Mancini, 2004). El t<sub>1/2β</sub> fue inferior a los 17,9°C (19,1 horas), producto de un mayor clearance (2,3 mL/min/kg), versus las 26,7 horas y 1,06 mL/min/kg a 11,2°C, resultados que demuestran la influencia de la temperatura en el comportamiento cinético (Mancini, 2004). Aun así, la variabilidad es un factor a tener en cuenta; en trucha marrón (*Salmo trutta fario*), con la misma dosis y a 10°C, se obtuvo un perfil semejante al provisto con temperatura más alta, t<sub>1/2β</sub> de 19,1 horas y un Cl de 140 mL/h/kg (Koc *et al.*, 2009).

En músculo de *O. mykiss*, Mancini (2004) determinó concentraciones de enrofloxacin elevadas que superaron los 5,5 µg/g, independiente de la temperatura, variable que si influyó en el período de resguardo que se estableció en 7,06 y 12,5 días, para verano e invierno respectivamente. En temporada estival (17,9°C), este autor reportó que luego de la administración del farmaco se produjo un C<sub>máx</sub> plasmático a las 6 horas y una biodisponibilidad del 45%.

En músculo y piel los niveles de enrofloxacin fueron de 7,4 y 5,8 µg/g a las 12 y 24 horas, respectivamente. En estas condiciones el TMR de enrofloxacin en plasma fue de 19,7 horas y muy prolongado para músculo (40,8 horas) y piel (253 horas). Para estos tejidos comestibles se estableció un período de resguardo de 10,7 y 68,7 días, respectivamente y el cociente músculo/plasma provisto por enrofloxacin en trucha arco iris es 14,5/1 (Mancini, 2004).

Con el mismo antimicrobiano, la aplicación oral a 15°C provocó biodisponibilidad del 42,4 %, un T<sub>máx</sub> a las 8 horas y TMR de 54,7 horas (Bowser *et al.*, 1992). Kyuchukova *et al.* (2015), con similar temperatura, determinaron una C<sub>máx</sub> plasmática a las 49,2 horas y un t<sub>1/2β</sub> de 78,8 horas. Los niveles máximos en músculo son alcanzados a las 52,8 horas. Comparando este estudio con los resultados obtenidos por Mancini (2004), se comprueba la influencia de la temperatura en el proceso de absorción y pasaje tisular de enrofloxacin en la especie.

Las modificaciones estructurales incluidas en la molécula de levofloxacin aportan mayor actividad frente a bacterias Gram negativas y mejoras en su biodisponibilidad (Ernest *et al.*, 1997). La administración endovenosa en *O. mykiss* determinó TMR de 34,4 horas (Salusso, 2008). Este autor reportó que la administración oral única de levofloxacin provee una C<sub>máx</sub> a las 3 horas, lo que denota una rápida absorción, una biodisponibilidad de un 62 %, un t<sub>1/2β</sub> de 96,5 horas y niveles del antimicrobiano en músculo y piel de 1,7 y 1,3 µg/g a las 24 y 48 horas, respectivamente.

En músculo el fármaco tuvo un tiempo medio de penetración de 1,87 horas, alcanzó la C<sub>máx</sub> a las 6 horas y el TMR de 28,7 horas; el cociente musculo plasma fue 0,93/1 (Salusso, 2008). En el mismo estudio, el tiempo de penetración en piel fue de 1,7 horas y la C<sub>máx</sub> se alcanzó en 1 hora. En este tejido, el TMR fue calculado en 96,4 horas.

El espectro de acción de sarafloxacin comprende varios gérmenes patógenos relevantes en acuicultura como *A. salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri* y *Edwardsiella ictaluri* (Wilson & MacMillan, 1990; Martinsen *et al.*, 1992; Stamm, 1992). Su farmacocinética fue evaluada en distintas especies; en salmónidos (*Salmo salar*) destacan que presenta dos características relevantes: elevada distribución tisular y prolongada vida media (Martinsen *et al.*, 1994).

En *O. mykiss* en un ensayo realizado a 12°C, tras la administración oral de sarafloxacin se informó un  $t_{1/2\beta}$  y TMR de 158 y 221,5 horas, respectivamente, en consonancia con el limitado clearance (0,046 L/kg/h) hallado en temperatura bajas (Stehly *et al.*, 1999) y altas concentraciones en músculo asociado con la carga lipídica que tiene este tejido en la especie y el carácter lipofílico del fármaco (Treves-Brown, 2000).

Danofloxacin, una fluoroquinolona de segunda generación en un ensayo realizado en trucha marrón (*S. trutta fario*) en dosis única aplicada por vía intravenosa a una temperatura fluctuante entre 10 y 13°C, mostró un  $t_{1/2\beta}$  y TMR de 22,22 y 23,15 horas, respectivamente, un clearance total de 0,07 mL/h/kg y un Vd de 2,28 L/kg (Corum *et al.*, 2018).

Respecto de marbofloxacin, se reportan estudios en carpa cruciana (*Carassius auratus*) (Zhu *et al.*, 2009), tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Shan *et al.*, 2017), pez gato (*Clarias lazera*) (El-Sayed *et al.*, 2019). Recientemente se estudió el perfil cinético de marbofloxacin en ejemplares de *O. mykiss* de 110 g de peso a una temperatura de 13°C luego de la aplicación única de marbofloxacin por las vías endovenosa y oral con ayuno previo de 12 horas. La aplicación intravenosa presentó un Vd de 0,5 L/Kg, un  $t_{1/2\beta}$  y un TMR de 18 y 22,9 horas, respectivamente. En tanto la vía oral ofreció una absorción del 38,1 %, alcanzó una  $C_{\text{máx}}$  en plasma a las 4 horas y un  $t_{1/2\beta}$  de 27,5 horas Corum *et al.* (2020).

En la carpa cruciana (*C. auratus*), marbofloxacin presenta una absorción oral rápida, genera un  $C_{\text{máx}}$  entre las 0,7 y 1,7 horas, variable en función de la temperatura. A 15°C, el  $t_{1/2\text{abs}}$  y los  $t_{1/2\alpha}$  fueron de 0,36 y 4,48 horas, respectivamente; mientras a 25° C fueron 0,23 y 0,87 horas, respectivamente. En esta especie, marbofloxacin ofreció un  $t_{1/2\beta}$  fue de 50,7 horas a 15 °C y de 25 horas a 25 °C. La  $C_{\text{máx}}$  difirió poco entre 15 (6,43 µg/mL) y 25 °C (8,36 µg/mL) y el aclaramiento total se calculó como 0,03 y 0,05 L/h/kg a 15 y 25 °C, respectivamente. Los resultados muestran también elevada concentración en la piel (16,2 µg/g), que duplica a la plasmática al finalizar el tratamiento (Zhu *et al.*, 2009). En el pez gato (*C. lazera*) luego de aplicar una dosis única por vía endovenosa observaron un  $t_{1/2\beta}$  de 7 horas y un Vd de 0,78 L/kg (El-Sayed *et al.*, 2019),

### 2.3.7. Vías de administración de antimicrobianos en acuicultura

La implementación de tratamientos para las enfermedades de peces es una práctica habitual. Existe una gran variedad de tratamientos según la naturaleza de la enfermedad, el sistema de cultivo y de diferentes características de la especie a tratar, principalmente ligadas al tamaño de los peces (juveniles o reproductores), valor comercial y cantidad, es decir si el tratamiento es individual o en grupo (sistemas intensivos). Se destacan los tratamientos con fármacos añadidos al agua, las vía oral, parenteral y el uso tópico (Sarti & Giorgetti, 1988; Park, 2012; Reimschuessel *et al.*, 2013; Miller, 2018), los mismos se detallan a continuación:

*Medicación en agua:* Medicar peces a través del agua es un método común y tradicional. Este tipo de terapia se utiliza para tratar problemas que involucran ectoparásitos y enfermedades bacterianas y micóticas. Son recomendados para medicamentos de bajo peso molecular que se pueden distribuir completamente en toda el agua de un contenedor. Los medicamentos son absorbidos por los peces a través del epitelio de las branquias, piel y mucosa. La tasa de absorción varía según las características del fármaco; los compuestos lipofílicos difunden con mayor facilidad, en tanto los de alto peso molecular tienen mayor dificultad, además la tasa de absorción también varía entre especies de peces (Treves-Brown, 2000; Noga, 2010; Park, 2012; Reimschuessel *et al.*, 2013; Miller, 2018)

Los antimicrobianos que se absorben adecuadamente desde el agua incluyen dihidroestreptomicina, enrofloxacina, ácido oxolínico, flumequina, eritromicina, kanamicina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina, sulfadimidina, sulfapiridina y trimetoprim. Mientras que lo hacen escasamente el cloranfenicol y la gentamicina (Treves-Brown, 2000; Reimschuessel *et al.*, 2013).

De acuerdo a Sarti y Giorgetti (1988), hay diferentes métodos para administrar soluciones al agua:

- a) Inmersión: pocos sujetos, permite poner en contacto al pez con una concentración alta del producto por tiempo reducido.
- b) Suministro en continuo: se añade el producto en la entrada de agua del sistema de producción, es poco utilizado debido a las dificultades que presenta.

c) Baño breve: es el método más utilizado y consiste en cerrar el ingreso y egreso de agua del contenedor por un tiempo determinado, la concentración del fármaco es mayor que en la inmersión.

d) Baño permanente: también es bastante utilizado y consiste en dejar al fármaco por tiempo indeterminado, el producto se elimina por inactivación química o por volatilización. Es una práctica común en acuarios comerciales.

*Oral:* los tratamientos orales son los más factibles para los grandes sistemas de acuicultura comercial porque son menos estresantes para los animales; sin embargo, se conjugan distintos factores que pueden comprometer la eficacia terapéutica:

a) Los peces enfermos pueden no comer o si lo hacen, ingieren menor cantidad de alimento, que resulta en una menor exposición a los antimicrobianos.

b) La ingesta, varía con el tamaño de los peces, los más grandes consumirán más alimento medicado que sus contrapartes más pequeñas y menos vigorosas.

c) La mala palatabilidad que poseen algunos fármacos agregados (sulfonamidas).

d) La absorción desde el tracto digestivo puede variar de una especie a otra en función de diferencias anatómicas e histológicas propias de las mismas.

e) Las características físico-químicas del agua, por ejemplo los peces de agua salada beben más que los de agua dulce para regular su fisiología (homeostasis), que en conjunto con la presencia de cationes (aguas duras) pueden afectar la biodisponibilidad.

f) La formulación del antimicrobiano puede influir incrementando o disminuyendo la absorción (Noga, 2010; Ranjan *et al.*, 2017; Kumar & Roy, 2017; Miller, 2018).

*Inyectables:* estos tratamientos se realizan en peces de mayor valor como reproductores y especies ornamentales. La manipulación física produce un estrés potencialmente significativo para el animal, que en muchos casos deriva en el uso de sedantes (Treves-Brown, 2000; Noga, 2010; Reimschuessel *et al.*, 2013; Miller, 2018). A pesar de ello, la ventaja de este método es asegurar que los animales reciban la dosis deseada. La administración puede ser intramuscular (en los músculos epaxiales, por encima de la línea lateral y debajo de la aleta dorsal),



intraperitoneal (con puntos de referencia de las aletas pélvicas y el ano; e intravascular (caudal a la aleta anal) (Noga, 2010; Kumar & Roy, 2017; Miller, 2018). De manera independiente al estrés que produce en los peces y al mayor trabajo que representa su aplicación, es el método mas eficaz concerniente al uso de antibióticos (Sarti & Giorgetti, 1988).

## CAPITULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Características del establecimiento y acondicionamiento del lugar de trabajo

El presente estudio se realizó en las instalaciones del criadero Boca de Río, ubicado aproximadamente a 12 Km al noreste de la ciudad de Villa Dolores, provincia de Córdoba (Argentina), dentro de las coordenadas geográficas 31° 54' 47" Latitud Sur y 65° 06' 48" Longitud Oeste (Figura 13).

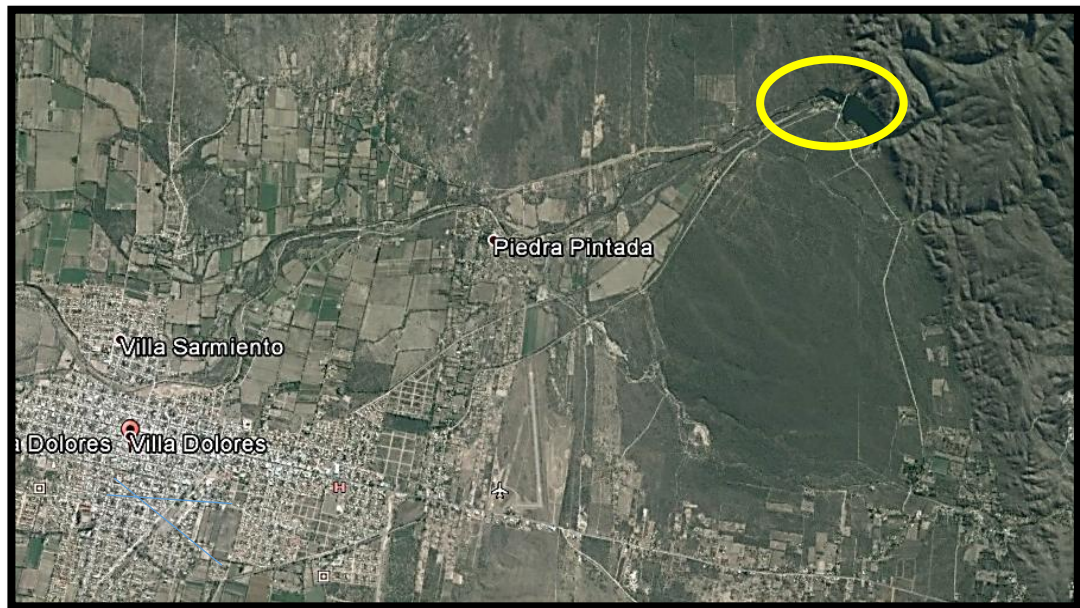


Figura 13: Ubicación geográfica del establecimiento Boca de Río

El establecimiento cuenta con instalaciones en las que se llevan a cabo todas las etapas de producción (cultivo), que abarcan desde la reproducción para la obtención de alevinos hasta la comercialización. Cuenta con estanques de cemento de distinta capacidad, abastecidos continuamente mediante un canal que lo conecta a un dique contiguo (Figura 14).

Para el trabajo se dispuso de un estanque de 10 x 1 x 1 metros de largo, ancho y altura respectivamente, que se subdividió en parcelas de 50 cm con separadores de PVC de 1 x 1 m con malla de nylon, para separar los diferentes grupos de peces hasta su faena en los tiempos prefijados. El nivel de agua se reguló a una altura de 50 cm, con un volumen constante de 5.000 L (Figura 15) y una tasa de renovación constante de agua.



Figura 14: Establecimiento Boca de Río (Córdoba, Argentina).



Figura 15: Estanque de trabajo y disposición de los marcos de PVC para separar los grupos de truchas.

### 3.2. Alimentación de los peces

Durante el desarrollo de las experiencias de verano e invierno, se suministró el alimento balanceado comercial que utiliza el establecimiento, correspondiente a la etapa de terminación, con alto contenido proteico, minerales y vitaminas. Con esto se evitan posibles cambios del proceso de digestión que puedan afectar finalmente al desarrollo de la investigación.

### 3.3. Procedimientos de trabajo comunes para invierno y verano

En cada estación se constató el estado sanitario del lote de peces, registrándose antecedentes sobre ocurrencia de patologías, uso de antimicrobianos u otro tipo de droga.

Se estableció un protocolo de trabajo que consistió en registrar el peso (balanza digital), longitud (ictiómetro) y posterior administración de marbofloxacina con los peces bajo anestesia con metomidato (Hypnodil®, Janssen) que ha sido utilizada con excelentes resultados en condiciones similares (Mancini, 2004), concentrada a 5 mg/L con el agua que abastece al establecimiento para no cambiar las condiciones de aclimatación de los animales. Se consideró anestesia al estado donde el pez permanece en decúbito lateral en el fondo del contenedor y sin presencia de reflejo de fuga al tomarlo del pedúnculo caudal.

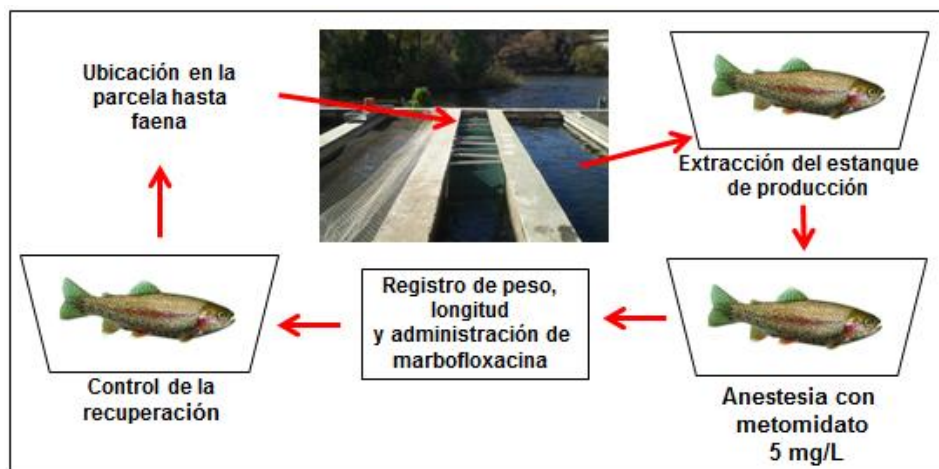


Figura 16: Esquema del flujo de trabajo.

Se conformaron en total 6 grupos de peces, 3 para invierno y 3 para verano, en cada estación se realizaron los procedimientos que se detallan a continuación:

*Vía endovenosa:* se conformaron al azar 12 lotes de 3 animales cada uno, a los que se les administró marbofloxacina en una dosis única de 2 mg/kg de una solución al 2 % (Marbocyl®, Vetoquinol, España), por vía endovenosa en la vena caudal, accediendo a la misma en un punto comprendido entre el extremo posterior de la aleta anal y el inicio de la aleta caudal sobre la línea media (Noga, 2010). Cada lote se sacrificó mediante aturdimiento por percusión, en los siguiente tiempos post aplicación: 0,08, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 horas; obteniéndose 2 mL de sangre por corte del pedúnculo caudal (Figura 17), en tubos heparinizados.

*Vía oral con ayuno:* se conformaron al azar 14 lotes de 3 animales cada uno, a los que se les administró marbofloxacina en una dosis única de 2 mg/kg de una solución al 2 % (Marbocyl®, Vetoquinol, España), por vía oral con una jeringa de tuberculina acoplada a una cánula gástrica, con un período de ayuno comprendido entre las 12 horas previas a la administración y 3 horas posteriores a la misma. Cada lote se sacrificó mediante aturdimiento por percusión, en los siguiente tiempos post aplicación: 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas; obteniéndose por corte del pedúnculo caudal 2 mL de sangre en tubos heparinizados. Simultáneamente se obtuvieron muestras de músculo y piel realizando cortes a lo largo de la masa muscular epaxial por debajo de la aleta dorsal (Figura 17).

*Vía oral sin ayuno:* se conformaron al azar 14 lotes de 3 animales cada uno, a los que se les administró marbofloxacina en una dosis única de 2 mg/kg de una solución al 2 % (Marbocyl®, Vetoquinol, España), por vía oral con una jeringa de tuberculina acoplada a una cánula gástrica, sin respetar período de ayuno. Cada lote se sacrificó mediante aturdimiento por percusión, en los siguiente tiempos post aplicación: 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas; obteniéndose por corte del pedúnculo caudal 2 mL de sangre. Simultáneamente se obtuvieron muestras de músculo y piel realizando cortes a lo largo de la masa muscular epaxial por debajo de la aleta dorsal (Figura 17).

Luego de la administración oral, los peces se mantuvieron en un contenedor para controlar la recuperación de la anestesia y la eventual regurgitación, para

finalmente ubicarlos en la parcela correspondiente hasta el tiempo de faena (Figura 15).

Las muestras de sangre se colectaron en tubos estériles con heparina (Laboratorio Northia) y fueron centrifugadas a 1200 g por 5 minutos para separar el plasma. El volumen de plasma obtenido se fraccionó en dos partes en tubos Eppendorf, uno con 150  $\mu$ L para procesar y el resto como reserva de resguardo; cada muestra se rotuló con el correspondiente tiempo de extracción, vía de administración, estación del año y número de animal muestreado, sin aditivos.

De la muestra extraída con piel y músculo, se separaron ambos tejidos y se pesaron 150 mg de cada uno, depositándolos en tubos Eppendorf. El resto se dispuso en bolsas plásticas con su correspondiente identificación, conservando todo el material a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

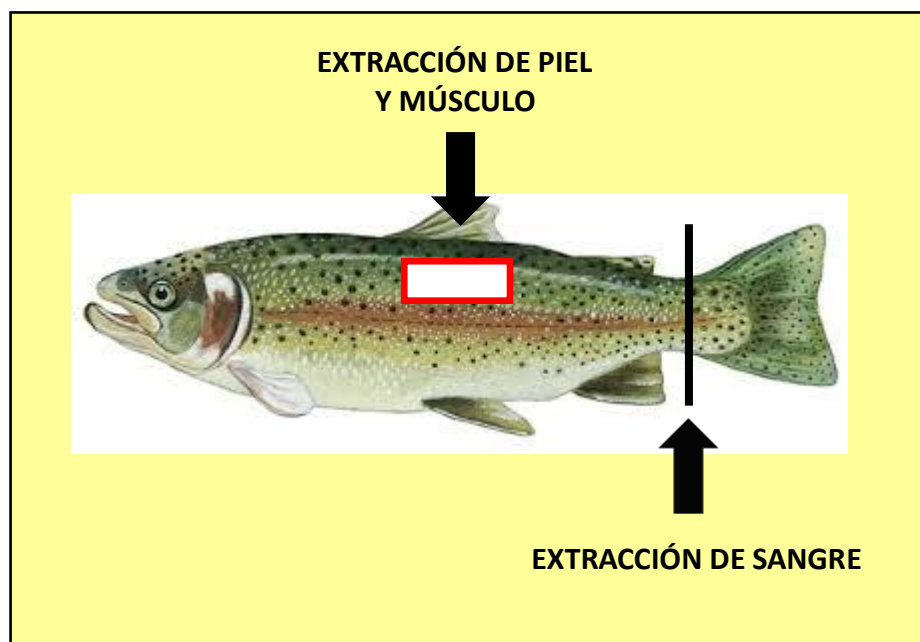


Figura 17: Lugares de extracción de muestras: músculo, piel y sangre.

### 3.4. Aspectos éticos en la obtención de muestras

El sacrificio mediante aturdimiento por percusión, es aceptado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en el Código Sanitario para los Animales Acuáticos - Capítulo 7.3 (2014, 2017), citado por Johnston & Jungalwalla

(2008) y por Rubio Limonta & Silveira Coffigny (2009) para salmónidos, que también es considerado por la Comunidad Económica Europea (Close *et al.*, 1986).

### 3.5. Registro de peso y longitud de los lotes de invierno y verano

Para registrar el peso de las truchas se utilizó una balanza Ohaus Scout II con una precisión de 0,1 g. El registro de la longitud se llevó a cabo con un ictiometro graduado en mm, tomando la longitud total de cada animal estimada desde el extremo del anterior del hocico hasta el extremo posterior del lóbulo más largo de la aleta caudal, con los radios extendidos hasta su posición natural como se puede observar en la Figura 18 (Rojo, 1988; Mancini, 2004).

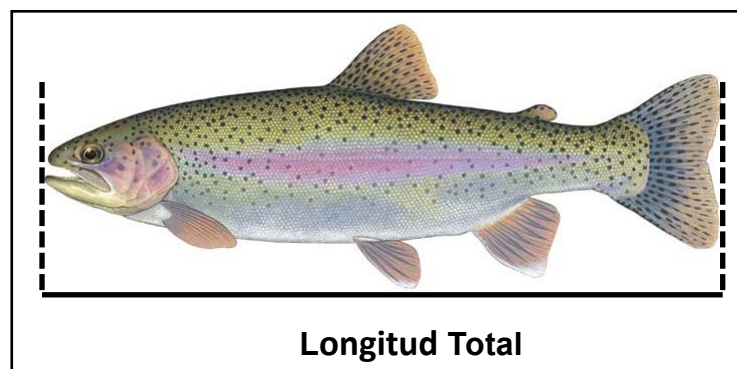


Figura 18: Medición de la longitud total en la trucha arco iris.

Los valores de peso y longitud total de cada grupo se utilizaron para determinar el Factor de condición de Fulton (K), que permite estimar modificaciones temporales del estado de los peces bajo la influencia de factores externos (ambiente) e internos (fisiológicos), para determinar el grado de bienestar o robustez de la especie (Neumann *et al.*, 2013), a partir de la fórmula:

$$K = 100 \times W/L^3$$

dónde: W = peso corporal en gramos y L = Longitud total en centímetros

### 3.6. Condiciones de pH, temperatura y oxígeno disuelto en el agua

Los datos de pH se registraron con un equipo Altronix, estandarizado con solución buffer pH 7, la temperatura con un termómetro digital y el oxígeno disuelto



en agua con un oxímetro Lutrón 5510. Todos los instrumentos fueron calibrados siguiendo las especificaciones de los fabricantes. Los registros de las tres variables se tomaron tres veces al día.

### **3.7. Soluciones**

-Se prepararon soluciones stock utilizando marbofloxacin (Laboratorio Guobang Pharma, China, 98% de pureza) y enrofloxacin (Laboratorio Chile, 99,9% pureza), disolviendo ambas en metanol (Laboratorio Baker), aforándolas en matraces a 100 mL para obtener una concentración final de 100 µg/mL. Ambas soluciones se sonicaron por 10 minutos para asegurar la completa disolución, conservándolas resguardadas de la luz y a una temperatura de 4°C. A partir de las soluciones stock, se confeccionaron diariamente diluciones en agua deionizada, utilizadas para los estándares de calibración y recuperabilidad.

-Solución homogenizadora (SH), para el tratamiento de las muestras de piel y músculo, se preparó diariamente una solución compuesta por agua deionizada (Laboratorio Biopack), metanol y ácido perclórico (Laboratorio Biopack), en una proporción 50:50:2, respectivamente (Böttcher *et al.*, 2001).

-Fase móvil, Se elaboró a partir de una mezcla de agua deionizada, acetonitrilo (Laboratorio Baker) y trietilamina (Laboratorio Sintorgan), en una proporción (79:19:1 v/v/v) respectivamente, ajustada a pH 3 con ácido ortofosfórico (Laboratorio Sintorgan) y filtrada con filtro de nylon de 0,22 µ mediante bomba de vacío.

### **3.8. Equipos y Materiales de Laboratorio**

Equipo de cromatografía líquida de alta presión Hewlett-Packard, serie 1050, inyector manual Rheodyne, dotado de bomba cuaternaria y desgasificador de fase móvil en línea, computadora con placa y programa para control del equipo, adquisición y procesamiento de los datos e impresión de los cromatogramas; columna C-18 Agilent octadecilsilano, 5 µm, de 25 cm y precolumna Phenomenex.

Equipo Orión 410A, para medición de pH, con las respectivas soluciones de calibración, buffer patrón pH 4,0 y pH 7,0 (Laboratorio Biopack).

Balanza Ohaus Explorer, sensibilidad 0,0001g.

Sonicador Ultrasonic Cleaner PS-10A

Centrífuga refrigerada Presvac EPF-12R, régimen 14.000 rpm.

Homogenizador de muestras Dremel 4000, motor de 30000 rpm, con cuchilla de acero inoxidable.

Heladera y freezer para la mantención de muestras.

Micropipetas Nichipet de 200 y 1000  $\mu$ L de capacidad, pipetas de vidrio, matraces aforados, erlenmeyers, probetas graduadas, filtros de nylon 22 $\mu$ , tubos Eppendorf, jeringa Hamilton de 100  $\mu$ L, bomba de vacío con equipo de filtrado, jeringas y agujas.

### **3.9. Software**

Para el procesamiento de datos se empleó el programa farmacocinético PK Solution 2.0 Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis (Farrier, 1999), para el cálculo del período de retiro el software WT 1.4 (Hekman, 1996) y el programa Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Software Inc., 2012) para análisis estadísticos y confección de gráficos.

### **3.10. Tratamiento de muestras**

#### **Plasma**

Cada muestra se preparó en un tubo Eppendorf con 150  $\mu$ L de plasma problema, 150  $\mu$ L de agua deionizada, 20  $\mu$ L de una solución de 2,5  $\mu$ g/mL de EFX como standard interno y 600  $\mu$ L de metanol; el conjunto fue sometido a 45 segundos de vortex, permaneciendo luego en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente y finalmente centrifugado a 14.000 rpm a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante se filtró con membrana de nylon de 22  $\mu$ m y 23 mm de diámetro y se transvasó a un nuevo tubo Eppendorf, listo para eluir en el cromatógrafo.

#### **Músculo y piel**

El procedimiento fue similar para ambos tejidos, se incorporaron en un tubo Eppendorf 150 mg de músculo o de piel, 150  $\mu$ L de agua deionizada, 20  $\mu$ L de una

solución de 2,5 µg/mL de EFX como standard interno y 600 µL de SH; el conjunto fue homogeneizado a 30,000 rpm y luego sometido a 30 segundos de vortex. Las muestras tratadas permanecieron en reposo por el término de una hora a temperatura ambiente, luego se las mantuvo en heladera a 4°C por 12 horas. Finalmente se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 30 minutos, el sobrenadante se filtró con membrana de nylon de 22 µm y 23 mm de diámetro y se trasvasó a un nuevo tubo Eppendorf, listo para eluir en el cromatógrafo.

### **3.11. Muestras para las curvas de calibración y recuperabilidad**

Se tomaron muestras de sangre, músculo y piel de un pool de reserva de animales del cultivo, libres de tratamiento con antimicrobianos. Se elaboraron soluciones para los estándares de calibración y recuperabilidad, en concentraciones de 0,0012; 0,0024; 0,0048; 0,0097; 0,0195; 0,039; 0,078; 0,156; 0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5 y 10 µg/mL de marbofloxacin en agua deionizada.

### **3.12. Procedimiento de separación y cuantificación**

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

La lectura del detector de fluorescencia se ajustó a 490 nm de emisión y 295 nm de excitación y fase móvil compuesta de agua deionizada, acetonitrilo y trietilamina, en una proporción (79:19:1 v/v/v) respectivamente, ajustada a pH 3 con ácido ortofosfórico.

### **3.13. Validación del método analítico**

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

*Linealidad:* es la capacidad de un método analítico de producir resultados que sean directamente o por medio de una transformación matemática definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra (Thompson *et al.*, 2002). Se utilizaron muestras de plasma, músculo y piel adicionadas con distintas concentraciones de marbofloxacina. Se determinó el grado de ajuste de los valores de índice de área y sus respectivos estándares de calibración a una línea recta mediante una regresión lineal entre variables, método que permite garantizar la confiabilidad de las curvas de calibración. Se aceptó un coeficiente de determinación ( $r^2$ )  $\geq 0,99$  (Thompson *et al.*, 2002).

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

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

*Precisión:* se define como el grado de coincidencia entre los resultados de pruebas independientes obtenidas de material de prueba homogéneo bajo condiciones estipuladas de uso. En este ítem se consideran la reproducibilidad que es la variabilidad analítica entre diferentes laboratorios y la repetibilidad o variabilidad de análisis repetidos dentro de un mismo laboratorio, que consisten en procedimientos para evaluar la variabilidad de los ensayos intradía e interdía (PROSAIA, 2013a).

No se consideró necesario determinar la reproducibilidad (precisión entre laboratorios) para realizar el estudio de eliminación de residuos, ya que el laboratorio que desarrolla el método es el mismo que lleva a cabo el ensayo con las muestras del estudio de residuos (PROSAIA, 2013a).

Se consideró adecuado, determinar la repetibilidad intradía e interdía como parte del procedimiento de validación, la que se realizó mediante la evaluación de repeticiones en tres concentraciones diferentes, que representan el rango de validación objetivo del análisis según lo citado por PROSAIA (2013a).

El ensayo intradía, consistió en la elusión por sextuplicado de los estándares de calibración, considerándolo aceptable cuando el coeficiente de variación (CV)

entre elusiones, respecto a tiempos de retención, altura y área de los picos en los cromatogramas fue  $\leq 2\%$ .

El ensayo interdía, se llevó a cabo eluyendo los estándares de calibración en ensayos efectuados en seis días diferentes, considerando aceptable un  $CV \leq 3\%$ , aun cuando pueden llegar a aceptarse variaciones hasta del 15% (FDA, 2018).

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

$$LD = (\sigma \times 3,3) / S$$

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

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

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

### **3.14. Cálculo de las concentraciones en plasma, músculo y piel**

#### **Procedimiento para cada muestra**

Con el cromatograma obtenido en la corrida de la muestra del ensayo cinético y con el patrón de concentración conocido, se obtuvo un cociente tomando el valor del área de pico de la droga evaluada y el estándar interno correspondiente. A partir de este cociente se determinaron las concentraciones plasmáticas y tisulares

de MBFX por regresión lineal simple, según Nouws & Ziv (1976), mediante la fórmula:

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

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

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

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

### 3.15. Análisis farmacocinético

Con los valores de cada muestra por tiempo, se obtuvo un valor promedio para el cálculo de la concentración final de MBFX en plasma y tejidos según en función del tiempo.

El programa cinético PK Solution 2.0 se empleó para el análisis farmacocinético individual en plasma y tejidos, a partir de los promedios de concentraciones de marbofloxacin para cada tiempo, dosis y peso del pez en el trabajo. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos robustos indispensables para valorar la disposición de marbofloxacin: vida media ( $t_{1/2\beta}$ ), concentración a tiempo cero ( $C_0$ ), volumen de distribución ( $V_d$ ), clearance ( $Cl$ ), área bajo la curva (ABC), concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), tiempo para alcanzar concentración máxima ( $T_{m\acute{a}x}$ ) y tiempo de residencia media (TMR).

### 3.16. Integración farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD)

Para la integración PK/PD se tomaron como referencia los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) sugeridos por Corum *et al.* (2020), únicos para marbofloxacin en la bibliografía internacional. Los valores de CIM para marbofloxacin contra *Yersinia ruckeri*, *A. hydrophila*, *Pseudomona fluorescens* y *Pseudomona putida*, aislados de trucha arco iris fueron 0,02; 2,5; 2,5 y 5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Corum *et al.*, 2020).

### 3.17. Cálculo del período de resguardo

Se denomina así, al período de tiempo mínimo que debe transcurrir entre la última aplicación de un medicamento a un animal, en las condiciones normales de empleo y la obtención de productos alimenticios de dicho animal, que garanticen no contener residuos en cantidades que superen los límites máximos establecidos (Prosaia, 2013a). Se calculó mediante el software WT1.4 (Hekman, 1996), utilizado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), se tomó como base el promedio de las concentraciones de MBFX hasta las 120 horas, aplicando el método “Tiempo hasta concentración segura” (TTSC).

Como la mayoría de los ectotermos, la trucha arco iris no tiene capacidad para regular su temperatura corporal, por lo que ésta permanece similar a la del medio donde habita. 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). Este 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 (°C), por un período de “n” días y puede expresarse en grados/día, en base a la fórmula (Ghezzi Solís *et al.*, 2014):

$$\sum T^{\circ}x = T^{\circ}x_1 + T^{\circ}x_2 + T^{\circ}x_n, \text{ donde:}$$

$\sum T^{\circ}x$ : Sumatoria de la temperatura promedio diaria

$T^{\circ}x_1$ : Temperatura promedio día 1

$T^{\circ}x_2$ : Temperatura promedio día 2

$T^{\circ}x_n$ : Temperatura promedio día n

Para el cálculo del 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 espera previos a la faena de los mismos. El objetivo es asegurar que el residuo de la droga esté por debajo del límite indicado como seguro en los tejidos del pez (Martinsen *et al.*, 1992; Lees & Aliabadi, 2002; Luchetti *et al.*, 2004). 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.

## CAPITULO IV. RESULTADOS



#### 4.1. Estado Sanitario y administración de medicamentos

Al inicio de cada temporada de trabajo, según lo informado por el propietario del establecimiento, no se registraron patologías como así tampoco se administró previamente medicamento alguno a los ejemplares de trucha arco iris utilizados para el presente estudio.

#### 4.2. Administración de marbofloxacina, registro de peso y longitud, resultados de la anestesia

La manipulación de los peces para administrar marbofloxacina, registrar peso y longitud, se llevaron a cabo bajo anestesia, sin que se produjeran muertes.

#### 4.3. Peso de los lotes de invierno y verano

En la tabla 2, se muestran los resultados de los pesos promedio ( $\pm$  D.E.), de los grupos conformados en invierno y verano.

Estación	Vía de administración	Peso ( $\pm$ D.E.) gr.	(n)
Invierno	Endovenosa	330,8 $\pm$ 28,0	39
Invierno	Oral con ayuno	326,8 $\pm$ 30,6	42
Invierno	Oral sin ayuno	332,7 $\pm$ 28,6	42
Verano	Endovenosa	345,7 $\pm$ 34,5	39
Verano	Oral con ayuno	326,3 $\pm$ 23,7	42
Verano	Oral sin ayuno	327,8 $\pm$ 31,8	42

Tabla 2: Peso ( $\pm$  D.E.) y número de peces por lote (n), según estación.

#### 4.4. Tasa de recambio

Las mediciones del ingreso de agua a lo largo del trabajo, arrojaron una tasa de recambio total del contenedor de 2,2 (11.000 litros/hora).

#### 4.5. Características del agua

Los valores de pH, temperatura y oxígeno disuelto en invierno, se muestran en la Tabla 3 y los de verano en la Tabla 4.

Invierno									
Parámetro	Temperatura (°C)			pH			O <sub>2</sub> Disuelto (mg/L)		
Registro	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Día 1	12,1	12,2	12,1	6,57	6,61	6,54	8,3	8,3	8,0
Día 2	12,3	12,1	12,1	6,54	6,62	6,60	8,1	8,3	8,4
Día 3	12,0	12,1	12,0	6,52	6,50	6,59	8,4	8,2	8,4
Día 4	12,1	12,1	12,0	6,61	6,51	6,59	8,4	8,2	8,2
Día 5	12,2	12,1	12,1	6,51	6,58	6,52	8,2	8,1	8,2
Día 6	12,2	12,1	12,1	6,50	6,65	6,62	8,1	8,2	8,2
<b>X ± DE</b>	12,1 ± 0,08			6,56 ± 0,04			8,23 ± 0,11		

Tabla 3: Valores de temperatura, pH y oxígeno disuelto del agua en invierno  
Referencias: (1) Mañana, (2) Mediodía, (3) Tarde.

Verano									
Parámetro	Temperatura (°C)			pH			O <sub>2</sub> Disuelto (mg/L)		
Registro	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Día 1	19,0	19,0	19,0	6,61	6,60	6,68	7,7	7,6	7,7
Día 2	19,0	19,0	19,2	6,71	6,61	6,69	7,9	7,7	7,8
Día 3	19,0	19,0	19,0	6,60	6,60	6,67	7,8	7,7	7,8
Día 4	18,9	19,0	19,1	6,70	6,61	6,69	7,7	7,8	7,9
Día 5	19,2	19,1	19,1	6,69	6,60	6,60	7,8	7,7	7,8
Día 6	19,0	19,1	19,1	6,67	6,70	6,61	7,8	7,7	7,7
<b>X ± DE</b>	19,04 ± 0,08			6,64 ± 0,04			7,75 ± 0,08		

Tabla 4: Valores de temperatura, pH y oxígeno disuelto en agua en verano  
Referencias: (1) Mañana, (2): Mediodía, (3): Tarde.

Los resultados, indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de acuerdo a la Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes para los tres parámetros evaluados en ambas estaciones.

#### 4.6. Factor de condición de Fulton (K)

Los resultados de verano e invierno del test de condición, se observan en las Tablas 5 y 6.

Época		Verano		
Vía	Peso (g) ( $\pm$ DE)	Longitud Total (cm)	K	
EV	345,7 $\pm$ 34,5	29,7 $\pm$ 1,0	1,31	
ORAL c/Ayuno	326,3 $\pm$ 23,7	29,06 $\pm$ 0,9	1,32	
ORAL s/Ayuno	327,8 $\pm$ 31,8	29,54 $\pm$ 1,7	1,27	

Tabla 5: Resultados del factor de condición de Fulton en verano.

Época		Invierno		
Vía	Peso (g) ( $\pm$ DE)	Longitud Total (cm)	K	
EV	330,8 $\pm$ 28,0	29,3 $\pm$ 0,8	1,31	
ORAL c/Ayuno	326,8 $\pm$ 30,6	29,4 $\pm$ 0,8	1,27	
ORAL s/Ayuno	332,70 $\pm$ 28,6	29,5 $\pm$ 1,4	1,28	

Tabla 6: Resultados del factor de condición de Fulton en invierno.

#### 4.7. Validación de la técnica

En la Tabla 7 se indican los resultados de los ensayos de linealidad en plasma, músculo y piel

Matriz	Rango de concentración (µg/mL)	A	b	r <sup>2</sup>
Plasma	0,0024-10	-1,907	1,602	0,9927
Músculo	0,0024-2.5	-0,03568	1,539	0,9968
Piel	0,0024-5	-0,03074	0,5339	0,9960

Tabla 7: Ensayos de linealidad en plasma, músculo y piel.

Referencias: A: intercepto, b: pendiente de la regresión, r<sup>2</sup>: coeficiente de determinación.

#### 4.8. Recuperabilidad y precisión en las distintas matrices

En la Tabla 8 se muestran los resultados de Recuperabilidad y de precisión intradía e interdía para plasma, músculo y piel, respectivamente.

Matriz	Recuperabilidad (%)	Precisión	
		Intra-día (%CV)	Inter-día (%CV)
Plasma	84,98 ± 8,49	1,87 ± 0,97	0,8 ± 0,27
Músculo	86,3 ± 1,46	1,16 ± 0,42	1,92 ± 0,76
Piel	92,0 ± 2,00	0,94 ± 0,38	1,22 ± 0,64

Tabla 8: Recuperabilidad y precisión de marbofloxacina en plasma, músculo y piel.

#### 4.9 Límites de detección y cuantificación

La Tabla 9 indica los valores del límite de detección y del límite de cuantificación de marbofloxacina en las diferentes matrices.

Matriz	LD	LQ
Plasma ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,011	0,034
Músculo ( $\mu\text{g/g}$ )	0,064	0,00196
Piel ( $\mu\text{g/g}$ )	0,0125	0,037

Tabla 9: Límites de Detección (LD) y de Cuantificación (LQ) en plasma, músculo y piel.

#### 4.10. Resultados de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía EV, en verano e invierno

En la Tabla 10 y Figura 19 se muestran la evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin en verano e invierno y en la Tabla 11 los parámetros cinéticos robustos.

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

Tabla 10: Concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía EV (2 mg/kg), en verano e invierno (s/d: sin datos).

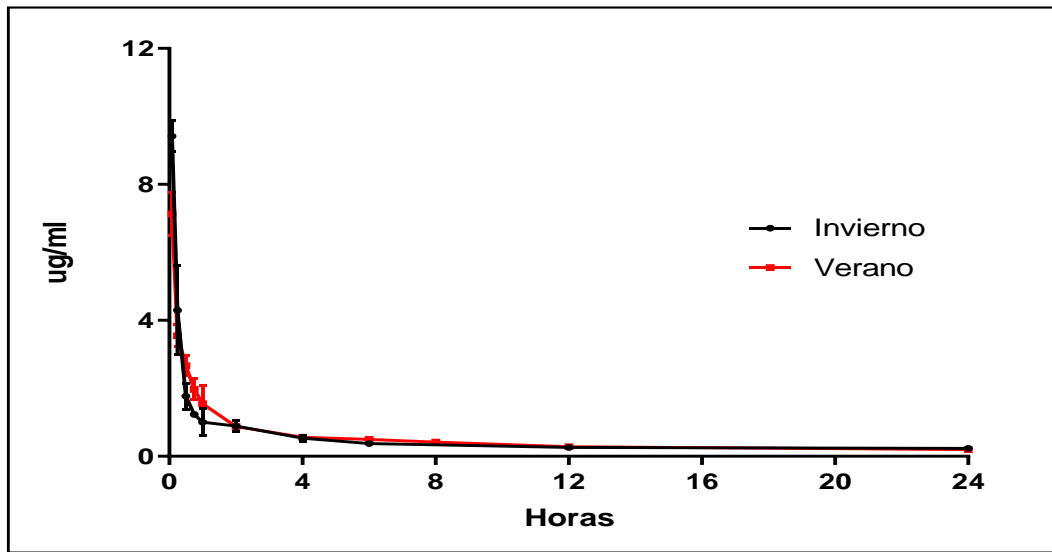


Figura 19: Concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía EV (2 mg/kg), en verano e invierno.

Parámetro	Invierno	Verano
Co ( $\mu\text{g/mL}$ )	9,42	7,13
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,20	0,47
ABC ( $\mu\text{g-hr/mL}$ )	15,9	15,6
$t_{1/2\beta}$ (h)	13,36	12,89
TMR (h)	17,1	14,4
Vd (L/kg)	2,42	2,39
Cl (mL.min/kg)	2,10	2,14

Tabla 11: Parámetros farmacocinéticos en plasma para marbofloxacin por vía EV (2 mg/kg), en verano e invierno.

Referencias: Co: concentración máxima observada,  $t_{1/2\alpha}$ : vida media de distribución; ABC: área bajo la curva,  $t_{1/2\beta}$ : vida media de eliminación, TMR: tiempo medio de residencia, Vd: volumen de distribución, Cl: clearance.

#### 4.11 Resultados de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía oral con y sin ayuno, en verano e invierno

El resultado de la evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin en verano e invierno, luego de la administración oral, con y sin ayuno, se reflejan en la Tabla 12 y en las Figuras 20 y 21.

<b>Concentraciones plasmáticas de marbofloxacin</b>				
	<b>Verano</b>		<b>Invierno</b>	
<b>Tiempo (h)</b>	<b>s/ayuno</b>	<b>c/ayuno</b>	<b>s/ayuno</b>	<b>c/ayuno</b>
<b>0,25</b>	0,021 ± 0,001	0,022 ± 0,002	0,017 ± 0,000	0,018 ± 0,001
<b>0,5</b>	0,027 ± 0,000	0,024 ± 0,000	0,018 ± 0,000	0,021 ± 0,003
<b>0,75</b>	0,031 ± 0,007	0,047 ± 0,012	0,019 ± 0,002	0,026 ± 0,005
<b>1</b>	0,034 ± 0,002	0,050 ± 0,009	0,021 ± 0,000	0,037 ± 0,003
<b>2</b>	0,043 ± 0,005	0,055 ± 0,017	0,024 ± 0,000	0,056 ± 0,036
<b>4</b>	0,044 ± 0,009	0,188 ± 0,098	0,033 ± 0,000	0,066 ± 0,011
<b>6</b>	0,092 ± 0,036	0,672 ± 0,268	0,058 ± 0,010	0,189 ± 0,020
<b>8</b>	0,271 ± 0,102	0,693 ± 0,063	0,209 ± 0,017	0,296 ± 0,041
<b>12</b>	0,063 ± 0,008	0,120 ± 0,048	0,103 ± 0,029	0,186 ± 0,020
<b>24</b>	0,040 ± 0,008	0,071 ± 0,018	0,099 ± 0,008	0,174 ± 0,013
<b>48</b>	0,039 ± 0,017	0,058 ± 0,098	0,049 ± 0,005	0,046 ± 0,006
<b>72</b>	0,012 ± 0,003	0,012 ± 0,001	0,031 ± 0,008	0,039 ± 0,006

Tabla 12: Concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía oral (2 mg/kg), en verano e invierno, con y sin ayuno.

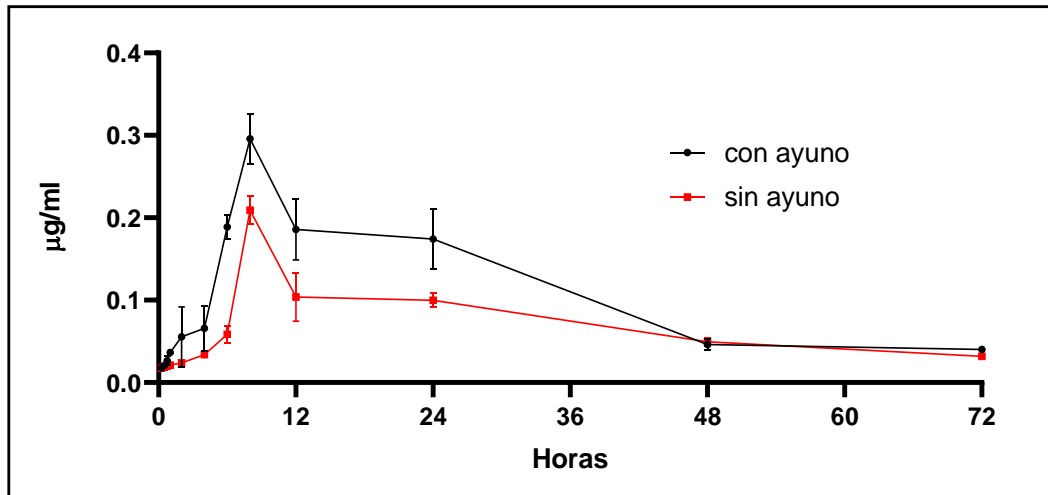


Figura 20: Concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía oral (2 mg/kg), en invierno.

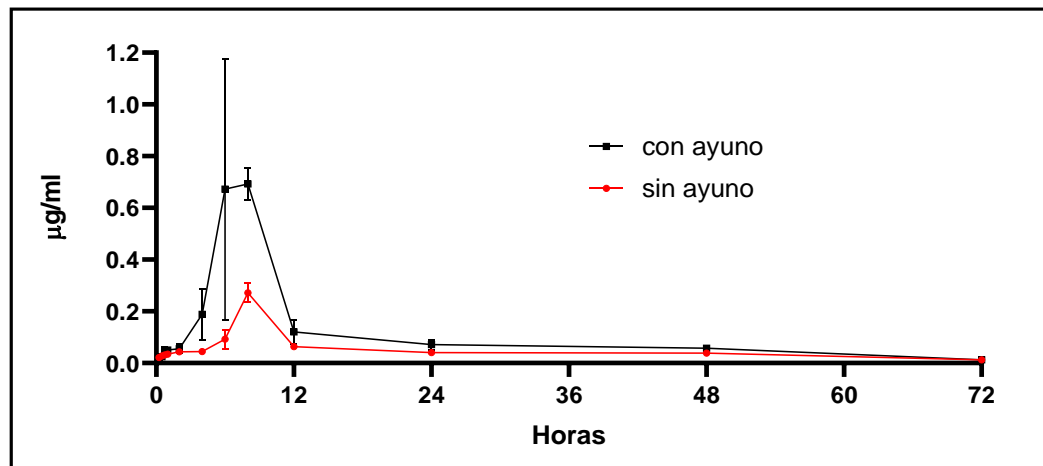


Figura 21: Concentraciones plasmáticas de marbofloxacin por vía oral (2 mg/kg), en verano.



En la Tabla 13 se muestran los parámetros farmacocinéticos en plasma luego de la administración oral con y sin ayuno en ambas temporadas

Parámetro	Verano		Invierno	
	c/ayuno	s/ayuno	c/ayuno	s/ayuno
<b>t<sub>1/2</sub>abs (h)</b>	0,9	2,2	3,8	4,6
<b>t<sub>1/2</sub>α (h)</b>	0,96	2,1	3,04	4,2
<b>t<sub>1/2</sub>β (h)</b>	27,8	27,5	21,1	24,1
<b>C<sub>máx</sub> (μg/mL)</b>	0,693	0,271	0,296	0,209
<b>T<sub>máx</sub> obs</b>	8	8	8	8
<b>TMR (h)</b>	28,4	46,3	34,1	39,5
<b>ABCárea (μg-h/mL)</b>	8,6	4,7	8,8	5,4
<b>F (%)</b>	55,1	30,1	55,3	33,9

Tabla 13: Parámetros farmacocinéticos en plasma para marbofloxacina por vía oral (2 mg/kg), en verano e invierno.

Referencias: t<sub>1/2</sub>abs: tiempo medio de absorción; t<sub>1/2</sub>α: tiempo medio de distribución; t<sub>1/2</sub>β: vida media de eliminación (h); C<sub>máx</sub> obs: concentración máxima observada, T<sub>máx</sub> obs: Tiempo a la concentración máxima; TMR: tiempo medio de residencia; ABC: área bajo la curva; F: biodisponibilidad.

#### 4.12. Resultados de las concentraciones en músculo por vía oral con y sin ayuno, en verano e invierno

En la Tabla 14 y en las Figuras 22 y 23 se refleja la evolución de las concentraciones de marbofloxacin en musculo observadas en la temporadas estival e invernal.

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

Tabla 14: Concentraciones de marbofloxacin en músculo, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en verano e invierno.

Referencias: (n/d): no detectable; (\*\*): muestra desechada.

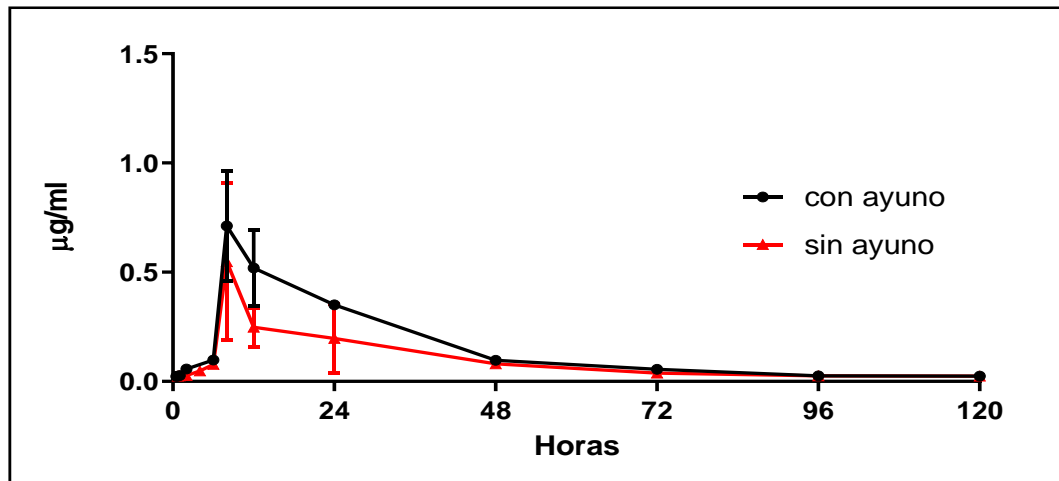


Figura 22: Concentraciones de marbofloxacin en músculo, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en invierno.

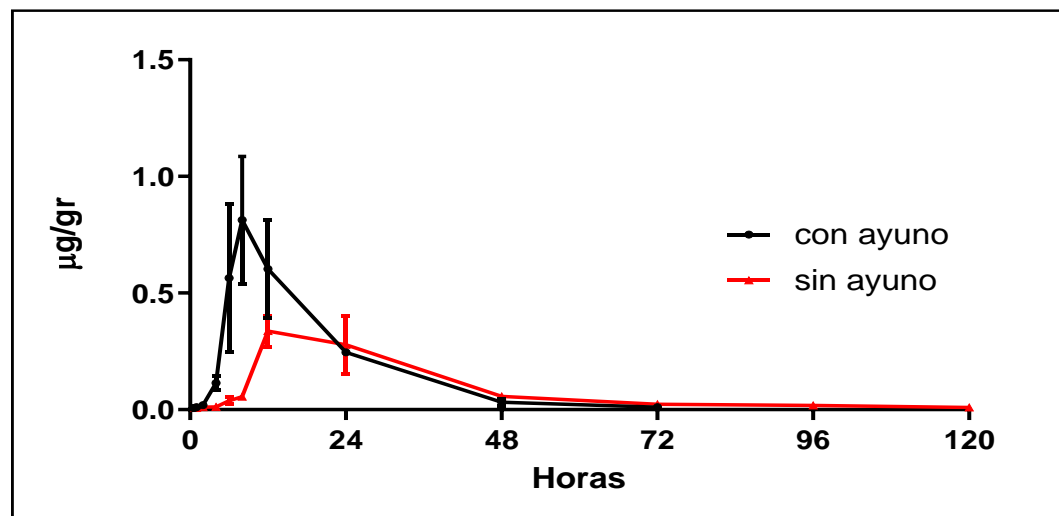


Figura 23: Concentraciones de marbofloxacin en músculo, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en verano.

#### 4.13. Resultados de las concentraciones en piel por vía oral con y sin ayuno, en verano e invierno

En la Tabla 15 y en las Figuras 24 y 25 se observa la evolución de las concentraciones de marbofloxacin luego de la administración oral, con y sin ayuno previo.

<b>Concentraciones de marbofloxacina en piel</b>				
	<b>Verano</b>		<b>Invierno</b>	
<b>Tiempo (h)</b>	<b>s/ayuno</b>	<b>c/ayuno</b>	<b>s/ayuno</b>	<b>c/ayuno</b>
<b>0,08</b>	(n/d)	(n/d)	(n/d)	(n/d)
<b>0,25</b>	(n/d)	0,068 ± 0,001	(n/d)	0,024 ± 0,000
<b>0,5</b>	0,026 ± 0,003	0,127 ± 0,086	0,023 ± 0,000	0,025 ± 0,001
<b>0,75</b>	0,027 ± 0,000	0,247 ± 0,167	0,024 ± 0,000	0,028 ± 0,002
<b>1</b>	0,030 ± 0,004	1,240 ± 0,520	0,027 ± 0,001	0,038 ± 0,003
<b>2</b>	0,030 ± 0,002	1,515 ± 0,574	0,028 ± 0,002	1,060 ± 0,816
<b>4</b>	0,047 ± 0,008	1,744 ± 0,917	0,029 ± 0,001	1,390 ± 0,149
<b>6</b>	0,567 ± 0,333	1,783 ± 0,323	0,054 ± 0,008	0,668 ± 0,136
<b>8</b>	0,799 ± 0,509	2,294 ± 1,937	0,356 ± 0,134	0,383 ± 0,197
<b>12</b>	0,589 ± 0,514	0,817 ± 0,368	0,357 ± 0,240	0,292 ± 0,058
<b>24</b>	0,151 ± 0,073	0,578 ± 0,165	0,220 ± 0,173	0,176 ± 0,046
<b>48</b>	0,095 ± 0,023	0,388 ± 0,201	0,156 ± 0,031	0,087 ± 0,003
<b>72</b>	0,063 ± 0,010	0,157 ± 0,043	0,117 ± 0,018	0,036 ± 0,007
<b>96</b>	(n/d)	0,071 ± 0,000	0,057 ± 0,013	0,031 ± 0,004
<b>120</b>	(n/d)	0,062 ± 0,002	0,056 ± 0,009	0,027 ± 0,004

Tabla 15: Concentraciones de marbofloxacina en piel, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en verano e invierno.  
Referencias: (n/d): no detectable.

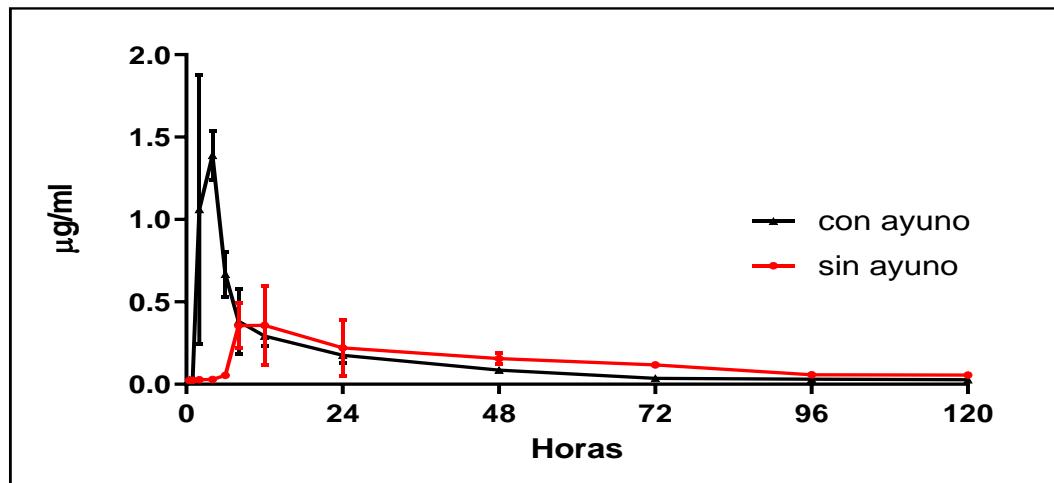


Figura 24: Concentraciones de marbofloxacin en piel, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en invierno.

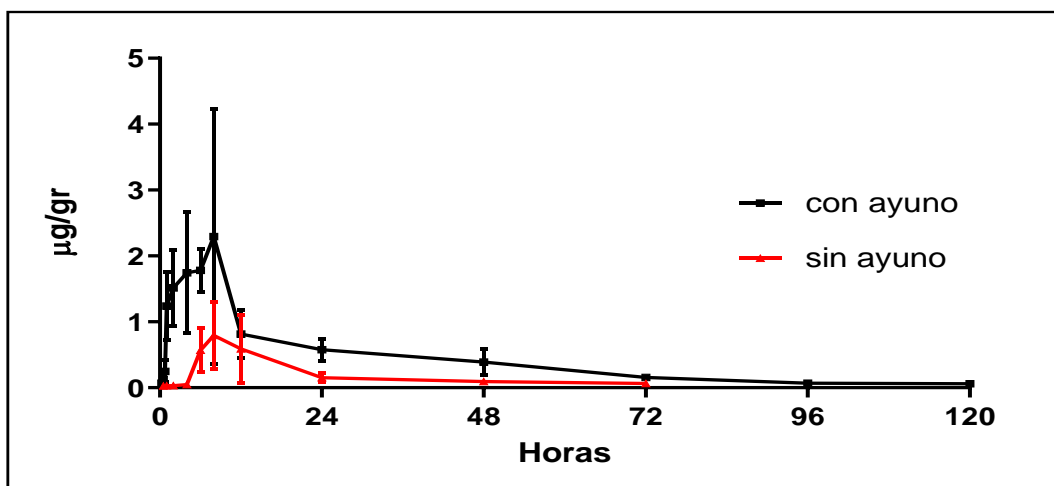


Figura 25: Concentraciones de marbofloxacin en piel, por vía oral (2 mg/kg), con y sin ayuno en verano.

#### 4.14. Parámetros farmacocinéticos 0-120 horas, para músculo y piel en verano e invierno

En las Tablas 16 y 17 se indican los parámetros farmacocinéticos robustos para músculo y piel, respectivamente, luego de la administración oral con y sin ayuno en ambas temporadas.

Parámetro	Verano		Invierno	
	s/ayuno	c/ayuno	s/ayuno	c/ayuno
ABC ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{g}$ )	10,8	14,1	12,7	18,4
$t_{1/2}$ ing (h)	5,22	2,36	7,85	7,13
$t_{1/2\beta}$ (h)	21,27	10,11	41,62	25,10
TMR (h)	33,6	17,7	50,3	36,0
C <sub>máx</sub> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	0,3	0,8	0,5	0,7
T <sub>máx</sub> (h)	12	8	8	8

Tabla 16: Parámetros farmacocinéticos en músculo para marbofloxacina por vía oral (2 mg/kg), en verano e invierno.

Referencias: ABC: área bajo la curva,  $t_{1/2}$  ing: vida media de ingreso tisular  $t_{1/2\beta}$ : vida media de eliminación, TMR: tiempo medio de residencia; C<sub>máx</sub> obs: concentración máxima, T<sub>máx</sub>: tiempo que se logra la concentración máxima.

Parámetro	Verano		Invierno	
	s/ayuno	c/ayuno	s/ayuno	c/ayuno
ABC ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{g}$ )	17,1	51,9	20,7	16,2
$t_{1/2}$ ing (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 <sub>máx</sub> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	0,8	2,3	0,4	1
T <sub>máx</sub> (h)	8	8	12	4

Tabla 17: Parámetros farmacocinéticos en piel para marbofloxacina por vía oral (2 mg/kg), en verano e invierno.

Referencias: ABC: área bajo la curva,  $t_{1/2}$  ing: vida media de ingreso tisular  $t_{1/2\beta}$ : vida media de eliminación, TMR: tiempo medio de residencia; C<sub>máx</sub>: concentración máxima, T<sub>máx</sub>: tiempo que se logra la concentración máxima.

#### 4.15. Integración farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD)

Los resultados de los índices de PK/PD para la relación ABC/CIM en verano e invierno se presentan en las Tablas 18 y 19, mientras los índices CIM/C<sub>máx</sub> se muestran en las Tablas 20 y 21, para verano e invierno, luego de la administración endovenosa, oral con ayuno y sin ayuno, correspondientes a una dosis de 2 mg/kg, frente especies bacterianas Gram negativas de importancia en patología de peces.

Microorganismo	Verano (ABC/CIM)			
	CIM (µg/mL)	EV	Oral c/ayuno	Oral s/ayuno
<i>Yersinia ruckeri</i>	0,02	780	430	235
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,5	6,2	3,44	1,88
<i>Pseudomona fluorescens</i>	2,5	6,2	3,44	1,88
<i>Pseudomona putida</i>	5	3,1	1,72	0,94
<b>ABC</b>		15,6	8,6	4,7

Tabla 18: Índice ABC/CIM de marbofloxacina, luego de la administración intravenosa (EV) y oral con y sin ayuno previo (2 mg/kg) en verano en plasma.

Microorganismo	Invierno (ABC/CIM)			
	CIM (µg/mL)	EV	Oral c/ayuno	Oral s/ayuno
<i>Yersinia ruckeri</i>	0,02	795	385	255
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,5	6,3	3,0	2,0
<i>Pseudomona fluorescens</i>	2,5	6,3	3,0	2,0
<i>Pseudomona putida</i>	5	3,1	1,5	1,0
<b>ABC</b>	-	15,9	7,7	5,1

Tabla 19: Índice ABC/CIM de marbofloxacina, luego de la administración intravenosa (EV) y oral con y sin ayuno previo (2 mg/kg) en invierno en plasma.

Microorganismo	Verano (C <sub>máx</sub> /CIM)			
	CIM (µg/mL)	EV	Oral c/ayuno	Oral s/ayuno
<i>Yersinia ruckeri</i>	0,02	356,5	34,6	13,5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,5	2,8	0,2	0,1
<i>Pseudomona fluorescens</i>	2,5	2,8	0,2	0,1
<i>Pseudomona putida</i>	5	1,4	0,1	0,05
<b>C<sub>máx</sub></b>	-	7,13	0,693	0,271

Tabla 20: Índices CIM/C<sub>máx</sub> de marbofloxacina, después de la administración intravenosa (EV) y oral con y sin ayuno previo (2 mg/kg) en verano en plasma.

Microorganismo	Invierno (C <sub>máx</sub> /CIM)			
	CIM (µg/mL)	EV	Oral c/ayuno	Oral s/ayuno
<i>Yersinia ruckeri</i>	0,02	471	14,8	10,4
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,5	3,7	0,1	0,08
<i>Pseudomona fluorescens</i>	2,5	3,7	0,1	0,08
<i>Pseudomona putida</i>	5	1,8	0,05	0,04
<b>C<sub>máx</sub></b>	-	9,4	0,296	0,209

Tabla 21: Índices CIM/C<sub>máx</sub> de marbofloxacina, después de la administración intravenosa (EV) y oral con y sin ayuno previo (2 mg/kg) en invierno en plasma.



#### 4.16. Período de Resguardo

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 las Tablas 22 y 23.

Período de Resguardo en músculo				
	Verano		Invierno	
	c/ayuno	s/ayuno	c/ayuno	s/ayuno
<b>Días</b>	3,40	4,96	5,55	7,39
<b>UTA</b>	64,73	94,43	67,15	89,41

Tabla 22: Período de resguardo para marbofloxacina en músculo, en verano e invierno.

Referencias: UTA (Unidades Térmicas Acumuladas): temperatura promedio días de la experiencia por plazo de espera. Promedio temperatura: Verano 19,04°C / Invierno 12,1°C).

Período de resguardo en piel				
	Verano		Invierno	
	c/ayuno	s/ayuno	c/ayuno	s/ayuno
<b>Días</b>	7,67	11,91	5,99	13,8
<b>UTA</b>	146,03	226,76	72,47	166,98

Tabla 23: Período de resguardo para marbofloxacina en piel, en verano e invierno.

Referencias: UTA (Unidades Térmicas Acumuladas): temperatura promedio días de la experiencia x plazo espera. Promedio temperatura: Verano 19,04°C / Invierno 12,1°C).

## CAPITULO V. DISCUSION

### **5.1 Registro de peso, longitud, administración de marbofloxacina y resultado de la anestesia**

Si bien la evaluación de la anestesia no estuvo comprendida en los objetivos del presente trabajo, el empleo de fármacos depresores es considerado un avance de las buenas prácticas de manejo. De este modo, se logran contrarrestar cambios neuroendocrinos y fisiológicos que se producen durante las tareas que requieren manipulación de los peces y que constituyen factores estresantes, situaciones que afectan de forma negativa el rendimiento y la sobrevivencia de los peces (Ugwemorubong Ujagwung & Ojo, 2011; Zahl *et al.*, 2012; Stoskopf *et al.*, 2015).

En este contexto, los resultados observados confirman que el metomidato es un fármaco útil, seguro y práctico para inducir sedación / anestesia para procedimientos menores, como había sido reportado para *O. mykiss* bajo condiciones similares de cultivo (Mancini, 2004, 2005). En salmónidos se emplea en dosis de 1 a 10 mg/L, sin aumentar el cortisol en sangre (Neiffer & Stamper, 2009; Stoskopf *et al.*, 2015; Flecknell, 2016). Con la dosis empleada (5 mg/L) en las experiencias aquí realizadas se obtuvo una inducción rápida, sin presencia de excitación, con una recuperación rápida de los ejemplares y sin registrar muertes. Esto revela la seguridad del fármaco, propiedades que permitieron un fácil manejo de los peces para proceder a la administración de marbofloxacina y tomar los registros de longitud y peso.

A diferencia de otros depresores comúnmente utilizados, el metomidato tiene como ventaja adicional su fácil utilización, al aplicar la solución comercial directamente en el agua sin la necesidad de tratamientos previos como otros depresores, por ejemplo, el eugenol que requiere una dilución previa en alcohol o los anestésicos locales que deben combinarse con buffers para adecuar su performance (Millán Ocampo *et al.*, 2012; Prieto *et al.*, 2015).

### **5.2 Características del agua**

El medio líquido del cultivo de peces es un sistema complejo, donde las variables de calidad del agua desempeñan un papel crucial; temperatura, pH, oxígeno disuelto, sólidos en suspensión, nitritos, amoníaco, alcalinidad y dióxido de carbono se consideran críticos, por lo tanto, son factores a tener en cuenta en producción acuícola (Avkhimovich, 2013).

Durante la experiencia se controlaron tres parámetros físico - químicos del agua: temperatura, oxígeno disuelto y pH, siendo necesario que los mismos se mantengan en los rangos adecuados, no sólo para garantizar el buen estado de los peces y un desarrollo óptimo del cultivo, sino también para no afectar el desarrollo del trabajo y que la experiencia pueda ser extrapolada en sistemas de cultivo bajo condiciones de referencia para *O. mykiss*.

La temperatura es crítica para la supervivencia de los peces, sobre todo cuando presenta variaciones bruscas, en particular en altas temperaturas (Blanco Cachafeiro, 1984) y puede influir en la aparición de enfermedades en los peces (Avkhimovich, 2013). La trucha arco iris en condiciones naturales puede resistir agua con temperaturas mínimas de 3 °C y máximas de algo más de 20 °C; sin embargo, en términos de cultivo, los rangos de temperatura adecuados se sitúan entre 9 y 18°C (Mendoza-Bojorquez & Palomino-Ramos, 2004; Hernández & Aquino-Martínez, 2008; Gutiérrez Kraft, 2012; FAO, 2014). Los registros térmicos en ambas estaciones del año no denotaron oscilaciones marcadas diarias, característica que obedece a la ubicación de la toma de agua que abastece al establecimiento, ubicada en el estrato inferior (hipolimnio) del embalse contiguo. Dicha condición favorece a que la temperatura se mantenga estable y por consecuencia beneficie el desarrollo del cultivo como ha sido descrito en estudios anteriores por González del Pino (1997).

Es importante destacar que la temperatura estuvo dentro del rango de referencia para el normal desarrollo de la especie (Arregui Maraver, 2013). Si bien los registros térmicos superaron en verano ligeramente el rango deseable para el cultivo de *O. mykiss*, la población actual del establecimiento está adaptada a temperaturas similares, probablemente por procesos de selección genética que permiten una tolerancia a mayores temperaturas sin afectar su condición (Chen *et al.*, 2015). Por su parte, los resultados obtenidos bajo estas condiciones son muy importantes para la región de serranías del centro-norte de Argentina, donde no se disponen de registros de cinética de antibióticos, a pesar que el cultivo de trucha arco iris ha sido y es relevante en dicha zona del país (FAO, 2020), cuya producción permite la colocación de proteína de excelente calidad en mercados locales y regionales.

La concentración de oxígeno disuelto requiere un monitoreo en los sistemas de producción, ya que es fundamental para el metabolismo de los peces y un factor importante de la calidad del agua. Cuando su concentración o el porcentaje de saturación disminuyen, puede ocasionar pérdidas económicas considerables, con efecto negativo sobre la ganancia de peso y/o conversión alimenticia, además de ser la causa más frecuente de muerte repentina (Tomalá *et al.*, 2014), ya que los salmónidos en general son muy exigentes en cuanto a la cantidad de oxígeno.

La concentración de oxígeno disuelto presentó variaciones entre temporadas; se observó que en invierno es mayor que en verano y guarda relación con la temperatura del agua, donde la concentración es inversamente proporcional a la temperatura (Ghezzi Solís *et al.*, 2014). Aun así, en verano los valores se mantuvieron entre 6 a 10 mg/L, considerados como el rango de referencia para el cultivo de *O. mykiss* y esencial para llevar a cabo los diferentes procesos metabólicos de los peces (Blanco Cachafeiro, 1984; Ghezzi Solís *et al.*, 2014).

La tasa de recambio del agua, de 2,2 veces/hora, superó ampliamente la base requerida en mantener la oxigenación (Gutiérrez Kraft, 2012), colaborando también con el arrastre de desechos metabólicos.

El registro de pH se mantuvo para ambas temporadas dentro de valores que no exceden los límites establecidos para la producción (6,5 a 9,5), incluso inferiores (Hernández & Aquino-Martínez, 2008; FAO, 2014; Gutierrez Kraft, 2012), si bien los valores están próximos al valor mínimo, no constituyó en un inconveniente ya que los salmónidos tienen mayor tolerabilidad en pH ácido que alcalino (Avkhimovich, 2013).

Otro aspecto que se consideró beneficioso fue la claridad del agua ya que el establecimiento cuenta con un canal que actúa como decantador previo al ingreso del agua en los estanques; además evita la turbidez por partículas en suspensión que impactan como un factor negativo sobre las branquias (Arregui Maraver, 2013).

### **5.3 Índice de Condición de Fulton (K)**

Este índice que estima las modificaciones temporales del estado corporal de los peces bajo la influencia de factores externos (ambiente) e internos (fisiológicos), es utilizado para comparar la "condición" o el "bienestar" de un pez o población (Cifuentes *et al.*, 2012; Ndiaye *et al.*, 2015). El índice varía según las especies,

morfología, sexo, edad, estado reproductivo de acuerdo con la madurez gonadal, época del año y el ambiente acuático.

Sutton *et al.*, (2000), Morales & Quirós (2007), Sánchez Oscanoa (2015) y Ndiaye *et al.* (2015), proponen como valor de referencia del estado de bienestar un índice  $\geq 1$ . En esta experiencia, los resultados obtenidos indican que las truchas bajo estudio se encontraron en buena condición corporal independiente de la estacionalidad.

#### 5.4 Diseño experimental

Durante el desarrollo de la experiencia tanto en condiciones invernales como estivales, no se observaron efectos adversos en los animales tratados con marbofloxacina por las vías estudiadas, acorde el perfil de seguridad provisto por este antimicrobiano (EMEA, 1996; 1999; Plumb, 2011; Fernández Palacios O Connor, 2013) y por el conjunto de fluoroquinolonas cuando se administran según las condiciones recomendadas (Brown, 1996; Papich & Riviere, 2009; Gupta *et al.*, 2012; Muylaert & Mainil, 2013; Reimschuessel *et al.*, 2013).

El diseño experimental implementado resultó apropiado para establecer la disposición de marbofloxacina en trucha arco iris luego de la aplicación única de 2 mg/kg a partir de los promedios logrados de concentraciones temporales en plasma y tejidos.

La sustitución del diseño farmacocinético tradicional, que supone la colecta de muestras temporales de plasma y/o tejidos de una cantidad reducida de animales - habitualmente seis-, por el modelo poblacional implementado en esta oportunidad, resultó adecuado atento la cantidad de muestras procesadas. El modelo permite eludir variaciones atribuidas al sexo, tamaño, patologías o problemas nutricionales de los animales, y aportar datos más próximos a situaciones reales (Martín-Giménez & Riviere, 1998; Calvo Malvar & Benítez Estévez, 2004; McKellar *et al.*, 2004; Lees *et al.*, 2008; Barranco Garduño *et al.*, 2011).

La extracción líquido-líquido, fue una de las primeras técnicas de preparación de muestras y es ampliamente utilizada para el análisis biológico de diferentes matrices, aún cuando se critica el uso de grandes volúmenes de muestra, solventes orgánicos y la generación de un gran cantidad de residuos peligrosos (Stolker &

Danaher, 2012), hecho que no ocurre con la técnica implementada ya que requiere pocas cantidades de muestra y volúmenes de solventes para la extracción.

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

Para cuantificar el antimicrobiano se utilizó una columna C-18, coincidente con lo propuesto en la bibliografía internacional que refiere su utilidad para trabajar con la mayoría de los antimicrobianos, excepto aminoglucósidos y lincomicina (Stolker & Brinkman, 2005; Hassouan, 2007; Wang & Turnipseed, 2012).

El empleo de HPLC basado en el principio de retención selectiva, identificación y separación, es una técnica versátil indicada para cuantificar fluoroquinolonas en plasma y tejidos en diferentes especies debido que ofrece sensibilidad suficiente (Marzo & Dal Bo, 1998; Hernández-Arteseros *et al.*, 2002; Reig & Toldrá, 2009), inclusive en peces (Cañada-Cañada *et al.*, 2009). La separación es factible por las diferencias en el coeficiente de partición; la cromatografía líquida de alta eficacia separa los componentes de una mezcla según diferentes interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica (Aguilar Sola, 2015).

El método de HPLC utilizado fue adaptado de Böttcher *et al.* (2001), mediante la modificación la composición de la fase móvil original compuesta por: agua deionizada: metanol: trietilamina 75:25:4 v/v/v, por otra con las siguientes proporciones: agua deionizada: acetonitrilo: trietilamina 79:20:1 v/v/v, ajustada a pH 3,0; con el detector de fluorescencia regulado para la lectura a 490 nm de emisión y 295 nm de excitación (Yorke & Froc, 2002; Ramos, 2003; Bailac *et al.*, 2004; Verdón *et al.*, 2005), que fue sensible para los estudios cinéticos de disposición de marbofloxacin.

La regulación del pH a 3,0 y la inclusión de trietilamina en la composición de la fase móvil contribuyó para evitar la competencia que presentan las fluoroquinolonas con eventuales grupos silanol residuales en los empaques de fase reversa, de esta forma se evitan colas cromatográficas e incrementan la agudeza de los picos (Marzo

& Dal Bo, 1998; Maraschiello *et al.*, 2001; Hassouan, 2007). Además, el pH ácido mejora la intensidad de fluorescencia de las fluoroquinolonas (Amin *et al.*, 1995; Carlucchi, 1998; Sortino *et al.*, 1998).

Según Aerts *et al.* (1995), Pereira (2009) y Talero-Pérez *et al.* (2014), el método de análisis utilizado es suficientemente sensible para estudios cinéticos, de disposición tisular o para establecer niveles residuales, dada la facilidad de procesamiento de las muestras, bajo costo y versatilidad, debido que se adapta a diferentes matrices.

El programa farmacocinético no compartimental PK Solution 2.0 (Farrier, 1999) fue adecuado para interpretar las curvas de disposición plasmática provistas por marbofloxacin en trucha arco iris, que ajustaron a una ecuación biexponencial para la aplicación intravenosa y oral, respectivamente. El programa permitió establecer los parámetros cinéticos robustos mediante la aplicación de las fórmulas clásicas, con altos coeficientes de correlación ( $r^2$ ) en los ensayos de linealidad (0,992; 0,996 y 0,996 para plasma, músculo y piel, respectivamente). Estos resultados avalan la confiabilidad de las curvas de calibración empleadas para los cálculos de concentración del analito en las muestras problema y concuerdan con lo propuesto por la FAO (2005), que indica que el coeficiente preferentemente debe ser  $\geq 99,5$ , aunque puede situarse entre 98 y 99 según el método analítico empleado.

Los índices de recuperabilidad obtenidos, respecto del 100% teórico ideal de: 84,9%, 86,3% y 92% para plasma, músculo y piel, respectivamente, permiten establecer la bondad del método extractivo, que supera ampliamente el 50-60% que acepta la FDA (1998; 2001; 2018), siempre que los resultados sean precisos, lo que se determinó en el presente estudio de acuerdo a los resultados conseguidos de repetibilidad y reproducibilidad.

La conveniente recuperabilidad en el plasma y tejidos corroboran la suficiencia de los procedimientos destinados a extraer el analito del plasma con metanol como solvente polar en medio ácido (Posyniak, 1990; Marzo & Dal Bo, 1998; Bailac *et al.*, 2004), y en tejidos continuado por homogeneización y centrifugación (Aerts *et al.*, 1995; Böttcher *et al.*, 2001).

Los ensayos de repetibilidad intradía fueron para las distintas matrices menores al 2%, considerado límite. En tanto la reproducibilidad, eluyendo los estándares de calibración en ensayos efectuados en seis días diferente arrojó



resultados que en ningún caso superaron un coeficiente de variación del 3%, en concordancia con lo propuesto por Vinagre (1997) y lejanos al límite máximo de 15-20% posible de aceptar según la FDA (1998) y Friedecký *et al.* (2004).

Contemplando la complejidad de las matrices estudiadas, el conjunto de resultados obtenidos en la validación de las técnicas implementadas en plasma y tejidos, fueron aceptables y revelan la precisión de los métodos utilizados (Aerts *et al.*, 1995; Chang, 2000).

### 5.5 Cinética plasmática por aplicación intravenosa

La aplicación endovenosa de marbofloxacin en *O. mykiss* bajo condiciones estivales e invernales, determina un rápido y marcado descenso de los niveles plasmáticos en la primera hora post aplicación para luego continuar de forma gradual. Este atributo también ha sido comunicado en la especie tras la administración de los ácidos nalidíxico (Uno *et al.*, 1992) y oxolínico (Bjorklund & Bylund, 1991), enrofloxacin (Bowser *et al.*, 1992; Mancini, 2004), flumequine (Sohlberg *et al.*, 1994) y levofloxacin (Salusso, 2008).

Sohlberg *et al.* (1994), sostienen que la declinación de los niveles plasmáticos se relaciona principalmente con el pronto pasaje del antimicrobiano desde el compartimento central hacia los tejidos según describe la curva plasmática generada de la concentración plasmática versus tiempo y se expresa en los valores de  $t_{1/2\alpha}$  obtenidos en verano (0,36 horas) e invierno (0,49 horas), inferior a los comunicados con el ácido nalidíxico (Uno *et al.*, 1992) y con enrofloxacin (Mancini, 2004) y superiores a los reportados en esta especie tras la aplicación de ácido oxonílico (Kleinow *et al.*, 1994; Bjorklund & Bylund, 1991).

Este interesante comportamiento cinético fue observado en otras especies de la misma familia, en familias diferentes y con condiciones de vida que varían en cuanto a salinidad del agua y temperatura; como sucede con el salmón del atlántico (*S. salar*) tratado con ácido oxolínico, flumequine (Rogstad *et al.*, 1993) y enrofloxacin (Stoffregen *et al.*, 1997) y en la trucha marrón (*S. trutta*) con enrofloxacin (Koc *et al.*, 2009) y danofloxacin (Corum *et al.*, 2018).

Los valores de  $V_d$  hallados en esta experiencia de 2,3 L/kg (verano) y de 2,4 L/kg (invierno), permiten inferir una significativa distribución de marbofloxacin a los tejidos, acorde con su carácter anfótero, poco ionizada a pH fisiológico,

particularidad que asociada a su carácter lipofílico y la limitada unión a proteínas plasmáticas favorece su distribución tisular (Čonková *et al.*, 2009; Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010; Paulin *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2019).

Los Vd establecidos superan a los comunicados para *O. mykiss* luego del suministro de los ácidos nalidíxico (Uno *et al.*, 1992) y oxonílico (Bjorklund & Bylund, 1991). Por su parte, son próximos a los reportados con danofloxacin (Corum *et al.*, 2018) y enrofloxacin en condiciones invernales (Mancini, 2004) e inferiores al encontrado por este autor tras la aplicación con temperaturas estivales y con ácido oxolínico en invierno (Hustvedt & Salte, 1991).

Respecto a experiencias desarrolladas con marbofloxacin, el valor de Vd hallado es considerablemente superior a los comunicados en ejemplares juveniles de *O. mykiss* (Corum *et al.*, 2020), como en *C. auratus* y *C. lazera* (El Sayed *et al.*, 2019). Las diferencias observadas serían consecuencia de las propiedades físico químicas de cada fluoroquinolona y también resultado de la condición corporal de cada especie cuando se realizó la experiencia.

Marbofloxacin exhibió moderada persistencia en el organismo, según expresan los valores de  $t_{1/2\beta}$  plasmáticos logrados de 12,8 y 13,3 horas en verano e invierno, respectivamente, que exceden los hallados en pez gato con marbofloxacin (El-Sayed *et al.*, 2019), en trucha arco iris con flumequine con temperaturas reducidas (Sohlberg *et al.*, 1994), similares a los reportados con el ácido nalidíxico (Uno *et al.*, 1992) e inferiores a los encontrados con ácido oxolínico (Bjorklund & Bylund, 1991), enrofloxacin (Mancini, 2004) y, marbofloxacin (Corum *et al.*, 2020) y en trucha marrón con danofloxacin (Corum *et al.*, 2018).

Mientras los TMR generados de 14,4 y 17,1 horas en verano e invierno, respectivamente, son inferiores a los provistos en trucha arco iris con marbofloxacin (Corum *et al.*, 2020), levofloxacin (Salusso, 2008) y ácido oxonílico (Bjorklund & Bylund, 1991) y en trucha marrón con danofloxacin (Corum *et al.*, 2018).

Si bien no se observaron diferencias en los valores obtenidos de CI estival versus invernal, los  $t_{1/2\beta}$  y TMR más extensos determinados en invierno denotan la influencia de la temperatura del agua en las funciones bioquímicas y fisiológicas de los animales ectotermos, donde la tasa metabólica decrece a medida que disminuye la temperatura del agua, haciendo que la eliminación de xenobióticos sea más

pausada (Johnston & Dunn, 1987; Nouws *et al.*, 1988; Wheaton, 1993; Enders & Boisclair, 2016).

### 5.6 Cinética plasmática por vía oral

La administración oral de marbofloxacin en *O. mykiss* provee absorción incompleta (F), que oscila entre 30 - 55 % en verano y 34 - 55 % en invierno, con diferencias apreciables en los parámetros cinéticos plasmáticos en época estival e invernal.

Los valores de biodisponibilidad (F) obtenidos exceden a los informados con enrofloxacin en verano (Bowser *et al.*, 1992; Mancini, 2004), mientras son inferiores al hallado con levofloxacin (Salusso, 2008), en contraste con los ácidos oxonílico (Treves-Brown, 2000; Lunestad & Samuelsen, 2008) y nalidíxico que ofrecen una muy buena biodisponibilidad (Uno *et al.*, 1992; Jarboe *et al.*, 1993).

El proceso de absorción de marbofloxacin en trucha arco iris es rápido acorde al informado en levofloxacin (Salusso, 2008). Es más lento en invierno respecto al verano, según expresan los  $t_{1/2abs}$  establecidos, no obstante, estos prevalecen sobre los determinados con marbofloxacin en carpa cruciana en ensayos realizados a distintas temperaturas (Corum *et al.*, 2018).

La absorción oral sin ayuno previo presentó diferencias apreciables en los parámetros cinéticos robustos respecto a la condición de ayuno y en función de la temperatura estacional. El  $C_{máx}$  plasmático estival con alimento corresponde al 39 % del observado con ayuno previo, mientras la biodisponibilidad (F) estival asciende sólo al 30,1% respecto del 55,1% con ayuno previo (+ 83%). Por su parte, la F invernal sin ayuno excede el valor (+ 63,1%) cuando la aplicación se realiza con presencia de alimento en el tubo digestivo (Smith, 1980; Treves Brown, 2000).

Los valores provistos de  $C_{máx}$  plasmáticos difieren entre las estaciones, estos resultados son coherentes con los informados en trucha arco iris luego de la aplicación oral de ácido oxonílico (Bjorklund & Bylund, 1991).

Los valores conseguidos de  $T_{máx}$  corroboran la velocidad del proceso de absorción; son superiores a los informados en *O. mykiss* con levofloxacin (Salusso, 2008), con marbofloxacin en condiciones de ayuno previo (Corum *et al.*, 2020) y en *C. auratus* en ensayos desarrollados también con marbofloxacin (Corum *et al.*,

2018), similares al establecido en *O. mykiss* con enrofloxacin (Bowser *et al.*, 1992) y significativamente menores a los comunicados en ésta especie con ácido nalidíxico (Jarboe *et al.*, 1993), ácido oxonílico (Bjorklund *et al.*, 1992), flumequine (Sohlberg *et al.*, 1994) y enrofloxacin (Kyuchukova *et al.*, 2015).

El  $t_{1/2\beta}$  plasmático establecido en verano en condiciones de ayuno es próximo al provisto con este antimicrobiano en truchas arco iris ayunadas (Corum *et al.*, 2020), con danofloxacin en invierno (Corum *et al.*, 2018) y en carpa cruciana en un ensayo realizado a 25 °C (Zhu *et al.*, 2009), pero los tiempos establecidos de  $t_{1/2\beta}$  son significativamente menores a los comunicados en trucha arco iris con levofloxacin (Salusso, 2008), enrofloxacin (Kyuchukava *et al.*, 2015) y sarafloxacin (Stehly *et al.*, 1999). Respecto a los TMR, estos prevalecen sobre los hallados con danofloxacin (Corum *et al.*, 2018) y enrofloxacin (Mancini, 2004) y son superados a los descritos en enrofloxacin y sarafloxacin (Stehly *et al.*, 1999). El análisis de los  $t_{1/2\beta}$  y TMR conseguidos revela moderada permanencia plasmática de marbofloxacin.

El antimicrobiano exhibe pronta distribución a tejidos desde la circulación general según refieren los valores de  $t_{1/2\alpha}$ , favorecidos por el ayuno, son menores a los informados con marbofloxacin en verano y cercanos en invierno en *C. auratus* (Zhu *et al.*, 2009).

Si bien no se reportan experiencias a temperaturas como las establecidas en este estudio, se acepta que la absorción oral de antimicrobianos en peces puede ser afectada por diferentes factores como: - la presencia de alimento en el tracto digestivo (Smith, 1980; Treves Brown, 2000); - composición del mismo y variaciones en la formulación que inducen cambios en la biodisponibilidad y  $T_{m\acute{a}x}$  que oscilan entre 3,6 y 23,9% y 6 a 24 horas, respectivamente (Martinsen *et al.*, 1993); - temperatura del agua, según Windell *et al.* (1976) y Grans & Olsson (2011), cuando es mayor se incrementa el flujo de sangre al tubo digestivo y puede inducir que el estómago se vacíe 3 a 4 veces más rápido a 20°C respecto a 5°C; - especie y condiciones de vida (Martinsen *et al.*, 1994) y características del diseño experimental (Treves Brown, 2000; Riviere, 2009).

Dadas las condiciones de la experiencia donde se trabajó en forma paralela con los dos grupos de peces con la única variable que estuviesen con o sin ayuno previo, es factible atribuir las variaciones en los parámetros cinéticos a la presencia

del alimento en el tubo digestivo que se reflejan un  $t_{1/2abs}$  de 1,67 horas. Este fue mayor al verificado con marbofloxacina en carpa cruciana (*C. auratus*) en un estudio realizado a temperatura similar (Zhu *et al.*, 2009), al igual que otras quinolonas como enrofloxacina (Bowser *et al.*, 1992; Mancini, 2004) y menor a la reportada en trucha arco iris con levofloxacina (Salusso, 2008).

En estas condiciones experimentales se estableció una  $C_{m\acute{a}x}$  de 0,69  $\mu\text{g/mL}$  y un  $T_{m\acute{a}x}$  de 8 horas, donde la  $C_{m\acute{a}x}$  es menor a la informada en carpa cruciana, con picos de concentración que oscilan entre 6,43-8,36  $\mu\text{g/mL}$  y similar a los comunicados con enrofloxacina (Bowser *et al.*, 1992; Mancini, 2004; Koc *et al.*, 2009) e inferior al ácido oxolínico cuyo  $T_{m\acute{a}x}$  ocurre a las 24 horas (Bjorklund & Bylund, 1991).

La persistencia en el organismo de marbofloxacina, según el  $t_{1/2\beta}$  plasmático de 27,8 horas, es menor al descrito para enrofloxacina en *O. mykiss* (Bowser *et al.*, 1992; Mancini, 2004) y en trucha marrón (*S. trutta fario*) (Koc *et al.*, 2009) y con ácido oxolínico en trucha arco iris (Bjorklund & Bylund, 1991) Las curvas observadas son típicas para la administración oral de medicamentos y los datos pueden caracterizarse como comparables con la literatura publicada pero no siempre guardan relación con diferentes especies de peces.

El contraste de la biodisponibilidad del 51,2% con experiencias desarrolladas con otras quinolonas en *O. mykiss*, revela que excede la observada para ácido nalidíxico (Bjorklund & Bylund, 1991; Mancini, 2004); pero es menor a la reportada con ácido oxolínico (Kleinow *et al.*, 1994), levofloxacina (Saluzzo, 2008) y enrofloxacina en trucha marrón (*S. trutta*) (Koc *et al.*, 2009), en el pez marino rodaballo (*Scophthalmus maxima*) (Liang *et al.*, 2012) y en el pacú (*Colossoma brachypomum*) (Lewbart *et al.*, 1997); diferencias atribuibles a la disparidad de los diseños experimentales, fisiología y condiciones de vida de cada especie.

La distribución de fluoroquinolonas en los diferentes tejidos es elevada, acorde a su liposolubilidad aun cuando muestra diferencias entre animales domésticos y peces, los valores de  $V_d$  exceden el 1 L/kg, conforme con los resultados obtenidos con el ácido oxolínico (Bjorklund & Bylund, 1991), enrofloxacina (Bowser *et al.*, 1992; Mancini, 2004), levofloxacina (Salusso, 2008) y ciprofloxacina (Nouws *et al.*, 1988) en trucha arco iris.

La experiencia invernal en condición de ayuno previo evidencia un ritmo de absorción oral ( $t_{1/2abs}$ ) más amplio que en verano; comportamiento también observado en la especie por Corum *et al.* (2020), en condiciones similares de ayuno previo y una temperatura 13°C, reportaron un  $t_{1/2abs}$  de 17,3 horas en ejemplares juveniles de *O. mykiss*. Otros autores también describen un comportamiento similar con enrofloxacin en ejemplares juveniles (Bowser *et al.*, 1992) y con marbofloxacin en *C. auratus* (Zhu *et al.*, 2009) y *O. niloticus* (Shan *et al.*, 2017).

La aplicación oral exhibe extensa permanencia, según revelan los valores de  $t_{1/2}$  y TMR obtenidos. Estos son más significativos en época invernal que estival, son similares a los comunicados para marbofloxacin en carpa cruciana (Zhu *et al.*, 2009) y para enrofloxacin en ejemplares juveniles de trucha arco iris (Bowser *et al.*, 1992) y adultos de la misma especie (Kyuchukova *et al.*, 2014), con registros entre 55 y 79 horas.

En carpa cruciana (*C. auratus*), difloxacin exhibe un  $t_{1/2\beta}$  de 95 horas a 10°C, que duplica la observada a 20°C por Ding *et al.* (2006), similar comportamiento sucede en el pez marino lenguado (*Paralichthys olivaceus*) (Sun *et al.*, 2013) y también cuando se compara sarafloxacin en trucha arco iris a 12°C versus el pez gato (*Ictalurus punctatus*) a 26°C, que arroja valores de  $t_{1/2\beta}$  y MRT aproximadamente 9-10 veces menores (Stehly *et al.*, 1999). Kleinow *et al.* (1992), asocian los incrementos en los parámetros  $t_{1/2\beta}$  y TMR con menor actividad en los procesos de eliminación.

Independientemente de las especies analizadas, se observa un comportamiento común para fluoroquinolonas frente a las variaciones de temperatura. Esto puede ser producto de la reducción de la tasa metabólica que origina cambios en los fosfolípidos de membrana por el descenso de la temperatura que ralentizan el metabolismo (Hazel, 1984), el cual puede afectar hasta un tercio de la capacidad metabólica (Kleinow *et al.*, 1992).

La administración invernal de marbofloxacin sin considerar ayuno previo presenta un ingreso más lento del antimicrobiano, reflejado en un  $t_{1/2abs}$  de 4,68 horas, efecto también comunicado en *O. mykiss* tras la aplicación de flumequina, donde se observó que a 13°C el registro es de 2,9 horas, mientras a 3°C se eleva a 6,3 horas (Sohlberg *et al.*, 1994).

Puede entonces considerarse que de acuerdo a lo citado por Grans & Olsson (2011), la baja temperatura reduce el flujo sanguíneo intestinal y la presencia del alimento juegan su papel en la cinética de absorción, determinantes de una biodisponibilidad más baja y menores niveles plasmáticos.

### 5.7 Cinética en músculo

Luego de la administración oral, en el tejido muscular es posible detectar niveles del antimicrobiano a partir de los 30 y 45 minutos en ambos grupos (con y sin ayuno, respectivamente), similar a lo ocurrido con marbofloxacin en carpa cruciana (*C. auratus*) (Zhu *et al.*, 2009). Sin embargo, el ritmo de ingreso es reducido en verano respecto al invierno, principalmente con ayuno, según indican los valores establecidos en el  $t_{1/2}$  ingreso, más lento respecto a levofloxacin (Salusso, 2008).

Corum *et al.* (2018), sostienen que los peces poseen músculos rojos y blancos provistos de elevado y reducido flujo sanguíneo, respectivamente. En la trucha arco iris predomina el músculo blanco (90%). Además, el descenso de la temperatura provoca menor irrigación, factor que también puede ser esgrimido como la causa del pasaje tardío (Soldatov, 2006).

Los valores inferiores de ABC y  $C_{m\acute{a}x}$  y el retraso del  $T_{m\acute{a}x}$  observado en la experiencia estival cuando marbofloxacin se administra sin ayuno previo, se adjudican a la presencia del alimento en el tubo digestivo y su influencia en la absorción de fluoroquinolonas cuando se aplican por vía oral (Blondeau, 1999).

Al confrontar la administración sin ayuno de verano *versus* invierno, se observa una  $C_{m\acute{a}x}$  más importante en invierno, que se contrapone a lo manifestado previamente pero se justifica debido que las tasas de depuración intestinal en peces disminuyen sustancialmente con temperaturas más bajas, efecto que incrementa el tiempo de contacto de absorción para aquellos fármacos y matrices en los que la biodisponibilidad está limitada principalmente por el tiempo de tránsito y no por la forma química o el flujo sanguíneo (Kleinow, 1994).

El contraste de la  $C_{m\acute{a}x}$  invernal con o sin ayuno previo no determina diferencias significativas; se asume que la menor irrigación no tiene un impacto relevante, pero la menor motilidad digestiva permite mayor permanencia y contacto del fármaco, que compensaría la absorción (Kleinow, 1994; Grans & Olsson, 2011). El  $T_{m\acute{a}x}$  invernal sin ayuno previo, observado a las 8 horas revela

una velocidad de pasaje más rápida cuando se coteja en *O. mykiss* la utilización de enrofloxacin en (Bjorklund *et al.*, 1992; Kyuchukova *et al.*, 2014), de flumequine (Sohlberg *et al.*, 1994) y de ácido nalidíxico en esta especie y en el salmón (*Oncorhynchus rhodurus*) (Uno *et al.*, 1992).

Los parámetros musculares de  $t_{1/2\beta}$  (excepto en verano con ayuno) y TMR, superan a los plasmáticos coincidente con lo expresado con enrofloxacin (Mancini, 2004). Los valores se extienden influenciados por la presencia de alimento al liberar lentamente el fármaco, según Papich (2011) y son más persistentes en invierno con relación a la experiencia estival, producto del descenso en la actividad metabólica, coincidente con lo que ocurre en trucha arco iris con danofloxacin (Corum *et al.*, 2018), enrofloxacin (Bjorklund *et al.*, 1992; Kyuchukova *et al.*, 2014), flumequine (Sohlberg *et al.*, 1994) y el ácido nalidíxico en trucha arco iris y salmón (*O. rhodurus*) (Jacobsen, 1989; Uno *et al.*, 1992).

### 5.8 Cinética en piel

En condiciones estivales de ayuno *versus* no ayuno, el antimicrobiano se determina en la piel a los 15 y 30 minutos, respectivamente, y excepto en en verano sin ayuno, es cuantificado hasta las 120 horas post aplicación. El  $t_{1/2}$  de ingreso ofrece variabilidad según la época y la presencia o ausencia de alimento; salvo la aplicación estival con ayuno, supera a levofloxacin administrada en *O. mykiss* según lo reportado por Salusso (2008). Así como la administración sin período de ayuno previo, retrasa la aparición de concentraciones detectables a los 30 minutos, de la misma manera se evidencia una vida media de absorción que duplica a la observada con ayuno previo.

Tal como ocurre en verano, se observa la influencia del alimento en la absorción intestinal con el consiguiente impacto en el pasaje a tejidos que se debe adicionar al efecto de la menor temperatura en invierno. Esta situación resulta muy importante al momento de implementar tratamientos de enfermedades en peces, ya que los mismos pueden ingerir mucho menos alimento ante ciertas patologías (FIPA, 2017), lo cual puede repercutir en la absorción y distribución del antimicrobiano.

Los resultados aquí obtenidos revelan que marbofloxacin en *O. mykiss* se absorbe y consigue pronto el  $C_{m\acute{a}x}$  en piel, respecto de enrofloxacin donde el  $t_{1/2\alpha}$  es de 3,2 horas y la  $C_{m\acute{a}x}$  se alcanza a las 24 horas y levofloxacin que tiene un  $t_{1/2\alpha}$



muy prolongado (15,1 horas), alcanzando la  $C_{\text{máx}}$  a las 48 horas (Mancini, 2004; Salusso, 2008). Ambos registros se consideran una referencia apropiada en trucha arco iris, ya que se realizaron en verano y en condiciones experimentales similares a las del presente estudio. Las diferencias apuntadas pueden justificarse por los 2°C menos en ambas experiencias con influencia en la cinética de los fármacos, comprobado en distintas especies con varias fluoroquinolonas (Björklund *et al.*, 1992; Tyrpenou *et al.*, 2003; Sohlberg *et al.*, 2004).

Las concentraciones observadas indican un elevado pasaje tisular, según sugiere la relación  $ABC_{\text{piel}}/ABC_{\text{plasma}}$ , que arroja un cociente de 6,4/1, menor al 44,9/1 referido para enrofloxacin por Mancini (2004) y superior a 0,96/1 para levofloxacin (Salusso, 2008), en ambos casos en *O. mykiss*.

Los elevados cocientes ABC piel/plasma determinados, revelan gran pasaje al tejido, en concordancia con los referidos con marbofloxacin en *C. auratus* (Zhu *et al.*, 2009).

Las elevadas concentraciones en piel que predominan sobre las plasmáticas, establecidas en estudios precedentes y en ésta experiencia, aun cuando el volumen de sangre en la piel solo corresponde al 1,1 % del gasto cardíaco (Soldatov, 2006), se justifican por la carga de fosfolípidos de la piel, los sustituyentes C7 y C8 en la molécula de marbofloxacin (Chen *et al.*, 2019), la afinidad por la melanina (Malvisi *et al.*, 1997) y la contigüidad de la piel con el músculo rojo, de mayor irrigación que el músculo blanco (Kaneko *et al.*, 2016).

El  $t_{1/2\beta}$  y el TMR determinados en piel, relativamente prolongados, es semejante a lo que acontece con flumequine, enrofloxacin y sarafloxacin en salmónidos. La permanencia prolongada además de ser afectada por la temperatura, se debe a que el hueso y la piel, se comportan como reservorios, hecho que ha sido observado con flumequine y ácido oxolínico (Steffenak *et al.*, 1991; Luchetti *et al.*, 2004). Malvisi *et al.* (1997), atribuyen la persistencia de las quinolonas en la piel a su afinidad por la melanina.

Semejante a lo que ocurre en época estival, en el invierno se registran niveles a los 15 minutos, más reducidos y que siguen el mismo patrón de absorción que en plasma, con bajos niveles en los primeros tiempos, alcanzando una concentración máxima de 1,39 µg/g a las 4 horas, significativamente menor a los 2,3 µg/g de verano.

Las concentraciones alcanzadas en estas condiciones tienen el mismo comportamiento de marbofloxacin en experiencias estivales e invernales en *C. auratus* (Zhu *et al.*, 2009). La vida media de eliminación y el TMR son más prolongados, producto de una menor tasa de eliminación por la menor temperatura, coincidentes con los resultados informados con sarafloxacin en dorada (*Sparus aurata*) (Malvisi *et al.*, 1997; Tyrpenou *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2009).

La vida media de absorción en la piel durante el invierno duplica la lograda con ayuno previo y el pasaje al tejido es lento en las primeras horas, hasta alcanzar la  $C_{m\acute{a}x}$  a las 12 horas, con una manifiesta disminución respecto del verano. Los resultados guardan relación con los obtenidos por Jarboe *et al.* (1993), quienes observaron niveles de ácido nalidíxico en *O. mykiss* a partir de los 30 minutos y un  $C_{m\acute{a}x}$  a las 12 horas y con flumequine y ácido oxolínico en salmón del atlántico (*S. salar* L) (Rogstad *et al.*, 1993).

Las concentraciones observadas, si bien menores a las de ayuno previo, denotan buen pasaje tisular, que también se verifica para otras quinolonas como enrofloxacin (Treves Brown, 2000) y ciprofloxacin (Nouws *et al.*, 1988) en diferentes especies de peces.

También evidenciado por una relación  $ABC_{piel}/ABC_{plasma}$  favorable para la piel, los resultados obtenidos concuerdan con los reportados en *C. auratus* con difloxacin (Ding *et al.*, 2006) y marbofloxacin Zhu *et al.* (2009), con ácido oxolínico en *O. mykiss* (Archimbault *et al.*, 1998) y con enrofloxacin (Stoffregen *et al.*, 1997) y flumequine en *S. salar* (Elema *et al.*, 1994).

La depleción del fármaco en piel es lenta, evidenciada por una  $t_{1/2\beta}$  más extensa respecto plasma y músculo y por niveles establecidos en la piel hasta las 120 horas post aplicación, comparado con la experiencia en ayunas, producto de una menor tasa de depuración (Kleinow, 1994).

Estos resultados coinciden con lo citado para otras quinolonas en diferentes especies, como es el caso de *S. salar* con sarafloxacin (Stoffregen *et al.*, 1993) y *C. auratus* con difloxacin (Ding *et al.*, 2006).

La transferencia de marbofloxacin a los tejidos estudiados es relevante en consonancia con su liposolubilidad, favorecida por el carácter anfótero (Marzo & Dal Bo, 1998; Lambert *et al.*, 2007), por el pKa que implica escasa ionización del antimicrobiano al pH plasmático (Sörgel & Kinzig, 1993), por la presencia del anillo

piperacínico en la molécula (Fernández Palacios O'Connor, 2013) y la reducida afinidad por las proteínas plasmáticas (Papich & Riviere, 2009; Escudero & Marín Carrillo, 2016).

Acorde con los Vd establecidos por aplicación intravenosa, los niveles tisulares predominan sobre los plasmáticos; reflejado por los cocientes ABC 0-24 horas establecidos en músculo/plasma de 2; 2,3 conseguidos en condiciones invernales con y sin ayuno y de 1,25; 3 en época estival con y sin ayuno, respectivamente, mientras en la piel la relación ABC 0-24 horas piel/plasma obtenida es 2,3; 3 en condiciones invernales con y sin ayuno; y de 6 y 3,6, en verano con y sin ayuno, respectivamente.

Los resultados presentan disparidad cuando se comparan estudios entre diferentes quinolonas y especies. En este sentido, Kyuchukova *et al.* (2014), informaron en trucha una C<sub>máx</sub> oral con enrofloxacin que se registra a las 52,8 horas. Si bien la variabilidad entre especies muestra diferencias atribuibles a temperatura, salinidad y otros factores, Chen *et al.* (2019) señalan que la distribución tisular de fluoroquinolonas está fuertemente influenciada por el contenido de fosfolípidos y el potencial de bioconcentración que podría ser correlativo con la interacción de los sustituyentes en la posición de C7 y C8 de la estructura de las fluoroquinolonas.

Un aspecto que pone en evidencia la variabilidad interespecífica y las características particulares de cada fármaco, es sarafloxacin, que posee escasa tendencia a acumularse en lípidos, lo que determina que en el bacalao (*Gadus morhua*) la concentración hepática sea baja y la muscular alta, al ser una especie magra con reservas de grasa en el hígado, mientras que los salmónidos tienen gran cantidad de tejido adiposo en la musculatura (Martinsen *et al.*, 1994).

### **5.9 Integración farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD)**

En función de los resultados obtenidos fue posible determinar que con la dosis de 2 mg/kg de marbofloxacin se superan los cocientes ABC<sub>0-24</sub>/CIM y C<sub>máx</sub>/CIM sólo para *Yersinia ruckery*, mientras es insuficiente para *A. hydrophila* y *Pseudomonas* spp., que concuerda con lo observado por Corum *et al.* (2020), utilizando una dosis de 10 mg/kg.

Es importante destacar que Terzi *et al.* (2020), realizaron la integración PK/PD para los mismos microorganismos frente a danofloxacina e independiente de los resultados determinaron que la temperatura tiene influencia en los valores de la CIM. Cuando desciende, la CIM se incrementa entre 1,5 y 2 veces, efecto también demostrado con enrofloxacina, flumequina y ácido oxolínico a excepción de sarafloxacina (Martinsen *et al.*, 1992).

### 5.10 Período de resguardo

En lo que respecta a la calidad de la trucha arco iris como fuente de alimento para consumo humano, la importancia de la presencia de sustancias en los productos comestibles estará dada en función de la velocidad y el grado de absorción del compuesto original, del metabolismo y la tasa de excreción, tanto del compuesto original como de sus metabolitos. Por lo tanto, el residuo total compondrá la molécula original inalterada y sus eventuales metabolitos. Los resultados obtenidos permiten describir el comportamiento cinético de marbofloxacina y establecer períodos de resguardo para la especie.

Tradicionalmente las fluoroquinolonas se consideran agentes con una permanencia moderada en el organismo, pero diferentes estudios permiten verificar concentraciones tisulares elevadas y persistentes, aspecto significativo considerando que su eficacia clínica es concentración-dependiente, pero no así, desde el punto de vista de la salud pública por la presencia de residuos en los tejidos animales destinados al consumo.

Estudios de Steffenak *et al.* (1991) sobre diferentes tejidos de salmones (*S. salar*) tratados con ácido oxolínico, flumequina, enrofloxacina y sarafloxacina, en busca de posibles reservorios de las mismas, mostraron que los residuos de estos medicamentos estaban presentes en los peces durante períodos prolongados post tratamiento. Por ello, los estudios conducentes a la determinación de residuos en tejidos comestibles, deberán involucran el análisis de cada uno en particular, pero también pueden ser como tejido compuesto en proporciones naturales, tal los casos de piel más grasa o músculo más piel (PROSAIA, 2013b; IFOP, 2017)).

Para la experiencia, dado que no hay plazo de espera establecido para la especie, se optó por tomar como referencia 30 µg/kg, LMR de sarafloxacina para salmónidos establecido por la Comunidad Europea (Okocha *et al.*, 2018), e inferior a

los 100-500 µg/kg aceptados para otras quinolonas (danofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, ácido oxolínico y flumequina) por SENASA (Resolución 559/11).

Los resultados de las experiencias estivales e invernales, muestran la influencia del alimento y la temperatura, especialmente de ésta última al momento de fijar los plazos de espera.

### 5.10.1 Músculo

Con temperaturas estivales, la única referencia disponible para marbofloxacina es citada por Zhu *et al.* (2009) en *C. auratus* a una dosis de 10 mg/kg y bajo diferentes condiciones experimentales, donde reportaron 17 días de período de resguardo, muy por encima de los 3,4 a 4,9 días obtenidos en el presente trabajo en función de la condición de ayuno.

Contrastado con otras quinolonas en *O. mykiss*, el ácido oxolínico requiere un período de 18 días (Jacobsen, 1989) que puede extenderse a 28 días (Treves Brown, 2000), la enrofloxacina 10,7 días (Mancini, 2004) y la levofloxacina 19,8 días (Salusso, 2008); mientras que si se toma a la tilapia (*O. niloticus*) de aguas cálidas, el período para enrofloxacina se extiende a 22 días (Reimschuessel, 2008), lo que muestra la amplia variabilidad que puede encontrarse en cuanto a fármaco y especie analizada.

En invierno, el período de resguardo se extiende hasta los 7,3 - 11,9 días, influenciado principalmente por la menor temperatura, siendo menor al periodo de 20 días reportados para *C. auratus* (Zhu *et al.*, 2009), al ácido oxolínico que oscila entre 8 y 12 días con temperaturas de 12 y 10 °C, respectivamente (Jacobsen, 1989); y para enrofloxacina en híbrido de *Salvelinus fontinalis*, que es de 14 días con temperaturas de 9°C (Reimschuessel *et al.*, 2013).

Los periodos de resguardo de marbofloxacina en ambas estaciones, son muy inferiores a los reportados para oxitetraciclina en diferentes salmónidos tras la administración intraperitoneal, aunque es importante señalar que se logran concentraciones en músculo mucho mayores a las que se logran tras la administración oral, pudiendo utilizarse hasta 100 veces menos principio activo (FIPA, 2017). Como se trató de manera predecible, se desprende que la vía de administración de un antibiótico en peces, resulta de sumo interés para la cinética del mismo. Al igual que ello, la determinación de los niveles permitidos o exigidos en los

diferentes tejidos es trascendental para fijar el periodo de resguardo cuando el estudio se orienta al cuidado de los consumidores.

### 5.10.2 Piel

Se calculó un período de resguardo mayor al del músculo en ambas temporadas. La bibliografía menciona que fluoroquinolonas como el ácido oxolínico, flumequina, enrofloxacin y sarafloxacin, alcanzan elevadas y persistentes concentraciones en piel (Steffenak *et al.*, 1991).

El período de resguardo para verano, que oscila entre 7,6 y 11,9 días, es menor al calculado para otras quinolonas, reportándose 68,7 días para enrofloxacin (Mancini, 2004) y 30,3 días para levofloxacin (Salusso, 2008) en trucha arco iris y 33 días en carpa cruciana (Zhu *et al.*, 2009).

En invierno, el periodo de resguardo se incrementa ligeramente; fluctúa entre 5,9 y 13,8 días, aunque es menor al de 63 días con marbofloxacin (Zhu *et al.*, 2009) y los 64 días para difloxacin reportados en *C. auratus* (Ding *et al.*, 2006).

Se debe considerar que, si bien se han calculado los tiempos de espera para músculo y piel en forma individual, el período de resguardo según las regulaciones nacionales (Resolución SENASA 559/11) e internacionales (Council Regulation - (EEC) N° 2377/1990), se establece en base a los tejidos comestibles y su determinación se hace en las proporciones naturales de los tejidos en el animal. Para el caso de los pescados éste se establece en músculo y piel en proporciones naturales.

De la bibliografía que reporta estudios de tejidos individuales (Mancini, 2004; Salusso, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Reimschuessel *et al.*, 2013) y en proporciones naturales (Archimbault *et al.*, 1988; Intorre *et al.*, 2000; Della Rocca *et al.*, 2004; Luchetti *et al.*, 2004; Paschoal *et al.*, 2013), al momento de fijar el período de resguardo, al presentar la piel el mayor tiempo, se toma su valor para establecerlo.

De esta manera, puede establecerse que el plazo de espera para marbofloxacin derivado del presente estudio, sobre la base de un LMR de 30 µg/kg, es de 11,9 y 13,8 días para verano e invierno, respectivamente, ya que para consumo la trucha se ofrece generalmente con piel. En las dosis aquí empleadas y si se enfoca este trabajo en la práctica, el plazo de marbofloxacin resulta una ventaja comparativa frente a otros antibióticos, al ser mucho menor el tiempo de

espera, lo cual posibilitaría a los productores hacer tratamientos más próximos al momento de la faena.

## **CAPITULO VI. CONCLUSIONES**



-Las características físico-químicas del agua, en ambas estaciones del año, se encuadran dentro de los valores de referencia para el cultivo de *O. mykiss*. Dicha situación, no sólo representa una fortaleza para el desarrollo del presente trabajo, sino que además permite extrapolar los resultados a otros sitios de cultivo bajo condiciones similares.

-El diseño poblacional es adecuado para estudiar el perfil cinético de marbofloxacin en *O. mykiss*.

-La metodología analítica empleada para cuantificar marbofloxacin en plasma y tejidos en trucha arco iris, es sencilla, requiere pocas etapas en su desarrollo, con baja demanda de solventes y es, por otra parte, económica.

-El perfil cinético de marbofloxacin en *O. mykiss* por las aplicaciones intravenosa y oral se corresponde con el descripto para el conjunto de fluoroquinolonas.

-La farmacocinética de marbofloxacin en *O. mykiss* es afectada por la temperatura del medio. El perfil cinético de marbofloxacin exhibe diferencias importantes en función de la temperatura del agua, independiente de condición de con o sin ayuno previo para la aplicación oral. De acuerdo a estos resultados se acepta la Hipotesis n 1.

-Las concentraciones de marbofloxacin son mas importantes en los tejidos estudiados que en el plasma.

-La dosis utilizada de marbofloxacin es claramente insuficiente para asegurar eficacia terapéutica. El ajuste posológico debe contemplar las variaciones estacionales en el comportamiento cinético del antimicrobiano y mejor aún, el potencial agente infeccioso a tratar. De acuerdo a ello, se rechaza la Hipotesis n 2.

-El plazo de espera para marbofloxacin en *O. mykiss* que se comercializa con piel es de 11,9 días (227 grados/día) para verano y 13,8 días (167 grados/día) en

invierno, siendo este periodo superior al establecido para músculo al igual que con otras quinolonas, resultados que permiten aceptar la Hipotesis n 3.

## **CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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

AGUILAR ALFARO, L.; CANUT BLASCO, A.; COBO REINOSO, J.; GIMÉNEZ MESTRE, M.J. & RODRÍGUEZ GASCÓN, A. (2013) Análisis farmacocinético-farmacodinámico en Microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. Documento Científico. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

<https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia46.pdf>

AGUILAR SOLA, M. S. (2015) Influencia de la edad en el perfil sérico de marbofloxacina en llamas juveniles (*Lama glama*) tras administraciones parenterales y su repercusión sobre la eficacia terapéutica. Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, España. Tesis de Doctorado.

ALDERMAN, D. (2002). Empleo de fármacos antimicrobianos en acuicultura. En: Prescott, J.; Baggot, J. & Walters, R. (Eds.) *Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria*, 3° Ed., Buenos Aires, Ed. Intermédica: 595-612.

ALDRED, K.; KERNS, R. J. & OSHEROF, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*, 53: 1565-1574.

AMIN, A. S.; EL-SAYED, G. O. & ISSA, Y.M. (1995). Utility of certain  $\pi$ -acceptors for the spectrophotometric determination of norfloxacin. *Analyst*, 120: 1189-1993.

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

ARCHIMBAULT, P.; AMBROGGI, G. & NICOLAS, S. (1988) Oxolinic acid in the trout: bioavailability and tissue residues. *Ann. Rech. Vét., INRA Editions*, 19 (1): 39-43.

ARREGUI MARAVER, L. (2013) El cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Cuadernos de acuicultura, 6 Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid. 104p.

AVKHIMOVICH, D. (2013) Effect of water quality on rainbow trout performance water oxygen level in commercial trout farm "Kala ja marjapojat". Bachelor's Thesis. Environmental Engineering. Mikkeli University of Applied Sciences. Finland.

BAGGOT, J.D. (2001) The physiological basis of veterinary clinical pharmacology. Blackwell Science Ltd., Oxford.

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

BAILAC, S.; BALLESTEROS, O.; JIMÉNEZ-LOZANO, E.; BARRON, D.; SANZ-NEBOT, V.; NAVALON, A.; VILCHEZ, J. & BARBOSA, J. (2004). Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr., A1029*: 145-151.

BALL, P. (2003) Quinolone generations: Natural history or natural selection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 46 (Topic T1).

BARRANCO GARDUÑO, L.; NERI SALVADOR, J.; LEÓN MOLINA, H.; CARRASCO PORTUGAL, M.; FLORES MURRIETA, F. & PATIÑO CAMACHO, S. (2011) La farmacocinética poblacional y su importancia en la terapéutica. *Med. Int. Mex.*; 27 (4): 370-377.

BELTRÁN, B.C. (2004). Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: Utilidad práctica. Rev. Chil. Infect. 21 (Supl 1): S39-S44.

BERTINO, J. & FISH, D. (2000) The safety profile of the fluoroquinolones. Clin. Ther. 22 (7): 798-817.

BJORKLUND, H. & BYLUND, G. (1991) Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Xenobiotica, 21 (11): 1511-1520.

BJÖRKLUND, H.; ERIKSSON, A. & BYLUND, G. (1992). Temperature related absorption and excretion of oxolinic acid in rainbow trout. Aquaculture, 102 :17-27.

BLANCO CACHAFEIRO, M.C. (1984). La trucha, cría industrial. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

BLONDEAU, J.M. (1999) Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: A review. Clin. Therap., 21 (1): 3-40.

BOLON, M. K. (2009) The newer fluoroquinolones. Infect. Dis. Clin. N. Am., 23: 1027–1051.

BÖTTCHER, S.; BAUM, T. H.; HOPPE-TYCHY, C.; BENZ N. & SONNTAG, H. (2001) An HPLC assay and a microbiological assay to determine levofloxacin in soft tissue, bone, bile and serum. J. Pharm. Biomed. Anal., 25: 197-203.

BOWSER, P. & HOUSE, M. (1990) *In vitro* sensitivity of some fish pathogens to the quinolones naladixic acid and oxolinic acid and the fluoroquinolone enrofloxacin. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 10 (2): 48-49.

BOWSER, P.R. & BABISH, J.G. (1991) Clinical pharmacology and efficacy of fluoroquinolones in fish. Annual Rev. Fish Dis.: 63-66.

BOWSER, P. R.; WOOSTER, G. A.; STLEGER, J. & BABISH, J. G. (1992) Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. vet. Pharmacol. Therap., 15: 62-71.

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

BROWN, S. (2005). Farmacocinética: distribución y destino de los fármacos en el organismo. En Farmacología y Terapéutica Veterinaria por Adams, R. (2nd Ed),. Acribia S.A., Zaragoza, España: 13-56.

BRYSKIER, A., CHANTOT, J. (1995) Classification and Structure-Activity Relationships of Fluoroquinolones. Drugs, 49: 16-28.

BRYSKIER, A. (2005) Fluoroquinolones. In: Bryskier A (Ed) Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals. ASM Press, Washington DC: p. 668

BUDIATI, T. (2010) The presence of fluoroquinolones as antibiotic on catfish: a risk assessment. International J. Eng. Sci. Tech., 2 (10): 5912-5914.

BURKA, J. F.; HAMMELL, K.L.; HORSBERG, T. E.; JOHNSON, G. R.; RAINNIE, D.J. & SPEARE, D. J. (1997) Drugs in salmonid aquaculture: A review. J. vet. Pharmacol. Therap., 20: 333-349.

CABELLO, F.C. (2003). Antibióticos y acuicultura. Un análisis de sus potenciales impactos para el medio ambiente y la salud humana y animal en Chile. Análisis de Políticas Públicas. Organización Terram, Publicación N° 17.

CALVO MALVAR, M. & BENÍTEZ ESTÉVEZ, A. (2004) Papel de los modelos farmacocinéticos de población. Revisión de métodos. Química Clínica, 23 (6): 417-422.

CAMACHO, B.; MORENO, R.; RODRÍGUEZ, G.; LUNA ROMO, C. & VÁSQUEZ, M. (2000). Guía para el cultivo de trucha. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México D.F. 135 p.

CAÑADA-CAÑADA, F.; MUÑOZ DE LA PEÑA, A. & ESPINOSA-MANSILLA, A. (2009) Analysis of antibiotics in fish samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395: 987-1008.

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

CARPENTER, J. W. (2005) *Exotic Animal Formulary*, 3rd Ed. Elsevier Saunders. St. Louis.

CARRILLO ESPERA, R.; ZAVALA BUSTOS, M.; ÁLVAREZ ALCÁNTARA, H.; CARRILLO CÓRDOVA, D. & CARRILLO CÓRDOVA, C. (2013) La importancia de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos en la prescripción de antibióticos. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 56 (3): 5-11.

CATTOIR, V. (2004) Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathol. Biol.*, 52: 607-616.

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

CHEN, Z.; SNOW, M.; LAWRENCE, C. S.; CHURCH, A. R.; NARUM, S. R.; DEVLIN, H. & FARRELL, A. P. (2015) Selection for upper thermal tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *J. Experim. Biol.*, 218: 803-812.

CHEN, M.; ZHAO, M.; WANG, Y.; BEKELE, T. G.; LIU, W. & CHEN, J. (2019) Uptake and depuration of eight fluoroquinolones (FQs) in common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotox. Environm. Safety* 180: 202-207.



CIFUENTES, R.; GONZÁLEZ, J.; MONTOYA, G.; JARA, A.; ORTÍZ, N.; PIEDRA, P. & HABI, T. E. (2012) Relación longitud-peso y factor de condición de los peces nativos del río San Pedro (cuenca del río Valdivia, Chile). *Gayana (Concepc.)*, 76 (Supl. 1): 86-100.

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

ČONKOVÁ, E.; ČELLÁROV, A.; VÁCZI, E.; SABOVÁ, L. (2009) Quinolones from the point of view of pharmacology and veterinary indications (A review). *Folia Vet.*, 53 (4):175-85.

CORUM, O.; CORUM, D.; ER, A.; TERZI, E. & UNEY, K. (2018): Plasma and tissue disposition of danofloxacin in brown trout (*Salmo trutta fario*) after intravenous and intramuscular administrations. *Food Additives & Contaminants, Part A*: 1-8.

CORUM, O.; TERZIB, E.; CORUM, D.; KENANOGLUB, O.; BILENB, S. & UNEY, K. (2020) Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin after oral and intravenous administration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 514: 734-510.

COUNCIL REGULATION (EEC) N° 2377/1990 (1990) Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities L. Ser.*, 224:1-8 (<http://europa.eu.int>)

COYNE, S.; COURVALIN, P. & PÉRICHON, B. (2011) Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter spp.* *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55 (3): 947-953.

CRAIG, W. (2000) Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.*, 26: 1-12.

CRAIG, W.A. (2001) Does the dose matter? *Clin. Infect. Dis.*, (Suppl 3) 33: 233-237.

DALL'ACQUA, F.; VIOLA, G.; VEDALDI, D.; ALOISI, G. G.; LATTERINI, E. & PASSERI, R. (2007) Photoinduced modifications by fluoroquinolone drugs in bovine serum albumin (BSA) and ribonuclease A (RNase) as model proteins. *ARKIVOC* (viii): 231-244.

DALSGAARD, I. & BJERREGAARD, J. (1991) Enrofloxacin as an antibiotic in fish. *Acta Vet. Scand.*, 87: 300-302

DAVICINO, R. A. (2003) Residuos de medicamentos veterinarios y anabólicos en carnes: enfoque técnico-legal en Argentina y el Mercosur.

DEL VALLE, L. (1990) Bases para la Salmonicultura. Agencia de Cooperación internacional del Japón (JICA). Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, 199 p.

DELLA ROCCA, G.; SALVOA, A.; MALVISIA, J. & SELLOB, M. (2004) The disposition of enrofloxacin in seabream (*Sparus aurata* L.) after single intravenous injection or from medicated feed administration. *Aquaculture*, 232: 53-62.

DING, F.; CAO, J.; MA, L.; PAN, Q.; FANG, Z. & LU, X. (2006) Pharmacokinetics and tissue residues of difloxacin in crucian carp (*Carassius auratus*) after oral administration. *Aquaculture*, 256: 121-128.

ELEMA, M.; HOF, K. & KRISTENSEN, H. (1994) Multiple-dose pharmacokinetic study of flumequine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 128: 1-11

EL-SAYED, M. G.; ENAS, A. H. & ELZOGHBY, S. (2019 ) Pharmacokinetics and tissue residues of marbocyl in normal and *Aeromonas hydrophila* infected catfish (*Clarias lazera*). *World J. Pharm. and Pharmac. Sci.*, 8 (8): 1-18.

ELSHABOURY, R.; DILWORTH, T.J. & ROTSCHAFFER, J.C. (2016). Pharmacodynamics of fluoroquinolones. In *Antibiotic Pharmacodynamic, Methods in Pharmacology and Toxicology*, por J. Rotschafer, D. Andes, K. Rodvold (Editors). Springer Science, New York: 177-198.

EMAMI, S.; SHAFIEE, A. & FOROUMADI, A. (2005) Quinolones: recent structural and clinical developments. *Clinical Developments. Iranian J. Pharmac. Res.*, 3: 123-136.

EMA (European Medicines Agency) (1996) Committee for Veterinary Medicinal Products. Marbofloxacin. Summary report (1). EMA/MRL/079/96-FINAL.

EMA (European Medicines Agency) (1999) Committee for Veterinary Medicinal Products. Marbofloxacin. Summary report (1). EMA/MRL/693/99-FINAL.

EMA (2006) Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (CPMP/ICH/381/95).

EMMERSON, A.M. & JONES, A.M. (2003) The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51 (Suppl. S1): 13-20.

ENDERS, E.C. & BOISCLAIR, D. (2016) Effects of environmental fluctuations on fish metabolism: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study. *J. Fish Biol.*, 88: 344-358.

ERNEST, M.; ERNEST, E. & KLEPSEK, M. (1997) Levofloxacin and trovafloxacin: The next generation of fluoroquinolones?. *Am. J. Health-Syst. Pharmacists*, 54: 2569-2584.

ERRECALDE, J. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo, incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. En: FAO Producción y sanidad animal - Estudio 162. Roma.

ESCOBAR, Q.L. (2016). Monitorización terapéutica de fármacos y aspectos prácticos de farmacocinética. *Rev. Méd. Clín. Las Condes*, 27 (5): 605-614.

ESCUDERO, E. & MARÍN CARRILLO, R. (2016). Capítulo 18: Antibióticos inhibidores de metabolismo intermediario e inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos. En: Botana L.M. *Farmacología Veterinaria: Fundamentos y Aplicaciones Terapéuticas*. Ed. Médica Panamericana, España. pp. 373-378.

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

FAO (2014) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Oportunidades y desafíos. Roma. 274 p.

FAO (2015) Comisión del Codex Alimentarius. Manual de Procedimientos, 23ª Edición, Roma. 243 p.

FAO (2016) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 p.

FAO (2020) National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - Argentina. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Texto de Panné Huidobro, S. In: *Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO* [en línea]. Roma. Actualizado 12 June 2018.

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

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

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

FDA (Food and Drug Administration) (2018) Bioanalytical method validation guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM).

FIPA (Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura) (2017) Impactos asociados con el uso extra etiqueta del principio activo oxitetraciclina, vía intraperitoneal en centros de cultivo de salmónidos sobre el programa de control de fármacos vigente. FIPA N° 2014-91. Chile, 973 p.

FERNÁNDEZ PALACIOS O'CONNOR, R. (2013). Estudio farmacocinético de formulaciones poliméricas de liberación controlada para marbofloxacino en caprino. Tesis Doctoral, Departamento de Farmacología, Universidad de Murcia, España: 291p.

FLECKNELL, P. (2016) Laboratory Animal Anaesthesia (4th. Ed.). Academic Press, Oxford. 321 p.

FRIEDECKÝ, B.; SPRONGL, L. & KRATOCHVÍLA, J. (2004) Validation and verification of analytical methods in clinical laboratories. Board Czech Soc. Clin. Biochem.: 1-14.

GARDNER, S. (2010) The evolution of modern fluoroquinolones. Adv. Ocular Care: 39-41.

GHEZZI SOLÍS, P.; REQUEJO ALEMAN, J. C.; GONZÁLEZ GUERRERO, S. & DEL VALLE AYALA, O. (2014) Manual de Crianza de Trucha en Ambientes Convencionales. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero – FONDEPES, Perú. 88 p.

GIBALDI, M. & PERRIER, D. (1975). Pharmacokinetics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol. 1. Marcel Dekker Verlag, New York.

GIGUÈRE, S. Y DOWLING, P. (2013). Chapter 18: Fluoroquinolones. In: Prescott, J. & Dowling, P. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine (5° Ed), John Wiley & Son, Iowa. p. 295-311.

GONZÁLEZ DEL PINO, F. (1997) Comparación de dos variedades de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en condiciones de cría intensiva. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Córdoba

GONZÁLEZ GÓMEZ, F. & MARTÍNEZ, J. (2007) Quinolonas y fluoroquinolonas. En: San Andrés Larrea M. & Boggio, J. C. Antimicrobianos y Antiparasitarios en Medicina Veterinaria. Ed. Intermédica, Buenos Aires. p. 249-281.

GOUDAH, A. & MOUNEIR, S. (2008) Comparative pharmacokinetics of difloxacin in goat kids and lambs. *Small Rumin. Res.*, 78 (1): 186-192.

GOUVÊA, R., DOS SANTOS, F. & DE AQUINO, M. H. (2015). Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a review. *Rev. Br. Ciênc. Avíc.*, 17 (1): 1-10.

GRANS, A. & OLSSON, C. (2011) Gut motility. in: Farrell, A. P. *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Academic PressElsevier. London. p. 1292-1300.

GRAPH PAD PRISM (2012) Version 6.0 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

GROBBEL, M.; LUBKE-BECKER, A.; WIELER, L.H.; FROYMAN, R.; FRIEDERICHS, S. & FILIOS, S. (2007) Comparative quantification of the *in vitro* activity of veterinary fluoroquinolones. *Vet. Microbiol.*, 124 (1-2): 73-81.

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

GUTIERREZ KRAFT, C.A. (2012) Tesis: Grado de aceptación y diferencias nutricionales y organolépticas que presentan las dos especies de mayor producción acuícola en Argentina: trucha y pacú. Universidad FASTA.

HASSOUAN, M. K.; BALLESTEROS, O.; VÍLCHEZ, J. L.; ZAFRA, A. & NAVALÓN, A. (2007) Simple multiresidue determination of fluoroquinolones in bovine milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Letters*, 40: 779-791.

HARITOVA, A. M.; RUSENOVA, N. V.; PARVANOV, P. R.; LASHEV L. D. & FINK-GREMMELS, J. (2006). Integration of pharmacokinetic and pharmacodynamic indices of marbofloxacin in turkeys. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 (11): 3779-3785.

HAZEL, J. R. (1984). Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Int. Comp. Physiol.*, 246 (4): R460–R470.

HEKMAN, P. (1996) WT1.4 Withdrawal time calculation program. Freeware, distributed by the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), London.

HERNANDEZ, M. & AQUINO-MARTÍNEZ, G. (2008). Manual básico para el cultivo de trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). GEM, TIES Cuencas Sanas y Modos de Vida Sustentable Series de Manuales de Capacitación.

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

HOPKINS, K.L.; DAVIES, R.H. & THRELFALL, E.J. (2005) Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 25 (5): 358-373.

HUSTVEDT, S.O. & SALTE, R. (1991) Distribution and elimination of oxolinic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) after a single rapid intravascular injection. *Aquaculture*, 92: 297-303.

IFOP (INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO) (2017) Informe final: Impactos asociados con el uso extra etiqueta del principio activo oxitetraciclina, vía intraperitoneal en centros de cultivo de salmónidos sobre el programa de control de fármacos vigente. Chile.

INTORRE, L.; CECCHINI, S.; BERTINI, S.; COGNETTI VARRIALE, A.M., SOLDAN, G. & MENGOZZI, G. (2000) Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 182: 49-59.

JACOBSEN, M. D. (1989) Withdrawal times of freshwater rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimetoprim. *J. Fish Dis.*, 12: 29-36.

JACOBY, G. A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 41 (Suppl 2): S120-S126.

JARBOE, H.; TOTH, B.R.; SHOEMAKER, K.E.; GREENLEES, K.J. & KLEINOW, K.M. (1993) Pharmacokinetics, bioavailability, plasma protein binding and disposition of nalidixic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, 23 (9): 961-972.

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

JOHNSTON, I.A. & DUNN, J. (1987) Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 41: 67-93.

JOHNSTON, C. & JUNGALWALLA, P. (2008) *Aquatic Animal Welfare Guidelines: Guidelines on welfare of fish and crustaceans in aquaculture and/or in live holding systems for human consumption*. National Aquaculture Council Inc. Ed., Australia.

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

KAMINSKI, W.E.; PIEHLER, A. & WENZEL, J.J. (2006) ABC a subfamily transporters: structure, function and disease. *Bioch. Bioph. Acta*, 1762: 510-524.



KANEKO, G.; SHIRAKAMI, H.; HIRANO, Y.; OBA, M.; YOSHINAGA, H.; KHIEOKHAJONKHET, A.; NAGASAKA, R.; KONDO, H.; HIRONO, I. & USHIO, H. (2016) Diversity of lipid distribution in fish skeletal muscle. *Zool. Sci.*, 33(2): 170-178.

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

KERR, S. & LASENBY, T. (2000) Rainbow trout stocking in island lakes and streams. An annotated bibliography and literatura review. Fish and wildlife Branch, Ontario Ministry of Natural Resources, Peterborough, Ontario, 220p.

KLEINOW, K.; JARBOE, H. & SHOEMAKER, K. (1994) Comparative Pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aqua Sci.*, 51: 1205-1211.

KLEINOW, K. M.; JAMES, M. O. & LECH, J. J. (1992). Drug Pharmacokinetics and Metabolism in Food-Producing Fish and Crustaceans. *Xenobiotics and Food-Producing Animals*, 98-130.

KOC, F.; UNEY, K.; ATAMANAL, M.; TUMER, I & KABAN, G.(2009). Pharmacokinetic disposition of enrofloxacin in brown trout (*Salmo trutta fario*) after oral and intravenous administrations. *Aquaculture*, 295 (1-2): 142-144.

KUMAR, V. & ROY, S. (2017) Aquaculture Drugs: sources, active ingredients, pharmaceutic preparations and methods of administration. *J. Aquac. Res. Develop.*, 8 (9): 2-13.

KUMAR, S.; KUMAR, S. S.; KAUR, S. R.; KUMAR, D. V. & LAMBA, J.S. (2019) *In-vitro* Plasma Protein Binding of Marbofloxacin in Healthy and Disease Condition of Buffalo Calves. *J. Anim. Res.*, 9 (1): 75-78.

KYUCHUKOVA, R.; MILANOVA, A.; PAVLOVA, A. & LASHEV, L. (2015) Comparison of plasma and tissue disposition of enrofloxacin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*) after a single oral administration. Food Add. & Contaminants, Part A 2 (1): 35-39.

LAMBERT, A.; REGNOUF-DE-VAINS, J. B. & RUIZ-LÓPEZ, M. (2007). Structure of levofloxacin in hydrophilic and hydrophobic media: relationship to its antibacterial properties. Chem. Phys. Lett., 442: 281-284.

LEES, P. & ALIABADI, S. P. (2002) Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans. Int. J. Antimicrob. Agents, 19: 269-284.

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

LEES, P. & TOUTAIN, P.L. (2012) The role of pharmacokinetics in veterinary drug residues. Drug Test. Anal., 4 (Suppl. 1): 34-43.

LEEKHA, S.; TERRELL, C.H. & EDSON, R.S. (2011) General principles of antimicrobial therapy. Mayo Clin. Proc., 86 (2): 156-167.

LEWBART, G.A.; VADEN, S.; DEEN, J.; MANAUGH, C; WHITT, D.; DOI, A.; SMITH, T. & FLAMMER, K. (1997) Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral, and bath administration. J. vet. Pharmacol. Therap., 20: 124-128.

LEY 27231 (2015) Desarrollo Sustentable del Sector Acuícola. Sumario del Boletín Oficial N° 33288

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

LIANG, J.; LI, J.; ZHAO, F.; LIU, P. & CHANG, Z. (2012) Pharmacokinetics and tissue behavior of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in turbot *Scophthalmus maximus* at two water temperatures. Chinese J. Oceanol. Limnol., 30 (4): 644-653.

LUANGTONGKUM, T.; JEON, B.; HAN, J.; PLUMMER P.; LOGUE, C. & ZHANG, Q. (2009). Antibiotic resistance in Campylobacter: emergence, transmission and persistence. Future Microbiol., 4 (2): 189-200.

LUCHETTI, D. ; FABRIZZI, L.; GUANDALINI, E.; PODESTA, E.; MARAVASI, L.; ZAGHINI, A. & CONI, E. (2004) Long depletion time of enrofloxacin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Antimicrob. Agents Chemotherap., 48: 3912-3917.

LUCHINI, L. (2004) Perspectivas en acuicultura: nivel mundial, regional y local. Argentina. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA),

LUCHINI L (2007) El sector acuícola argentino. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura Dirección de Acuicultura.

LUCHINI, L. & PANNÉ HUIDOBRO, S. (2008) Perspectivas en acuicultura: nivel mundial, regional y local. Dirección de Acuicultura. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura-SAGPyA.

[http://www.agroindustria.gob.ar/site/pesca/acuicultura/06\\_Publicaciones/index.php](http://www.agroindustria.gob.ar/site/pesca/acuicultura/06_Publicaciones/index.php)

LUCHINI, L. (2009) Antecedentes sobre la calidad sanitaria, en relación al cultivo de salmónidos: Lago Nahuel Huapi, embalses de Alicurá y Piedra del Águila. Dirección de Acuicultura. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. SAGPyA. Buenos Aires, Argentina. p.108.

LÜDERS, C.; GARCÍA OVANDO, H.; ERRECALDE, C. & PRIETO, G. (2007) Farmacoterapia en acuicultura. En: San Andrés Larrea, M. & Boggio J. C. Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria. Ed. Intermédica, Buenos Aires. p.355-378.

LUNESTAD, B.T. & SAMUELSEN, O. (2008) Veterinary drug use in aquaculture. In: Lie O. Improving Farmed Fish Quality and Safety (Ed.). CRC Press, Boca Raton. p.97-127.

MALVISI, J.; I, DELLA ROCCA, G.; ANFOSSI, P. & GIORGETTI, G. (1997) Tissue distribution and depletion of flumequine after in-feed administration in sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 157: 197-204.

MANCINI, M. (2004) Farmacocinética, concentraciones tisulares de enrofloxacin y características sedantes de metomidato en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) bajo condiciones invernales y estivales. Tesis Magister. UBA.

MANCINI, M.; LUDERS, C.; PRIETO, G.; GARCÍA OVANDO, H.; ERRECALDE, C.; BUCCO, C.; BECHARA, J. & LUCHINI, L. (2005) Aplicación de metomidato en acuicultura. Una alternativa para el manejo de peces. Acta Resúmen XI Jornadas Latinoamericanas-XVI Nacionales de Fármaco-toxicología Veterinaria. Facultad Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

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

MARÍN, P.; LAI, O.; LARICCHIUTA, P.; MARZANO, G.; DI BELLO, A & CÁRCELES, C. (2009) Pharmacokinetics of marbofloxacin after a single oral dose to loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Res. Vet. Sci.*, 87 (2): 284-286.

MARIN CARRILLO, P. (2008) Aplicación de fluoroquinolonas en Medicina Veterinaria. Criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK-PD). (Tesis de Doctorado). Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, España. 162p.

MARTIN-JIMENEZ, T. (2015a) Capítulo1: Farmacocinética de Absorción y distribución de los fármacos. En: Botana, L.M. Farmacología Veterinaria: Fundamentos y aplicaciones terapéuticas. Ed. Panamericana, Buenos Aires. p.3-15.

MARTIN-JIMENEZ, T. (2015b) Capítulo2: Farmacocinética de distribución y eliminación. En: Botana, L. M. Farmacología Veterinaria: Fundamentos y aplicaciones terapéuticas. Ed. Panamericana, Buenos Aires. p.17-15.

MARTINEZ, M.; Mc DERMOTT, P. & WALKER, R. (2006) Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. Vet. J., 172 (1): 10-28.

MARTINSEN, B.; OPPEGAARD, H.; WICHSTROM, R. & MYHR, E. (1992) Temperature-dependent in vitro antimicrobial activity of four 4-quinolones and oxytetracycline against bacteria pathogenic to fish. Antimicrob. Agents Chemother., 36: 1738-1743.

MARTINSEN, B.; HORSBERG, T. E.; SOHLBERG, S. & BURKE, M. (1993). Single dose kinetic study of sarafloxacin after intravenous and oral administration of different formulations to Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in sea water at 8.5°C. Aquaculture, 118 (1-2), 37–47.

MARTINSEN, B.; HORSBERG, T.E & BURKE, M. (1994) Multiple-dose pharmacokinetic and depletion studies of sarafloxacin in Atlantic salmon, *Salmo salar*. J. Fish Dis., 17 (2): 111-121.

MARTINSEN, B., HORSBERG, T.E., LNGBRIGTSEN, K. & GROSS, I. L. (1994) Disposition of <sup>14</sup>C-sarafloxacin in Atlantic salmon *Salmo salar*, rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, cod *Gadus morhua* and turbot *Scophthalmus maximus*, as demonstrated by means of whole-body autoradiography and liquid scintillation counting. *Dis. Aquatic Org.*, 18: 37-44.

MARZO, A. & DAL BO, L. (1998) Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *J. Chromatogr.*, A812: 17-34.

MAŚLANKA, T.; JAROSZEWSKI, J.J. & CHROSTOWSKA, M. (2004) Pathogenesis of quinolone-induced arthropathy: a review of hypotheses. *Pol. J. Vet. Sci.*, 7 (4): 323-331.

MCKELLAR, Q.; SANCHEZ BRUNI, S. & JONES, D. (2004). Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 27: 503-514.

MC KINNON, P. S. & DAVIS, S. L. (2004) Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of bacterial infectious diseases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 23: 271-288.

MILLÁN-OCAMPO, L.; TORRES-CORTÉS, A.; MARÍN-MÉNDEZ, G.; RAMÍREZ-DUART, W.; VÁSQUEZ-PIÑEROS, M. A. & RONDÓN-BARRAGÁN, I. (2012) Concentración anestésica del eugenol en peces escalares (*Pterophyllum scalare*). *Rev. Inv. Vet. Perú*, 23 (2): 171-181.

MENDOZA-BOJORQUEZ, R. J. & PALOMINO-RAMOS, A.R. (2004) Manual de cría de truchas arco iris en jaulas flotantes. AECI/PADESPA, España. pp 31-35.

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

MILLER, R. A. (2018) Pharmacology in Aquatic Animals. In: Riviere, J. E. & Papich M. G. (Eds.) Veterinary Pharmacology and Therapeutics (10th Ed.). John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey. p.53: 1373-1394.

MINISTERIO DE SALUD Y MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y PESCA (2015) Resolución Conjunta 834/2015 y 391/2015. Boletín Oficial de la República Argentina, 33160: 20-27.

<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=248651>

MODRIC, S. (2014) Pharmacokinetic Principles for Understanding Drug Depletion as a Basis for Determination of Withdrawal Periods for Animal Drugs. In: Baynes, R. & Riviere J.E. Strategies for Reducing Drug and Chemical Residues in Food Animals. New Jersey. USA: John Wiley & Sons.

MORALES, G. A. & QUIRÓS, R. (2007) Desempeño productivo de la trucha arco iris en jaulas bajo diferentes estrategias de alimentación. Asoc. Latinoam. Prod. Animal, 15 (4): 119-127.

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

MUYLAERT, A. & MAINIL, J. (2013) Quinolones et fluoroquinolones: des décennies de développement et d'utilisation. Le point sur les molécules vétérinaire. Partie 1: le regard du bactériologiste. Ann. Méd. Vét., 158: 73-81.

MUYLAERT, A. & MAINIL, J. (2014) Quinolones et fluoroquinolones: des décennies de développement et d'utilisation Le point sur les molécules vétérinaires. Partie 2: le regard du vétérinaire. Ann. Méd. Vét, 158: 83-87.

NAYLOR, R.L.; GOLDBURG, R.J.; PRIMAVERA, J.H.; KAUTSKY, N.; BEVERIDGE, M.C.; CLAY, J.; FOLKE, C.; LUBCHENCO, J.; MOONEY, H. & TROELL, M. (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. Nature, 405: 1017.

NDIAYE, W.; DIOUF, K.; SAMBA, O.; NDIAYE, P. & PANFILI, J. (2015) The Length-Weight Relationship and Condition Factor of white grouper (*Epinephelus aeneus*, Geoffroy Saint Hilaire, 1817) at the south-west coast of Senegal, West Africa. *Int. J. Adv. Res.*, 3 (3): 145-153

NEIFFER, D.L. & STAMPER, M.A. (2009) Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *ILAR Journal*, 50 (4): 343-360.

NEUMANN, R.M.; GUY, C. & WILLIS, D.W. (2013) Length, weight, and associated indices. In: Zale, A. V., Parrish, D. L. & Sutton, T. M. (Eds.) *Fisheries Techniques*. Bethesda, MD: American Fisheries Society. pp. 637-676.

NIX, D. (2016). Toxicokinetics and toxicodynamics of anti-infective agents. In *Antibiotic Pharmacodynamic, Methods in Pharmacology and Toxicology*, por J. Rotschafer, D. Andes, K. Rodvold (Editors). Springer Science, New York: 159-173.

NOGA, E.J. (2010) *Fish Disease, Diagnosis and Treatment: Mosby-Year Book*. St. Louis.

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

NOUWS, J.F.; GRONDEL J.L.; SCHUTTE, A.R. & LAURENSEN, J. (1988) Pharmacokinetics of ciprofloxacin in carp, African catfish and rainbow trout. *Vet. Quarterly*, 10 (3): 211-216.

OKOCHA, R.; OLATOYE, I. & ADEDEJI, O. (2018) Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. *Pub. Health Rev.*, 39: 21.

ONUFRAK, N.; FORREST, A. & GONZALEZ, D. (2016). Pharmacokinetic and pharmacodynamic principles of anti-infective dosing. *Clin. Therap.*, 38 (9): 1930-1947.



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (2014) Código sanitario para los animales acuáticos. Título 7, Capítulo 7.3.: Aspectos relativos al bienestar en el aturdimiento y la matanza de peces de cultivo para consumo humano.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (2017) Código sanitario para los animales acuáticos. Título 7, Capítulo 7.3.7.: Aspectos relativos al bienestar en el aturdimiento y la matanza de peces de cultivo para consumo humano.

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

OWENS, R.C. & AMBROSE, P.G. (2005) Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 41: S144-157.

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

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

PALLO-ZIMMERMAN, L.; BYRON, J. & GRAVES, T. (2010) Fluoroquinolones: then and now. *Comp. Cont. Educ. Vet.*, 32 (7): E1-9.

PANNÉ HUIDOBRO, S. (2016) Producción por Acuicultura en Argentina en el 2016 Dirección de Acuicultura - DNPYP, Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Ministerio de Agroindustria.

PANNÉ HUIDOBRO, S. (2018) Producción de Acuicultura destinada al consumo humano en Argentina durante el año 2018. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, Argentina.

PAPICH, M.G & RIVIERE, J.M. (2009). Chapter 38: Fluoroquinolone antimicrobial drugs. En Papich M.G y RIVIERE J.M, *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Iowa, USA: IX (ed), Wiley-Blackwell. Paginas

PAPICH, M.G. (2011) Marbofloxacin. In: Papich, M. G. Saunders Handbook of Veterinary Drugs (4th Edition). Small and Large Animal. Elsevier, St. Louis. pp. 471-473.

PARK, Y.H.; HWANG, S.Y.; HONG, M.K. & KWON, K.H. (2012) Use of antimicrobial agents in aquaculture. *Rev. Sci. Tech.*, 31 (1): 189-197.

PASCHOAL, J.A.; QUESADA, S.P.; GONCALVES, L.U.; CYRINO, J.E. & REYES, F.G.R. (2013) Depletion study and estimation of the withdrawal period for enrofloxacin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 36: 594-602.

PAULIN, A.; SCHNEIDER, M.; DRON, F. & WOEHRLE, F. (2018) Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of marbofloxacin as a single injection for *Pasteurellaceae* respiratory infections in cattle using population pharmacokinetics and Monte Carlo simulations. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 41: 39-50.

PAULY, D. & ZELLER, D. (2017) Comments on FAOs state of world fisheries and aquaculture (SOFIA 2016). *Marine Policy*, 77: 176-181.

PEREIRA, A.M. (2009). Determinação de resíduos de fluoroquinolonas em amostras de tecido muscular de frangos e respectivo impacto na saúde humana. Coimbra, Portugal. Tesis de Magister.

PILCO QUESADA, S.; RIZZATO PASCHOAL, J.A. & REYES REYES, F.G. (2013) Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones- review. *J. Food Sci.*, 78 (9): 1321-1333.

PILLAY, T.V. & KUTTY, M.N. (2005) Aquaculture Principles and Practices (2<sup>nd</sup>. Ed.), Blackwell Publishing, Oxford.

POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; SEMENIUK, S.; NIEDZIELSKA, J. & EBLIS, R. (1990). Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues by liquid chromatography. Biomed. Chromatogr. 13: 279-285.

PLUMB, D.C. (2011). Marbofloxacin. In: Plumb, D. C. Veterinary Drugs Handbook (9ed.). Wiley Blackwell, Ames. pp. 844-846.

PRESCOTT, J. & BAGGOT, J. (2002) Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria (3ra.Ed.), Ed. Intermédica, Buenos Aires.

PRIETO, G.; ERRECALDE, C.; MANCINI, M; URZÚA, N.;TONINI, M.;SALAS, S. (2015) Valoración de la actividad depresora de diferentes concentraciones de eugenol en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) Rev. Med. Vet. (B. Aires), 96 (1): 21-25.

PROSAIA (Promoción de la Sanidad Animal y la Seguridad Alimentaria) (2013a) Guía N° 2: Guía para la validación de los métodos analíticos utilizados en matrices biológicas. Fundación PROSAIA. Buenos Aires. 21 pp.

PROSAIA (Promoción de la Sanidad Animal y la Seguridad Alimentaria) (2013b) Guía N° 1: Guía para el cálculo del período de retiro en tejidos comestibles. Buenos Aires, Argentina. 23 pp.

RAMOS, M.; ARANDA, A.; GARCIA, E.; REUVERS, T. & HOOGHUIS, H. (2003). Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr., B 789: 373-381.

RANJAN, A.; SAHU, N.P.; GUPTA, S. & AKLAKUR, A. (2017) Prospects of Medicated Feed in Aquaculture. Nutr. Food Sci. Int. J., 3 (4): 1-9.

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

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

REIMSCHUESSEL, R.; MILLER, R. A. & GIESEKER, C. M. (2013) Antimicrobial Drug Use in Aquaculture. In: Giguère, S.; Prescott, J.F. & Dowling, P.M. (Eds.) Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, (5th Ed.). John Wiley & Sons, Inc. Ames. pp. 645-661.

RIVIERE, J. E (2009) Pharmacokinetics. In: Riviere J.E & Papich M. Veterinary Pharmacology and Therapeutics (9 th ed.), Wiley-Blackwell, Iowa. pp.48-70.

RIVIERE, J. E (2011) Comparative pharmacokinetics: principles, techniques and applications (2nd. Ed.), John Wiley & Sons, Iowa.

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

RIVIERE, J. & SUNDLOF, S. (2009). Chemical residues in tissues of food animals. In: Papich, M.; Riviere, J. & Adams, H. (Eds.) Veterinary Pharmacology and Therapeutics (9th Ed.). Wiley-Blackwell Publishing, Ames. pp.1453-1462.

RODGERS, C. J. & FURONES, M.D. (2009) Antimicrobial agents in aquaculture: practice, needs and issues. In: Rogers C. & Basurco B. (Eds.). The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. Zaragoza: CIHEAM, 2009. Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens: (86) pp. 41-59.

ROGSTAD, A.; ELLINGSEN O. & SYVERTSEN, C. (1993) Pharmacokinetics and bioavailability of flumequine and oxolinic acid after various routes of administration to Atlantic salmon in seawater. *Aquaculture*, 110: 207-220

ROJO, A. L. (1988) Diccionario enciclopédico de anatomía de los peces. Monografías del Instituto Español de Oceanografía. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentos. Madrid. España. 3: 243 y 546.

ROSANOVA, M.; LEDEA, R.; CAPURROA, H.; PETRUNGAROA, V. & COPERTARI, P. (2010) Efectos adversos musculoesqueléticos por el uso de fluoroquinolonas en niños: un metaanálisis. *Arch. Argent. Pediatr.*, 108 (6): 524-531.

ROSENBAUM, S. (2017a). Drug elimination and clearance, en *Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics: an integrated textbook and computer simulations*, por S. Rosembaum (ed), 2 ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey: 99-144.

ROSENBAUM, S. (2017b). Drug distribution, en *Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics: an integrated textbook and computer simulations*, por S. Rosembaum (ed), 2 ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey: 71-98.

ROSENBAUM, S. (2017c). Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics. En *Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics: an integrated textbook and computer simulations*, por S. Rosembaum (ed), 2 ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey: 1-18.

ROUVEIX, B. (2003) Antibiotic Safety Assessment. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21: 215-221.

RUBIO LANGRE, S. (2011) Comportamiento farmacocinético de la marbofloxacina y de la enrofloxacina en llamas (*Lama glama*). Tesis Doctoral, Departamento de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.

RUBIO LIMONTA, M. & SILVEIRA COFFIGNY, R. (2009) Bienestar de los animales acuáticos, con fines de control sanitario. REDVET, 10 (8): 1-11.

SAKAI, M. & ESPINÓS, A. C. (1992). On the trout resource in Lake Buenos Aires, Southern Argentina. CEAN-JICA, 4. 26pp.

SALUSSO, M.N. (2008) Estudio de disposición y residuos tisulares de Levofloxacina en Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) destinada a consumo. Tesis de Maestría en Inocuidad y Calidad de Alimentos. UNRC.

SAMUELSEN, M. (2006) Pharmacokinetics of quinolones in fish: A review. Aquaculture, 255: 55-75.

SAN ANDRÉS LARREA, M. & BOGGIO, J.C. (2007) Antimicrobianos y Antiparasitarios en Medicina Veterinaria. Ed. Intermédica, Buenos Aires.

SÁNCHEZ CHOPA, F. (2012) Introducción a la producción agropecuaria. Acuicultura.

<http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Introduccion%20a%20la%20produccion%20agropecuaria/Documentos/2012/Resumen%20Acuicultura%202012.pdf>

SÁNCHEZ OSCANOVA, W.J. (2015) Evaluación del índice de condición y tasa específica de crecimiento en truchas arco iris en la piscigranja Casaracra de la U.N.C.P. Tesis de Grado. Universidad Nacional del Centro del Perú.

SARTI, M. & GIORGETTI, G. (1988). Terapia y Profilaxis en Ictiopatología. En: Espinosa de los Monteros, J. & Labaita, U. (eds). Patología en Acuicultura", Mundi-Prensa S.A. Madrid.

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

SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) (2011) Resolución 559/2011. Límites de Residuos en alimentos de origen animal.

SEPÚLVEDA, A. E.; MARTÍNEZ ENRÍQUEZ, M.E. & MENDOZA PATIÑO, N. (2008) Quinolonas. *Rev. Fac. Med. UNAM*, 51 (4): 173-177.

SHAN, Q.; BAI, Y.; FAN, J.; LIU, S.; YIN, Y.; LI, L. & ZHENG, G. (2017) Pharmacokinetics of marbofloxacin in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. South China Agric. Univ.*, 38 (1): 5-8.

SHARMA, P.C.; JAIN, A. & JAIN, S. (2009) Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol. Pharm. -Drug Res.*, 66 (6): 587-604.

SMITH, L. S. (1980) Digestion in Teleost Fishes. United Nations Development Programme Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. <http://www.fao.org/docrep/x5738e/x5738e00.htm#Contents>

SMITH, P. R.; LE BRETON, A.; HORSBERG, T. E. & CORSIN, F. (2008) Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: Guardabassi, L.; Jensen, L. B. & Kruse H. (Eds.) *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford. pp. 207-218.

SOHLBERG, S.; CZERWINSKA, K.; RASMUSSEN, K. & SBLI N. (1990) Plasma concentrations of flumequine after intraarterial and oral administration to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to low water temperatures. *Aquaculture*, 84: 355-361.

SOHLBERG, S.; AUIIEB, A. & EIVIND, N. (1994) Temperature-dependent absorption and elimination of flumequine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in fresh water. *Aquaculture*, 119: 1-10.

SOLDATOV, A. A. (2006) Organ blood flow and vessels of microcirculatory bed in fish. *J. Evolut. Biochem. Physiol.*, 42 (3): 243-252.

SOLOAGA, R. N. (2011) Farmacocinética y farmacodinamia (pK-pD), aplicación clínica. *Bioanálisis*: 22-34.

SONG J-H (2003). Introduction: the goal of antimicrobial therapy. *Int J infect Dis* 7: 1-4.

SÖRGEL, F. & KINZIG, M. (1993) Pharmacokinetics of gyrase inhibitors. Part 2: renal and hepatic elimination pathways and drug interactions. *Amer. J. Med.*, 94: 56-59.

SORIANO, F. (2002) Farmacodinamia: factor predictivo de eficacia. *An. Esp. Pediatr.*, 56 (Supl 1): 25-30

SORTINO, S.; DE GUIDI, G.; GIUFFRIDA, S.; MONTI, S. & VELARDITA, A. (1998) pH effects on the spectroscopic and photochemical behavior of enoxacin: a steady-state and time-resolved study. *Photochem. Photobiol.*, 67 (2): 167-173.

SPRANDEL, K.A. & RODVOLD, K.A. (2003) Safety and tolerability of fluoroquinolones. *Clin. Cornerstone*, Suppl 3: S 29-36.

SPROSTON, E.; WIMALARATHNA, H. & SHEPPARD, S.K. (2018). Tendencias en la resistencia a fluoroquinolonas en *Campylobacter*. *Microb Genom.*, 4 (8): e000198. doi: 10.1099 / mgen.0.000198



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

STAHLMANN, R. (2002) Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. Toxicol. Letters, 127: 269-277.

STAMM, J. (1992) In vitro activity and resistance development for sarafloxacin (A - 56620): An aquaculture antibacterial. In: Michel, C. & Alderman, D.J. (Eds.) Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Office International des Epizooties, Paris. pp. 333-339.

STEFFENAK, I.; HORMAZABAL, V. & YNDESTAD, M. (1991) Reservoir of quinolone residues in fish. Food Additives & Contaminants, 8 (6): 777-780.

STEHLY, G.R.; MEINERTZ, J.R. & GINGERICH, W. H. (1999) Comparative pharmacokinetics of sarafloxacin in rainbow trout and channel catfish. In: Smith, D.J.; Gingerich, W.H & Beconi-Barker, M.G. (Eds.) Xenobiotics in Fish. Springer Science+Business Media, New York. pp. 123-131.

STOFFREGEN, D.A., CHAKO, A.J., BACKMAN, S. & BABISH, J.G. (1993). Successful therapy of furunculosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using the fluoroquinolone antimicrobial agent enrofloxacin. J. Fish Dis., 16 (3): 219-228.

STOFFREGEN, D.A.; WOOSTER, G.A.; BUSTOS, P.S.; BOWSER, P.R. & BABISH, J.G. (1997). Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile Atlantic salmon. J. vet. Pharmacol. Therap., 20 (2): 111-123.

STOLKER, A.A. M. & BRINKMAN, U.A. (2005) Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals a review. J. Chromat., A1067: 15-53.

STOLKER, A.A.M. & DANAHER, M. (2012) Sample preparation: extraction and clean-up. In: WANG, J.; MacNEIL, J.D. & KAY, J.F. (Eds) Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food. p. 125-152.

STOSKOPF, M.K. (1993) Chemotherapeutics. In: Stoskopf, M,K. (Ed). Fish Medicine. W.B. Saunders, Philadelphia.

STOSKOPF, M.K. (2015). Biology and Management of Laboratory Fishes. In: Fox, G.J.; Otto, G.M: & Whary, M.T. (Eds.). Laboratory Animal Medicine (3rd. Ed.) p.1063-1083.

SUN, M.; LI, J.; GAI, C.; CHANG, Z.; LI, J. & ZHAO, F. (2013) Pharmacokinetics of difloxacin in olive flounder *Paralichthys olivaceus* at two water temperatures. J. vet. Pharmacol. Therap., 37 (2): 186-191.

SUTTON, S.C. (2017). Drug administration and drug absorption, en Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics: an integrated textbook and computer simulations, por S. Rosembaum (ed), 2 ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey: 35-70.

SUTTON, S.G.; BULT, T.P. & HAEDRICH. R.L. (2000) Relationships among Fat Weight, Body Weight, Water Weight, and Condition Factors in Wild Atlantic Salmon Parr. Trans. Amer.Fisheries Soc., 129 (2): 527-538.

TALERO-PÉREZ, V.; MEDINA, O. & ROZO-NÚÑEZ, W. (2014). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. Univ. Sci.,19 (1): 11-29.

TERZI, E.; CORUM, O.; BILEN, S.; KENANOGLU, O. N.; ATIK, O. & UNEY, K. (2020). Pharmacokinetics of danofloxacin in rainbow trout after different routes of administration. Aquaculture, 734984.

TOMALÁ, D.; CHAVARRÍA, J. & ESCOBAR, B. (2014) Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno de *Colossoma macropomum* en relación al peso corporal y temperatura del agua. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 42 (5): 971-979.

THOMPSON, M.; ELLISON, L.R. & WOOD, R. (2002) Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, 74 (5): 835-855.

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

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

TREVES-BROWN, K.M. (2000) *Applied fish pharmacology*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Massachusetts. pp: 117-142.

TYRPENOU, A. E.; KOTZAMANIS, Y.P. & ALEXIS, M.N. (2003) Flumequine depletion from muscle plus skin tissue of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed flumequine medicated feed in seawater at 18 and 24°C. *Aquaculture*, 220: 633-642.

UGWEMORUBONG UJAGWUNG, G. & OJO, A. A. (2011) Management of stress in fish for sustainable aquaculture. *Develop. Res.*, 3 (4): 28-38.

UENO, R.; OKUMURA, M.; HORIGUCHI, Y. & KUBOTA, S. (1988) Levels of oxolinic acid in cultured rainbow trout and amago salmon after oral administration. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54: 485-489.

UNO, K.; KATOB, M.; AOKIB, T.; KUBOTA, S. & UENOB, R. (1992) Pharmacokinetics of nalidixic acid in cultured rainbow trout and amago salmon. *Aquaculture*, 102: 297-307.

VAN DER LINDEN, P.; VAN DE LEI, J.; NAB, H.; KNOL, A. & STRICKER, B.H. (1999) Achilles tendinitis associated with fluoroquinolones. *J. Clin. Pharmacol.*, 48: 433-437.

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

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

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

WANG, J. & TURNIPSEED, S.B. (2012) Chemical analysis: quantitative and confirmatory methods. In: Wang J., MacNeil, J.D. & Kay J.F. (Eds.) *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food* (1st Ed.). John Wiley & Sons, Inc., New Jersey. pp 87-226.

WHEATON, F. (1993) Acuicultura. Diseño y construcción de sistemas. AGT Editor S.A. México. 704 p.

WILSON, J.C. & MACMILLAN, J.R. (1990) Evaluation of two aryl-fluoroquinolones against bacterial pathogens of channel catfish. *J. Aq. Anim. Health*, 1: 222-226.

WINDELL, J.T.; KITCHELL, J.F.; NORRIS, D.O.; NORRIS, J.S. & FOLTZ, J.W. (1976) Temperature and rate of gastric evacuation by rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 6: 712-717.

WRIGHT, D.H.; BROWN, G.H.; PETERSON, M.L. & ROTSCHAFFER, J.C. (2000) Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 46: 669-683.

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

ZAHL, I.H.; SAMUELSEN, O. & KIESSLING, A. (2012) Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol. Biochem.*, 38: 201-218.

ZHU, Y; TAN, Y.; WANG, C.; ZHANG, N.; LIU, Y.; LIU, L.; LU, X. & CAO, J. (2009) Pharmacokinetics and tissue residues of marbofloxacin in crucian carp (*Carassius auratus*) after oral administration. *Aquaculture Res.*, 40 (6): 696-709.