

DETERMINACIÓN MEDIANTE HPLC/UV DE LOS NIVELES SÉRICOS DE ENROFLOXACINA, CIPROFLOXACINA Y MARBOFLOXACINA, TRAS ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA EN LLAMAS

*Matías Lorenzutti, *Virginia Martínez Espeche y *Soledad Aguilar.

Tutores: Nicolás Litterio* y Sonia Rubio Langre**.

* Cátedra de Farmacología y Toxicología, Facultad De Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica De Córdoba, Córdoba, Argentina.

** Departamento de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

INTRODUCCIÓN

La llama es una especie autóctona que abarca gran parte de la región del noroeste Argentino, Bolivia, Perú y Chile. Es una especie perfectamente adaptada a su medio ambiente que posee bajo impacto ecológico y a partir de la cual se obtiene fibra (producto de exportación), carne y es utilizada como animal de carga por la población de la región. Debido a ello se la considera una posible fuente de desarrollo sustentable para la economía local, la cual es en general de bajos recursos. De esta manera es deseable hacer más eficientes las explotaciones que en la actualidad son predominantemente de tipo extensivo a campo. Uno de los problemas que surgen de forma inevitable al producir más intensivamente, es el aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas y parasitarias, lo cual genera una disminución en la producción. Para solucionar los focos infecciosos emergentes es necesario el uso de antimicrobianos.

Las fluoroquinolonas son un grupo de antimicrobianos de amplio espectro potencialmente eficaces frente a gran parte de los agentes causantes de las infecciones más comunes en camélidos sudamericanos.

Debido a que los protocolos terapéuticos no son los mismos en diferentes especies de interés veterinario, sumado a que no existen investigaciones sobre fluoroquinolonas en esta especie, es necesario realizar estudios que permitan el diseño de un régimen posológico eficaz y seguro para diversos agentes del grupo.

Enrofloxacin y Marbofloxacin son dos fluoroquinolonas dise~nadas exclusivamente para uso veterinario, cuyo mecanismo de acci3n consiste en inhibir la DNA girasa bacteriana. Su espectro de actividad incluye a Gram -, algunos Gram + y mycoplasmas. Enrofloxacin se metaboliza a nivel hep~tico en ciprofloxacin que es una quinolona de uso humano. ~nicamente hemos encontrado datos sobre el comportamiento cin~tico de enrofloxacin en llamas. Destacamos el estudio de Kreil *et al.* en llamas, tras administraci3n de dosis ~nica por v~a IV, IM/oral (2001). Estos autores utilizan un ensayo microbiol3gico que no les permite diferenciar entre niveles de enrofloxacin y de ciprofloxacin (metabolito activo) por lo que presenta sus resultados como actividad antimicrobiana frente a concentraci3n de enrofloxacin.

El objetivo de este trabajo es poner a punto una t~cnica de detecci3n y cuantificaci3n de enrofloxacin, de ciprofloxacin y de marbofloxacin, mediante HPLC/uv (Cromatograf~a L~quida de alta Resoluci3n con detecci3n ultravioleta) que permita evaluar las concentraciones presentes en muestras s~ricas problema. A partir de los niveles s~ricos de f~rmaco se calcular~n los par~metros farmacocin~ticos que nos permitan describir matem~ticamente los procesos ADME. As~ mismo estos par~metros enfrentados con par~metros de eficacia (CIM₉₀) permitir~n evaluar diferentes pautas posol3gicas y establecer r~gmenes acordes a las necesidades del cl~nico y que permitan alcanzar concentraciones eficaces y al mismo tiempo minimizar la toxicidad y el desarrollo de resistencia.

MATERIALES Y M~TODOS

El muestreo a campo se realiz3 en las instalaciones de la Universidad Cat3lica de C3rdoba, Argentina. El estudio se desarroll3 sobre 6 llamas, hembras, cl~nicamente sanas, no gestantes. Se administr3, por v~a endovenosa, una dosis de 5 mg/Kg de enrofloxacin (Baytril[®] 5%, Laboratorios Bayer[®]) o de marbofloxacin (Marbocyl[®] 10%, lab. Vetoquinol[®]). Se colectaron muestras de sangre de la yugular contralateral a tiempos previamente definidos. El suero fue separado, identificado y almacenado inicialmente en refrigeraci3n (durante un par de horas) y posteriormente bajo congelaci3n (-20°C) hasta ser procesado (<2meses). Para el traslado de las muestras se solicitaron los correspondientes permisos de exportaci3n e importaci3n.

La cuantificación de los niveles séricos de enrofloxacin, ciprofloxacina y marbofloxacina la realizamos, mediante la técnica de HPLC/uv, en el laboratorio de Farmacología del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, España. Para la detección de todas las moléculas mencionadas se utilizó ofloxacina como patrón interno (adicionando una concentración fija a cada muestra: 2,5 µg/mL). Las muestras fueron extraídas y detectadas mediante la técnica descrita Cester *et al.* (1996). Para la validación de la técnica se determinaron la especificidad, linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, variación inter- e intra- día, LD (límite de detección), LC (límite de cuantificación) y porcentaje de recuperación de la técnica extractiva. Se establecieron las correspondientes rectas de ajuste, para enrofloxacin, ciprofloxacina y marbofloxacina, a partir de muestras de suero medicadas con diluciones de los fármacos patrón (0,025-15 µg/mL) y sometidas a la técnica extractiva (en presencia de patrón interno). Mediante la ecuación de la recta se transformaron los valores de $ABC_{\text{Fármaco}}/ABC_{\text{PatrónInterno}}$ (extraídos del cromatograma de cada muestra problema) en valores de concentraciones séricas de fármaco (y/o metabolito).

Los valores promedio de los datos de concentraciones séricas de las seis llamas se graficaron frente al tiempo. De este modo se obtuvieron las curvas correspondientes a la evolución sérica de cada antimicrobiano estudiado.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Las técnicas de extracción y detección demostraron ser validas para la cuantificación de las tres fluoroquinolonas objeto de estudio, para cada uno de los parámetros anteriormente expuestos.

Los niveles de enrofloxacin y ciprofloxacina se detectaron conjuntamente, bajo las mismas condiciones cromatográficas. Para la detección de los niveles séricos de marbofloxacina se modificó el flujo y la longitud de onda. Ofloxacino, como patrón interno, fue validado en ambas condiciones cromatográficas.

Las Figuras 1 y 2 recogen dos cromatogramas, en los que se muestran los tiempos de retención que identifican a los fármacos estudiados y al patrón interno.

El perfil de evolución sérico que muestran las curvas de enrofloxacin y marbofloxacin se corresponden con el de una administraci3n endovenosa en forma de bolo. Es similar al descrito por Kreil *et al.* (2001).

Las concentraciones de ciprofloxacin observadas son menores al 10% de las alcanzadas por enrofloxacin. Estas bajas concentraciones podr3an deberse al menor metabolismo de la droga en esta especie, en comparaci3n con otras especies de inter3s veterinario, o a una eliminaci3n m3s r3pida del organismo, o bien a ambas causas.

Las gr3ficas de evoluci3n sugieren que tanto marbofloxacin como enrofloxacin alcanzan concentraciones potencialmente eficaces frente a las CIM de los pat3genos comunes en llamas.

CONCLUSIONES

- 1.- Se ha validado una t3cnica de HPLC/uv que permite cuantificar los niveles de enrofloxacin, ciprofloxacin y marbofloxacin, en muestras de suero de llama, en el intervalo 0,025-15 $\mu\text{g/mL}$.
- 2.- Se aprecian variaciones interindividuales en el comportamiento cin3tico de enrofloxacin tras administraci3n intravenosa en llamas.
- 3.- Los datos obtenidos sugieren que enrofloxacin y marbofloxacin podr3an ser potencialmente eficaces en el tratamiento de infecciones habituales en llamas (causadas por agentes sensibles a estas fluoroquinolonas).
- 3.- Los bajos niveles de ciprofloxacin detectados en suero sugieren que este metabolito no participaría en la eficacia antimicrobiana del r3gimen estudiado, tal como sucede en otras especies.
- 4.- Deben realizarse nuevos estudios, tras administraci3n de dosis 3nicas y m3ltiples por diferentes v3as, con objeto de establecer r3gimenes eficaces y seguros, que den respuestas a las necesidades cl3nicas.
- 5.- Los datos obtenidos en los estudios farmacocin3ticos deben confirmarse en la pr3ctica cl3nica.

Agradecimientos

A la Universidad Católica de Córdoba (Argentina). A la Universidad Complutense de Madrid. A laboratorios Bayer® y laboratorios Vetoquinol®, por ceder los patrones. A Bayer AG., por financiar parcialmente el estudio.

Este estudio forma parte del Proyecto PIC AECI A/5944/06.

BIBLIOGRAFÍA

- Cester *et al.* (1996). Comparative kinetics of two orally administered fluoroquinolones in dog: enrofloxacin *versus* marbofloxacin. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 147, 703-706.
- Christensen, J.M., *et al.* (1996). The disposition of five therapeutically important antimicrobial agents in llamas. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 19, 431-438.
- Garry, F. *et al.* (1994). Clinical pathology of llamas. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 10(2):201-9
- Kreil, V. *et al.* (2001). Pharmacokinetics of enrofloxacin in llamas (*Lama glama*). *Revista InVet*. 3:55-62
- Martinez, M. *et al.* (2005) Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal* 172:10-28
- Prescott, J.F. & Yielding, K.M. (1990). *In vitro* susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. *Canadian Journal Veterinary Research*, 54:195-197.
- Toutain, P.L. *et al.* (2002). The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science*, 73:105-114.

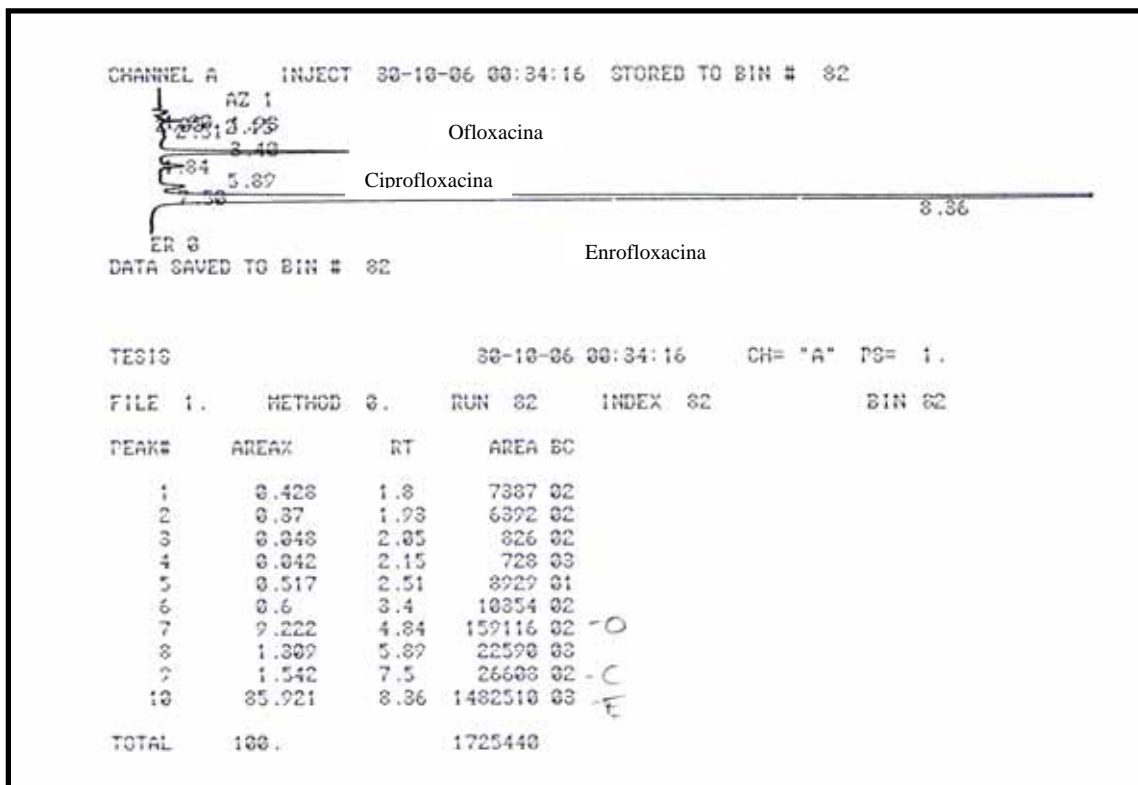


Figura 1: cromatograma de enrofloxacin, ciprofloxacin y ofloxacin.

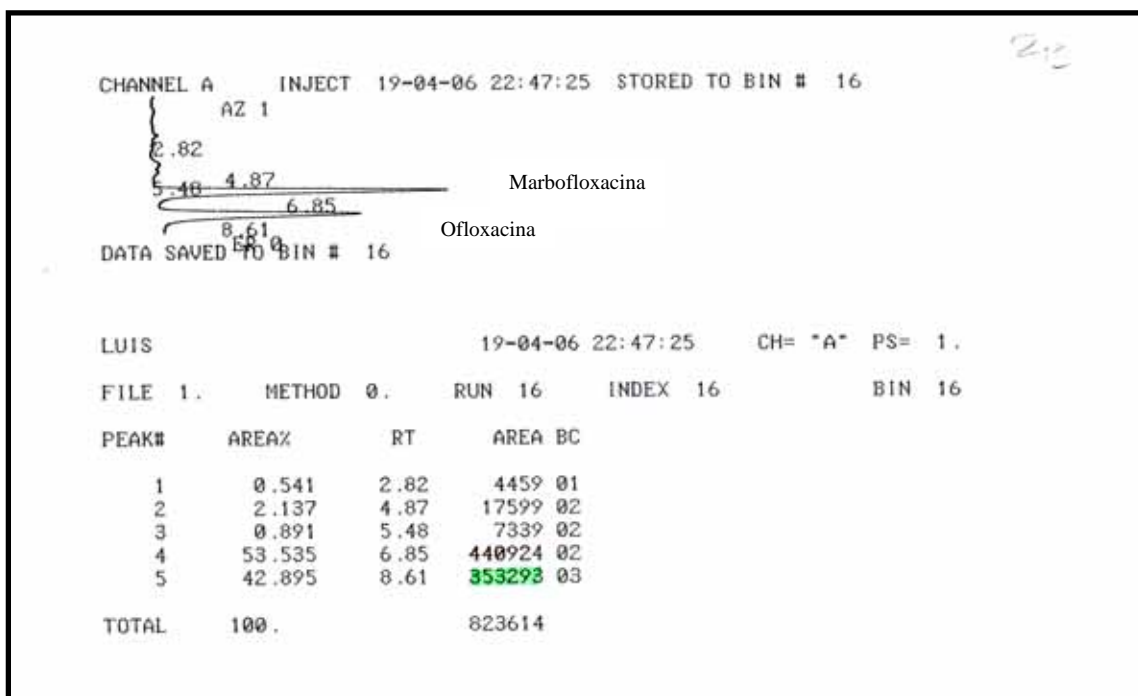


Figura 2: cromatograma de marbofloxacin y ofloxacin.

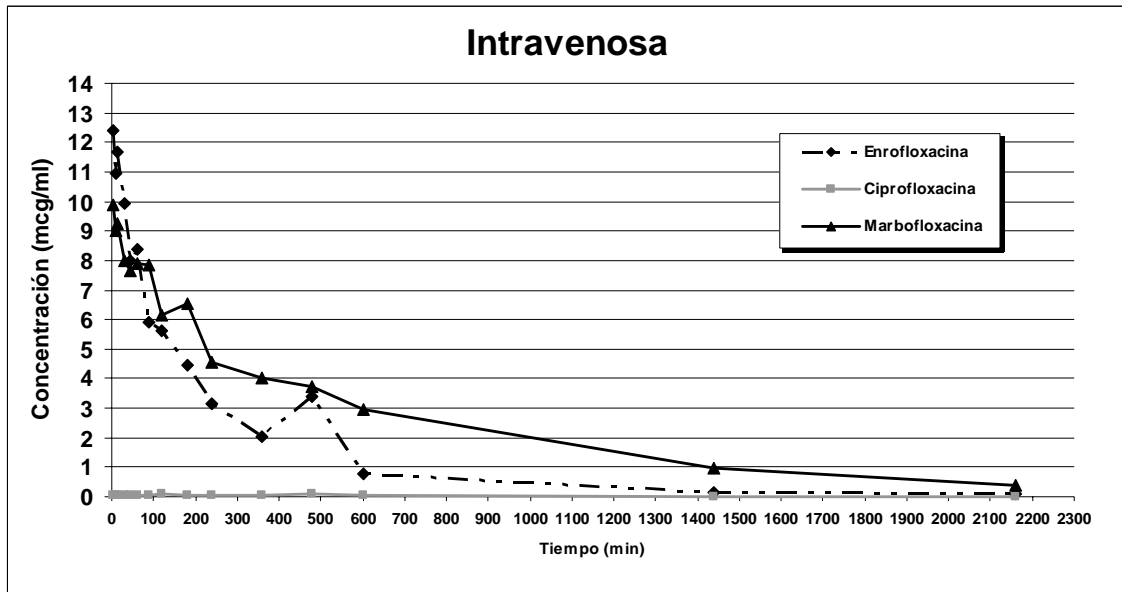


Figura 3: evolución de los niveles plasmáticos de enrofloxacin (metabolito ciprofloxacin) y marbofloxacin, tras su administración IV en llamas (n=6).