



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo y validación de un método analítico
por cromatografía de líquidos de alta resolución
para cuantificar el contenido de ciprofloxacino y
enrofloxacino en plasma sanguíneo y leche de
vaca**

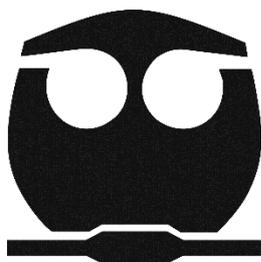
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A N:

MIGUEL ALDANA SAMPAYO

WENDY FABIOLA GUTIÉRREZ BENÍTEZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

- Presidente:** Profesor: Inés Fuentes Noriega
- Vocal:** Profesor: Juan Manuel Rodríguez
- Secretario:** Profesor: Blanca Estela Rivero Cruz
- 1er. suplente:** Profesor: Ma. De los Dolores Campos Echeverría
- 2do. suplente:** Profesor: Kenneth Rubio Carrasco

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 113. Conjunto E

Facultad de Química UNAM

Asesor

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

Supervisor Técnico

M.C. Kenneth Rubio Carrasco

Sustentantes

Miguel Aldana Sampayo

Wendy Fabiola Gutiérrez Benítez



ÍNDICE	Página
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Mastitis bovina	4
2.2 La mastitis bovina y su impacto en la calidad de la leche	4
2.3 Clasificación de la mastitis	6
2.3.1 Mastitis subclínica	6
2.3.2 Mastitis clínica	6
2.4 Microorganismos patógenos asociados a mastitis bovina	7
2.5 Uso de antibióticos en medicina veterinaria	8
2.6 Quinolonas	9
2.6.1 Comportamiento ácido-base	10
2.6.2 Clasificación de las quinolonas	10
2.6.3 Mecanismo de acción	11
2.6.4 Resistencia a las quinolonas	11
2.6.5 Interacciones y efectos adversos de las quinolonas	12
2.6.6 Quinolonas de uso veterinario	12
2.6.7 Enrofloxacino para el tratamiento de la mastitis bovina	14
2.6.7.1 Propiedades fisicoquímicas	15
2.6.7.2 Farmacocinética de enrofloxacino	16
2.6.7.2.1 Absorción	16
2.6.7.2.2 Distribución	16



	Página
2.6.7.2.3 Metabolismo y excreción	17
2.7 Validación del método analítico	18
2.7.1 Linealidad	18
2.7.2 Precisión	18
2.7.3 Repetibilidad	19
2.7.4 Reproducibilidad	19
2.7.5 Selectividad	19
2.7.6 Límite de detección	19
2.7.7 Límite de cuantificación	19
2.7.8 Exactitud	19
2.7.9 Recobro absoluto	19
2.7.10 Estabilidad	20
2.7.11 Robustez	20
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	21
3.1 Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	21
3.2 Preparación de las soluciones stock	22
3.3 Curva de calibración	22
3.4 Puntos control de calidad	23
3.5 Método de extracción	23
3.6 Evaluación de los parámetros de desempeño del método analítico	24
3.6.1 Adecuabilidad del sistema	24
3.6.2 Especificidad	24



	Página
3.6.3 Linealidad	25
3.6.3.1 Linealidad del sistema	25
3.6.3.2 Linealidad del método	25
3.6.4 Limite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC)	26
3.6.5 Precisión	26
3.6.5.1 Precisión del sistema	26
3.6.5.2 Repetibilidad (precisión intradía)	27
3.6.5.3 Reproducibilidad entre analistas	27
3.6.6 Exactitud	27
3.6.7 Estabilidad	28
3.6.7.1 Ciclos de congelación-descongelación	28
3.6.7.2 Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente	29
3.6.7.3 Estabilidad de las muestras en refrigeración	29
3.6.7.4 Estabilidad de las muestras procesadas sin reconstituir en refrigeración o congelación	29
3.6.8 Robustez	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 Evaluación de los parámetros de desempeño	35
4.1.1 Validación del sistema	35
4.1.1.1 Adecuabilidad	35
4.1.1.2 Especificidad	36
4.1.1.3 Linealidad	39



	Página
4.1.1.4 Precisión	43
4.2 Validación del método analítico	44
4.2.1 Especificidad analítica de la muestra	44
4.2.2 Linealidad	50
4.2.3 Límite de cuantificación (LC)	57
4.2.4 Precisión	58
4.2.4.1 Repetibilidad (precisión intradía)	58
4.2.4.2 Reproducibilidad entre analistas	61
4.2.5 Exactitud	62
4.2.6 Estabilidad	65
4.2.6.1 Ciclos de congelación-descongelación	66
4.2.6.2 Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente	67
4.2.6.3 Estabilidad de las muestras en refrigeración	68
4.2.6.4 Estabilidad de las muestras procesadas sin reconstituir en refrigeración o congelación	68
4.2.7 Robustez	69
5. CONCLUSIONES	75
6. PERSPECTIVAS	75
7. BIBLIOGRAFIA	76
ANEXO	80
ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS	Vii
LISTA DE ABREVIATURAS	Viii

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Fuentes más comunes y formas de diseminación de las bacterias más comunes productoras de mastitis.	8
Tabla 2	Clasificación de las quinolonas	10
Tabla 3	Interacciones entre quinolonas y otros fármacos	12
Tabla 4	Propiedades fisicoquímicas del enrofloxacin y ciprofloxacino.	15
Tabla 5	Parámetros farmacocinéticos del enrofloxacin administrado (5 mg/kg) por vía I.M., I.V. y oral en bovinos.	17
Tabla 6	Condiciones de operación cromatográficas para validar el método desarrollado.	22
Tabla 7	Alícuotas tomadas a partir de las soluciones stock de ciprofloxacino y enrofloxacin.	23
Tabla 8	Alícuotas tomadas a partir de las soluciones stock de ciprofloxacino y enrofloxacin.	23
Tabla 9	Condiciones experimentales para evaluar la especificidad del método.	25
Tabla 10	Condiciones modificadas de operación para evaluar la robustez.	30
Tabla 11	Métodos reportados en la literatura para cuantificar el contenido de enrofloxacin en matrices biológicas.	33
Tabla 12	Resultados obtenidos para evaluar la adecuabilidad del sistema.	35
Tabla 13	Resultados obtenidos para una muestra en solución para ciprofloxacino.	36
Tabla 14	Resultados obtenidos para una muestra en solución para enrofloxacin.	37
Tabla 15	Porcentajes de degradación para cada tratamiento, en solución.	38
Tabla 16	Resultados de linealidad del sistema para ciprofloxacino.	40
Tabla 17	Resultados de linealidad del sistema para enrofloxacin.	40
Tabla 18	Regresión lineal del sistema para el ciprofloxacino y el enrofloxacin.	42



		Página
Tabla 19	Intervalos de confianza para la ordenada al origen y la pendiente.	42
Tabla 20	Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema para ciprofloxacino.	42
Tabla 21	Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema para enrofloxacino.	43
Tabla 22	Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema para ciprofloxacino y enrofloxacino.	44
Tabla 23	Resultados obtenidos para una muestra de ciprofloxacino en un pool de plasma.	46
Tabla 24	Resultados obtenidos para una muestra de enrofloxacino en un pool de plasma.	46
Tabla 25	Porcentajes de degradación para cada tratamiento, en plasma.	46
Tabla 26	Resultados obtenidos para una muestra de ciprofloxacino en leche.	48
Tabla 27	Resultados obtenidos para una muestra de enrofloxacino en leche.	48
Tabla 28	Porcentajes de degradación para cada tratamiento en leche.	48
Tabla 29	Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del método con ciprofloxacino en plasma.	51
Tabla 30	Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del método con enrofloxacino en plasma.	51
Tabla 31	Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del método con ciprofloxacino en leche.	53
Tabla 32	Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del método con enrofloxacino en leche.	53
Tabla 33	Regresión lineal del método para cuantificar ciprofloxacino y enrofloxacino en plasma.	55
Tabla 34	Regresión lineal del método para cuantificar ciprofloxacino y enrofloxacino en leche.	55
Tabla 35	Análisis de varianza de la regresión lineal del método para cuantificar ciprofloxacino en plasma.	55



		Página
Tabla 36	Análisis de varianza de la regresión lineal del método para cuantificar enrofloxacino en plasma.	56
Tabla 37	Análisis de varianza de la regresión lineal del método para cuantificar ciprofloxacino en leche.	56
Tabla 38	Análisis de varianza de la regresión lineal del método para cuantificar enrofloxacino en leche.	56
Tabla 39	Intervalos de confianza para la ordenada al origen y la pendiente de los modelos de linealidad del método utilizando plasma.	56
Tabla 40	Intervalos de confianza para la ordenada al origen y la pendiente de los modelos de linealidad del método utilizando leche.	57
Tabla 41	Resultados para evaluar el límite de cuantificación en plasma.	57
Tabla 42	Resultados para evaluar el límite de cuantificación en leche.	58
Tabla 43	Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad (precisión intradía) del ciprofloxacino y plasma.	59
Tabla 44	Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad (precisión intradía) del enrofloxacino y plasma.	59
Tabla 45	Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad (precisión intradía) del ciprofloxacino y leche.	60
Tabla 46	Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad (precisión intradía) del enrofloxacino y leche.	60
Tabla 47	Resultados para evaluar la reproducibilidad entre analistas en plasma para ciprofloxacino.	61
Tabla 48	Resultados para evaluar la reproducibilidad entre analistas en plasma para enrofloxacino.	61
Tabla 49	Resultados para evaluar la reproducibilidad entre analistas en leche para ciprofloxacino.	62
Tabla 50	Resultados para evaluar la reproducibilidad entre analistas en leche para enrofloxacino.	62
Tabla 51	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando ciprofloxacino y plasma.	63



		Página
Tabla 52	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando enrofloxacino y plasma.	64
Tabla 53	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando ciprofloxacino y leche.	64
Tabla 54	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando enrofloxacino y leche.	65
Tabla 55	Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad mediante ciclos de congelación y descongelación del ciprofloxacino en plasma.	66
Tabla 56	Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad mediante ciclos de congelación y descongelación del enrofloxacino en plasma.	66
Tabla 57	Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra con ciprofloxacino, a temperatura ambiente, en plasma.	67
Tabla 58	Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra con enrofloxacino, a temperatura ambiente, en plasma.	67
Tabla 59	Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra con ciprofloxacino, en refrigeración, en plasma.	68
Tabla 60	Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra con enrofloxacino, en refrigeración, en plasma.	68
Tabla 61	Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra procesada y sin reconstituir en refrigeración con ciprofloxacino en plasma.	69
Tabla 62	Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestras procesada y sin reconstituir en refrigeración con enrofloxacino en plasma.	69
Tabla 63	Resultados obtenidos para evaluar la robustez con ciprofloxacino en plasma.	70
Tabla 64	Resultados obtenidos para evaluar la robustez con enrofloxacino en plasma.	71



ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Principales rutas de transmisión bacteriana durante el ordeño.	7
Figura 2	Estructura general de las quinolonas: X = C o N; R ₁ = ciclopropil (Enrofloxacino), etil (Norfloxacino), fluorofenilo (Difloxacino), anillo tiazínico u oxacínico (Levofloxacino); R ₂ = piperazinil (Ciprofloxacino), metilpiperazinil (Marbofloxacino).	9
Figura 3	Estructuras química de las principales quinolonas de uso veterinario.	13
Figura 4	Cromatograma generado por el ciprofloxacino (t _R = 7.9) y el enrofloxacino (t _R =10.3) en plasma sanguíneo de vaca.	32
Figura 5	Cromatograma generado por el ciprofloxacino (t _R = 8.5) y el enrofloxacino (t _R =11.1) en leche de vaca.	32
Figura 6	Cromatograma correspondiente a una solución de ciprofloxacino y enrofloxacino a una concentración de 4 µg/mL.	36
Figura 7	Cromatograma correspondiente a una solución de ciprofloxacino y enrofloxacino a la concentración de 1 µg/mL antes de ser sometido a degradación.	37
Figura 8	Cromatograma correspondiente a una solución de ciprofloxacino y enrofloxacino a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con HCl 1M.	37
Figura 9	Cromatograma correspondiente a una solución de ciprofloxacino y enrofloxacino a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con NaOH 1M.	38
Figura 10	Cromatograma correspondiente a una solución de ciprofloxacino y enrofloxacino a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con H ₂ O ₂ al 10%.	38
Figura 11	Cromatograma correspondiente a una muestra blanco de plasma sin adición de los antibióticos.	45
Figura 12	Cromatograma correspondiente a una muestra blanco de leche sin adición de los antibióticos.	45



		Página
Figura 13	Cromatograma correspondiente a una muestra blanco de un plasma hemolizado.	45
Figura 14	Cromatograma correspondiente a una muestra de pool de plasma adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacinó a la concentración de 1 µg/mL, antes de ser sometido a degradación.	47
Figura 15	Cromatograma correspondiente a una muestra de pool de plasma adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacinó a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con HCl 1M.	47
Figura 16	Cromatograma correspondiente a una muestra de pool de plasma adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacinó a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con NaOH 1M.	47
Figura 17	Cromatograma correspondiente a una muestra de pool de plasma adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacinó a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con H ₂ O ₂ al 10%.	48
Figura 18	Cromatograma correspondiente a una muestra de leche adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacinó a la concentración de 1 µg/mL antes de ser sometido a degradación.	49
Figura 19	Cromatograma correspondiente a una muestra de leche adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacinó a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con HCl 1M.	49
Figura 20	Cromatograma correspondiente a una muestra de leche adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacinó a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con NaOH 1M.	49
Figura 21	Cromatograma correspondiente a una muestra de leche adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacinó a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con H ₂ O ₂ al 10%.	50
Figura 22	Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacinó a una concentración de 6 µg/mL en condiciones normales de operación.	72
Figura 23	Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacinó a una concentración de 4 µg/mL utilizando como fase móvil ACN: MEOH: H ₂ O en proporción 238:42:720, 0.56% de TEA y 0.56% de H ₃ PO ₄ .	72



		Página
Figura 24	Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacino a una concentración de 6 µg/mL utilizando como fase móvil ACN: MEOH: H ₂ O en proporción 102:18:880, 0.24% de TEA y 0.24% de H ₃ PO ₄ .	72
Figura 25	Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacino a una concentración de 6 µg/mL utilizando un flujo de 0.84 mL/min.	73
Figura 26	Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacino a una concentración de 6 µg/mL utilizando un flujo de 0.36 mL/min.	73
Figura 27	Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacino a una concentración de 6 µg/mL utilizando un volumen de inyección de 70 µL.	73
Figura 28	Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacino a una concentración de 6 µg/mL utilizando un volumen de inyección de 30 µL.	74

ÍNDICE DE GRÁFICAS

		Página
Gráfica 1	Linealidad del sistema para cuantificar ciprofloxacino.	41
Gráfica 2	Linealidad del sistema para cuantificar enrofloxacino.	41
Gráfica 3	Linealidad del método para el ciprofloxacino en plasma.	52
Gráfica 4	Linealidad del método para el enrofloxacino en plasma.	52
Gráfica 5	Linealidad del método para el ciprofloxacino en leche.	54
Gráfica 6	Linealidad del método para el enrofloxacino en leche.	54



LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
LMR	Límite Máximo de Residuos
EMEA	Agencia Europea de Medicamentos
FDA	Food and Drug Administration
UV	Ultravioleta
NOM	Norma Oficial Mexicana
pH	Potencial de hidrógeno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
QRDR	Quinolone Resistance Determining Region
CAS	Chemical Abstracts Service
Log P	Coefficiente de partición
pKa	Constante de disociación ácida
ABC	Área Bajo la Curva
S.C.	Subcutánea
I.V.	Intravenosa
I.M.	Intramuscular
ppb	Partes por billón
Vd	Volumen de distribución
Cl	Depuración
C_{máx}	Concentración máxima
T_{máx}	Tiempo en el que se alcanza la máxima concentración
F	Biodisponibilidad
ACN	Acetonitrilo
MEOH	Metanol
H₂O	Agua
H₃PO₄	Ácido fosfórico
TEA	Trietilamina
µm	Micrómetro
mL	Mililitro
min	Minuto
°C	Grado Centígrado
nm	Nanómetro
µg	Microgramo
mg	Miligramo
kg	Kilogramo
%	Porcentaje
µL	Microlitro
CH₂Cl₂	Diclorometano
rpm	Revoluciones por minuto
x	Concentración
y	Área bajo la curva



ABREVIATURA	SIGNIFICADO
NaOH	Hidróxido de sodio
HCl	Ácido clorhídrico
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
r	Coefficiente de correlación
r²	Coefficiente de determinación
β₁	Pendiente de la recta
β₀	Ordenada al origen
IC	Intervalo de confianza
LC	Límite de cuantificación
CV	Coefficiente de variación
t₀	Tiempo cero
ȳ	Promedio
s	Desviación estándar
t_R	Tiempo de retención
F	F de Fisher
DEA	Desviación Estándar Absoluta



1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La mastitis es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria ocasionada por factores físicos, químicos, mecánicos o infecciosos y representa la enfermedad más común en los bovinos. Puede presentarse de forma clínica y subclínica. Sin embargo, el tipo más frecuente e importante es la forma subclínica. Mundialmente, está considerada, como la enfermedad de mayor prevalencia en los hatos lecheros y se presenta con mayor frecuencia cuando los animales están sometidos a estrés (Harmon, 1994).

En medicina veterinaria el uso de quinolonas como agentes antimicrobianos son la principal herramienta terapéutica para el control y el tratamiento de las enfermedades infecciosas de origen bacteriano en los animales (como la mastitis). En este sentido, cuando se administra un antibiótico a la glándula mamaria bovina, éste se distribuye en el tejido mamario y se transfiere al torrente sanguíneo por un mecanismo fisicoquímico que depende del valor del pKa; del pH del plasma sanguíneo; de la proteína ligada al antibiótico y del valor del pH de la leche. Así, de la dosis administrada a la glándula mamaria, una parte es absorbida y pasa al torrente sanguíneo y otra parte es excretada a la leche contaminándola durante los ordeños posteriores (Gutiérrez, 2005). Es por ello, que la presencia de residuos de agentes quimioterapéuticos en el suero y la leche se ha convertido en un tema de interés para los consumidores ya que representa un riesgo para el consumo humano.

Diversos estudios han permitido establecer que entre los principales problemas de salud pública que generan los residuos de antimicrobianos, en los productos de origen animal, se encuentran las reacciones anafilácticas, las alteraciones de la biota intestinal, las reacciones tóxicas específicas y la resistencia a los antimicrobianos (Harmon, 1994). Debido a los riesgos que presentan estos residuos, diferentes organismos internacionales (EMEA, FDA y *Codex Alimentarius*) han creado normas y códigos de seguridad con los que garanticen una ingesta de productos sin consecuencias para el consumidor.

La Legislación Europea, controla los residuos de medicamentos en productos de



origen animal mediante el Reglamento (EU) N°37/2010 que establece que los límites máximos de residuos (LMR) en veterinaria son “aquella concentración permitida de un principio activo en alimentos de origen animal (músculo, hígado, riñón, leche, huevo, grasa, etc.) que al ser ingerida por el ser humano no constituye ningún riesgo para su salud”, es decir, son el contenido máximo de residuos permitidos por un organismo regulatorio, posterior a la aplicación de un medicamento permitido para uso en animales y se expresan generalmente como $\mu\text{g}/\text{kg}$ o ppb. La suma de enrofloxacino y ciprofloxacino en leche de vaca no debe superar los $100 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Por otra parte, en México, la Secretaría de Salud establece en el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios que la leche destinada para consumo directo y la que se emplee como materia prima en procesos para la obtención de productos o derivados de la misma, debe provenir de animales limpios y sanos y, estar exenta de sustancias antisépticas. Asimismo, la Norma Oficial Mexicana *NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias* y la Norma Mexicana *NMX-F-700-COFOCALEC-2004, Sistema Producto Leche – Alimento – Lácteo – Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba*, establecen que la leche que se emplee como materia prima debe presentar prueba de inhibidores bacterianos negativa.

Actualmente, la literatura científica no describe metodologías analíticas que utilicen detectores UV para cuantificar antibióticos de tipo quinolona en fluidos biológicos de animales. Con base en estas consideraciones el objetivo primordial de este trabajo consistió en desarrollar y validar un método por HPLC, con detección UV, para cuantificar el contenido de ciprofloxacino y enrofloxacino en plasma y leche de vaca.

Para el cumplimiento de este objetivo se desarrolló un protocolo de validación basado en los criterios establecidos por la guía *Bioanalytical Method Validation* (FDA, 2001) y la *NOM-177-SSA1-1998 “Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos*



a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas”. Estos criterios se utilizaron como referencia debido a que no existen normas o guías que establezcan parámetros de calidad en fluidos biológicos de animales.



2. ANTECEDENTES

2.1 Mastitis bovina

Actualmente, la mastitis bovina es considerada una enfermedad de alta prevalencia en el ganado lechero. A nivel mundial, es una de las infecciones más importantes que afecta a la industria de la leche debido a las pérdidas económicas que les genera a los productores. También origina un aumento en los costos por los tratamientos y los servicios veterinarios y por la pérdida de los animales. Se define como una enfermedad multifactorial ya que, a pesar del estrés y las lesiones físicas, las infecciones dependen de la salud de la vaca para contrarrestarlas, del tipo y patogenicidad de las bacterias y, principalmente, de las condiciones sanitarias durante el ordeño (Cano, 2006).

La mastitis bovina es una enfermedad de etiología compleja que se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria ocasionada por una infección microbiana. Durante el ordeño el canal del pezón se encuentra abierto y expuesto a una gran cantidad de agentes patógenos que penetran y se multiplican en la glándula mamaria. Cuando se produce la infección ocurren cambios en la permeabilidad capilar de las células secretoras de la glándula generando, cambios en la composición de la leche (Seegers *et al.* 2003; Zhao y Lacasse, 2007; Pedraza, 2002).

2.2 La mastitis bovina y su impacto en la calidad de la leche

La leche mastítica se caracteriza por presentar un incremento en el recuento de células somáticas y cambios en la concentración de tres de sus componentes importantes: la lactosa, la grasa y la caseína. Además, afecta a otros componentes menores tales como las enzimas y los minerales. Aunado a esto, también se altera la permeabilidad de la membrana incrementando la filtración de los componentes sanguíneos de la sangre (proteínas del suero, cloruro y sodio) a la leche (Schällibaum, 2001).



Si bien, la síntesis de la caseína, en la glándula mamaria, disminuye cuando la vaca tiene mastitis la concentración de las proteínas totales, en la leche, sólo se ve afectada ligeramente. Así, la disminución en la concentración de la caseína, proteína de alto valor nutritivo, es equilibrada con el incremento de las proteínas sanguíneas como la albúmina, las inmunoglobulinas y la transferrina que se filtran debido a los cambios en la permeabilidad de la membrana. Sin embargo, la cantidad de proteínas totales de la leche no desciende hasta que el recuento de células somáticas supera las 200 000 células/mL de leche (Schällibaum, 2001).

Por otra parte, el contenido y la composición de la grasa en esta leche, es variable disminuyendo así la calidad de los productos lácteos. Aunque, la cantidad total de ácidos grasos no cambia si se incrementa la cantidad de ácidos grasos libres y disminuye la cantidad de fosfolípidos debido a una reducción en el tamaño del glóbulo de grasa. La composición de la membrana del glóbulo de grasa también cambia en un 10% con respecto a la de leches no mastíticas. Esto es, la proporción de ácidos grasos de cadena corta (C4-C12) aumenta ligeramente, en tanto que la de ácidos grasos de cadena larga (C16-C18) disminuye. Además, se incrementa la cantidad de ácidos grasos insaturados de cadena larga. Todos estos cambios incrementan la posibilidad de lipólisis; situación que es más grave por la presencia de una mayor cantidad de lipasas en la leche (Schällibaum, 2001).

Finalmente, la cantidad de la lactosa en la leche mastítica se reduce en un 10%. Para mantener el balance osmótico de la leche ocurren incrementos y cambios en el perfil mineral reduciéndose su valor nutricional. La concentración del cloruro y el sodio se incrementan como resultado de los cambios ocurridos en la permeabilidad de la membrana para mantener la osmolaridad. El potasio es entonces reabsorbido a la sangre disminuyendo su concentración en la leche. También, se ve disminuida la concentración de calcio debido a los cambios que se presentan en el mecanismo de transporte. La cantidad de calcio disponible afecta el tamaño de los agregados de caseína (Harmon, 1994).



2.3 Clasificación de la mastitis

Dependiendo del daño al epitelio glandular y del grado de inflamación de la ubre la mastitis se clasifica en subclínica (la de mayor concurrencia) y clínica.

2.3.1 Mastitis subclínica

Constituye el tipo de mastitis más importante y más común; es un padecimiento de larga duración, difícil de detectar y tratar con antibióticos. Las vacas afectadas reducen drásticamente su producción de leche y ocasionan grandes pérdidas económicas. También, pueden servir como reservorio para infectar a otros animales del hato lechero (Heringstad *et al.*, 2000).

La mastitis subclínica no presenta signos visibles, la vaca parece saludable, su ubre no muestra ningún tipo de inflamación y la leche parece normal. En este caso, el dolor y la inflamación no se detectan con solo observar la ubre. La detección se realiza contabilizando el número de células somáticas en la leche y mediante un cultivo bacteriológico. Si los niveles se encuentran elevados al igual, que el número de bacterias, se diagnostica una respuesta inflamatoria, que generalmente va acompañada por una disminución en la producción y la composición de la leche (Schukken *et al.*, 2001).

El conteo de células somáticas en la leche, nos permite conocer el estado funcional y la salud de la glándula mamaria. Las células somáticas participan en la defensa de la ubre, generalmente se encuentran en mayor concentración en los tejidos donde hay inflamación (Wolter *et al.*, 2004).

2.3.2 Mastitis clínica

La mastitis clínica se manifiesta de forma aguda y crónica. En la forma aguda se observa una ubre roja, con tejido fibroso, hinchada y con dolor. La vaca muestra sintomatología como fiebre, pulso acelerado, pérdida del apetito y reducción aguda en la producción de leche. Por otro lado, la forma crónica se manifiesta por cambios morfológicos como el aumento del tejido glandular (Roginski *et al.*, 2003).



2.4 Microorganismos patógenos asociados a mastitis bovina

A la fecha, un total de 137 especies de microorganismos han sido aislados a partir de la glándula mamaria bovina. A pesar de que existen numerosas especies de bacterias, hongos, levaduras, micoplasmas e incluso, hasta algunos virus, las bacterias de los géneros *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus sp.*, continúan siendo los responsables de más del 80% de las infecciones mamarias.

Los organismos causantes de la mastitis bovina se clasifican en patógenos contagiosos y ambientales. Los patógenos contagiosos viven y se multiplican en la glándula mamaria y la piel del pezón y se transmiten entre los animales. Ejemplos de estos agentes infecciosos son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* y *Mycoplasma spp.* Por otra parte, los patógenos ambientales se encuentran en las instalaciones, los corrales y las camas. Generalmente, están representados por microorganismos como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* y *Enterobacter aerogenes* (Ávila et al., 2004). En la Figura 1 y en la Tabla 1 se resumen las principales rutas de transmisión y las fuentes más comunes de los microorganismos que generan mastitis.

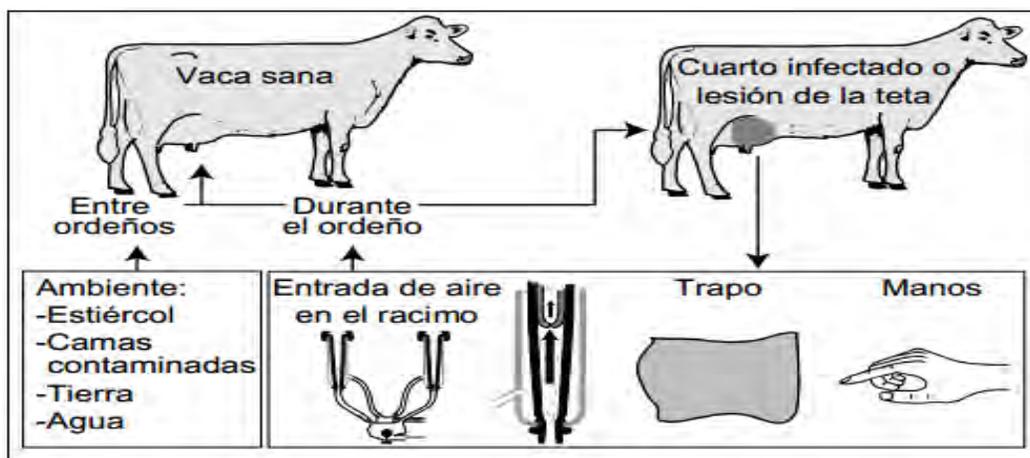


Figura 1. Principales rutas de transmisión bacteriana durante el ordeño.



Tipo de bacteria	Porcentaje de todas las infecciones	Causa primaria	Principales formas de difusión
<i>Streptococcus agalactiae</i>	>40%	Ubre infectada	Vaca a vaca, durante el ordeño
<i>Staphylococcus aureus</i>	30 - 40%	Ubre infectada, pezón lesionado	Vaca a vaca, durante el ordeño
<i>Streptococcus ambiental</i>	5 - 10%	Materia fecal	Medio ambiente de la vaca
Coliformes	<1%	Materia fecal	Medio ambiente de la vaca

Tabla 1. Fuentes más comunes y formas de diseminación de las principales bacterias que producen mastitis.

2.5 Uso de antibióticos en medicina veterinaria

El uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades, en el ganado destinado al consumo humano, ha dado como resultado que deba considerarse su potencial presencia en los alimentos de origen animal. Debe tenerse en cuenta que si los tiempos de eliminación de los antibióticos no se respetan, existe un riesgo significativo de encontrar residuos de los mismos en los alimentos. La leche debe ser un producto con calidad sanitaria máxima, esto significa, entre otras cosas, que no presente ningún tipo de fármaco. Desde el punto de vista de salud pública, los residuos de medicamentos en la leche son considerados de suma importancia por el daño potencial que podrían generar a la población consumidora (McEwen *et al.*, 1992).

Las empresas lecheras deberán ajustarse a la normatividad nacional y/o internacional que permita asegurar que, la leche, no contiene residuos de los agentes antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la mastitis.

En este sentido, la problemática de garantizar la ausencia de dichos residuos reside en que se desconoce la farmacocinética del principio activo y sus características fisicoquímicas en los vehículos utilizados para su administración (Cray *et al.*, 1999).

Se han descrito principalmente dos tipos de consecuencias debidas a la presencia de residuos de antibióticos en los productos de origen animal: la primera afecta directamente a los consumidores (riesgos toxicológicos, alergias, etc.), y la



segunda es la generación de resistencias bacterianas (Cray *et al.*, 1999).

Existen dos vías de contaminación en la leche; la contaminación secretora, a través del paso de sustancias del cuerpo del animal a la leche, y la contaminación post-secretora ocasionada durante toda la cadena de producción después de haber obtenido la leche. Todos los fármacos contenidos en medicamentos comercialmente disponibles deben presentar estudios que definan su farmacocinética incluyendo la tasa y la magnitud de su absorción, ya sea a partir de la glándula mamaria o posterior a su aplicación parenteral. Se deberá definir también su distribución, bio-transformación y formas de eliminación del organismo. Es claro que, en este último rubro un fármaco será excretado del organismo y una vía importante es la leche (Luquet, 1991).

2.6 Quinolonas

Químicamente, las quinolonas son estructuras bicíclicas heteroaromáticas, constituidas por un núcleo piridona unido a un ácido carboxílico en posición β y, un anillo aromático. La incorporación de uno, dos o tres átomos de flúor en su núcleo central permitió el surgimiento de las llamadas fluoroquinolonas. Estos fármacos forman un grupo de agentes antimicrobianos con estructuras y comportamientos químicos diferentes (Oliphant y Green, 2002). En la Figura 2 se ilustra su estructura general.

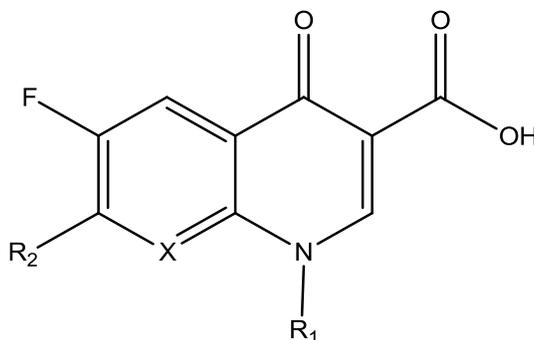


Figura 2. Estructura general de las quinolonas: X = C o N; R₁= ciclopropil (Enrofloxacino), etil (Norfloxacino), fluorofenilo (Difloxacino), anillo tiazínico u oxacínico (Levofloxacino); R₂= piperazinil (Ciprofloxacino), metilpiperazinil (Marbofloxacino).



2.6.1 Comportamiento ácido-base

Las constantes de disociación de las quinolonas definen su grado de ionización a cualquier valor de pH. Este parámetro es fundamental porque su absorción en el tracto gastrointestinal y su paso a través de las membranas biológicas depende de la fracción quinolona presente en un estado iónico en particular. Las quinolonas presentan un carácter zwitteriónico debido a la presencia de un ácido carboxílico y de grupos amino. Los valores de pKa para estos grupos funcionales están comprendidos entre 5.5-6.3 para los ácidos carboxílicos y 7.6-9.3 para el grupo amino. Por este motivo, las quinolonas tienden a ser más solubles en agua a pH ácido o básico y su solubilidad es escasa a pH neutro (fisiológico) (Ruiz, 2003).

2.6.2 Clasificación de las quinolonas

De manera general, las quinolonas se clasificaron por generaciones (Tabla 2) considerando su época de aparición y sobre todo su espectro antibacteriano (King *et al.*, 2000).

1ª Generación	2ª Generación	3ª Generación	4ª Generación
Ácido nalidíxico	Ciprofloxacino	Esparfloxacino	Clinafloxacino
Ácido oxolínico	Norfloxacino	Grepafloxacino	Gatifloxacino
Ácido piromídico	Perfloxacino	Temafloxacino	Moxifloxacino
Ácido pipemídico	Enoxacino	Levofloxacino	Trovafloxacino
Cinoxacino	Ofloxacino		Sitafloxacino
Flumequino			

Tabla 2. Clasificación química de las quinolonas

Las afecciones para las que las quinolonas son los antibióticos de mayor uso son las siguientes:

- Enfermedades del tracto urinario
- Enfermedades de transmisión sexual
- Infecciones respiratorias
- Infecciones gastrointestinales
- Infecciones cutáneas y de tejidos blandos
- Infecciones óseas



- Neutropenia en pacientes con cáncer
- Profilaxis

2.6.3 Mecanismo de acción

Las quinolonas inhiben la síntesis del DNA bacteriano mediante un bloqueo de la subunidad A de la DNA girasa (topoisomerasa II) y de la topoisomerasa IV; enzimas esenciales para la duplicación del DNA (Hooper, 2002; Wigley, 1995). Así, la acumulación intracelular de las quinolonas es fundamental para su actividad antibacteriana. Las quinolonas penetran en el citoplasma bacteriano mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de los canales acuosos transmembranales de las porinas o de la capa de los lipopolisacáridos (Piddock, 1995).

2.6.4 Resistencia a las quinolonas

Para ejercer su efecto citotóxico las quinolonas deben penetrar a través de la membrana bacteriana y alcanzar su diana celular (las topoisomerasas II y IV) para inducir la muerte de la célula. Por ello, los mecanismos de resistencia a las quinolonas incluyen:

- Mutaciones en los genes que codifican las enzimas diana originando la QRDR (Quinolone Resistance Determining Region).

Se producen cambios en los aminoácidos de la QRDR que alteran la estructura del sitio al que se unen las quinolonas en el complejo DNA girasa y disminuyen la afinidad de las quinolonas por dicho complejo (Ruiz, 2003; Ball, 2001).

- Alteraciones en la permeabilidad de la membrana

Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos o alteran los sistemas de transporte. Es decir, impiden que se acumulen cantidades suficientes del antibiótico al provocar su salida por difusión activa (Ruiz, 2003; Ball, 2001).

- Inactivación del antibiótico por enzimas.

La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico.



- Otro problema relevante es el posible papel de las fluoroquinolonas como inductores de resistencia hacia otros antimicrobianos. Las quinolonas tienen resistencia cruzada entre ellas y cierto grado de resistencia cruzada con otros antibióticos como tetraciclinas, cloranfenicol y cefoxitina (Schmitz *et al.*, 2002).

2.6.5 Interacciones y efectos adversos de las quinolonas

Desde el punto de vista clínico la interacción con los antiácidos, la teofilina y la warfarina son los más importantes. En la Tabla 3 se resume el efecto ocasionado en cada caso (Ball, 2001).

Droga concomitante	Efecto
Antiácidos	Disminución de la biodisponibilidad de la quinolona.
Teofilina	Incrementa la teofilina en suero.
Warfarina	Incrementa la concentración de warfarina en suero.

Tabla 3. Interacciones entre quinolonas y otros fármacos.

Las quinolonas son generalmente bien toleradas. Entre los efectos adversos atribuidos frecuentemente al tratamiento de fluoroquinolonas se encuentran: los relacionados con el sistema gastrointestinal (2-16%); las reacciones de hipersensibilidad/piel (0.2-3.0%) y los efectos cardiovasculares (2-16%). La mayor parte de estos efectos pueden considerarse leves o moderados en cuanto a su peligrosidad y rara vez requieren interrumpir el tratamiento (Oliphant, 2002).

2.6.6 Quinolonas de uso veterinario

El uso de quinolonas no se restringe únicamente al campo de la salud humana. En medicina veterinaria son ampliamente utilizadas no sólo con fines terapéuticos sino también con fines profilácticos debido a su seguridad, tolerancia y amplio espectro de acción. Se administran mayoritariamente al ganado de consumo humano como bovinos, porcinos, ovinos y aves. Actualmente, la Legislación Europea ha autorizado diferentes quinolonas para uso veterinario dependiendo de



la especie animal. Las más importantes son: marbofloxacino, ciprofloxacino (aunque solo como metabolito del enrofloxacino), orbifloxacino y difloxacino (Figura 3). Entre sus principales usos terapéuticos destacan: las infecciones respiratorias, las infecciones urinarias, la mastitis, la septicemias, la diarreas y el síndrome MMA (mastitis, metritis y agalaxia) (Brown, 1996).

En la actualidad el enrofloxacino es una de las quinolonas comercialmente disponibles para el tratamiento de la mastitis bovina. Cabe señalar que el enrofloxacino y el ciprofloxacino presentan un espectro de actividad similar. Estos agentes presentan buena actividad en contra de múltiples bacilos y cocos Gram-negativos, incluyendo la mayoría de especies y cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Salmonella sp.*, *Haemophilus sp.*, *Proteus sp.*, *Yersinia sp.*, *Serratia sp.*, y *Vibrio sp.*. Otros organismos Gram-positivos que generalmente son susceptibles son *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma sp.*, y *Mycobacterium sp.* (Brown, 1996).

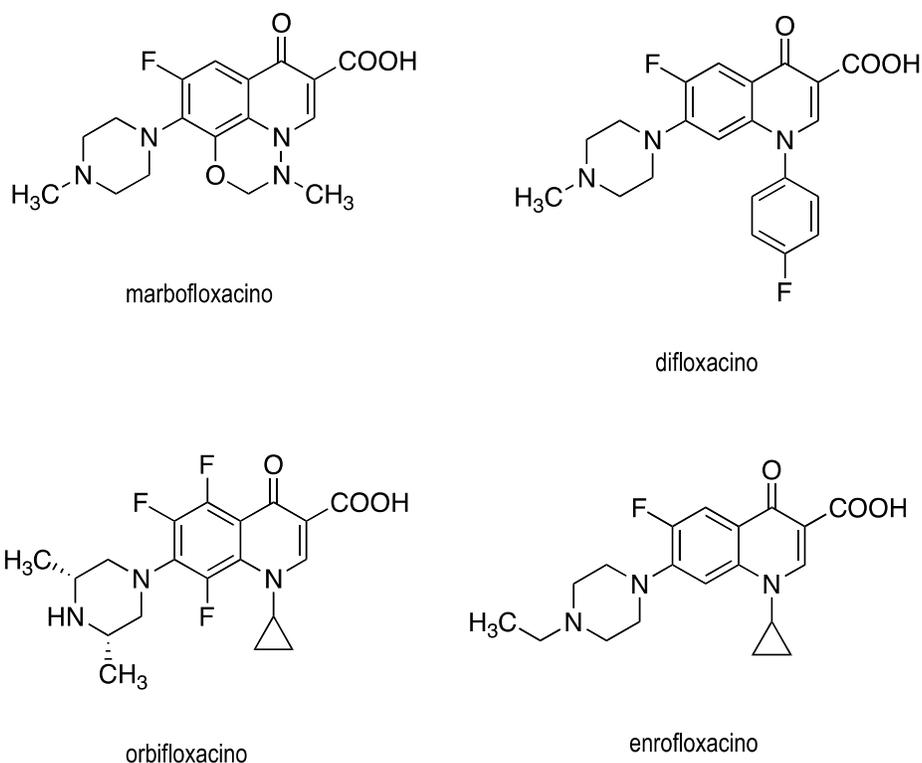


Figura 3. Estructuras química de las principales quinolonas de uso veterinario.



2.6.7 Enrofloxacin para el tratamiento de la mastitis bovina

El enrofloxacin está relacionado estructuralmente con el ciprofloxacino (presenta un grupo etil adicional en el anillo piperazinil) y contiene en su estructura química un átomo de flúor en la posición 6; es una fluoroquinolona de tercera generación desarrollada para uso exclusivo en medicina veterinaria. El enrofloxacin puede encontrarse en 4 formas dependiendo del pH en el que se encuentren: 1- catión ácido; 2- neutro no ionizado; 3- zwitterion intermedio y 4- ión básico. A pH bajo tanto el grupo piperazinilo como el carboxílico se encuentran protonados y a pH alto ninguno de ellos se encuentra protonado. En solución, las especies catiónicas y aniónicas se acercan a la concentración total de enrofloxacin en pH alto o bajo, respectivamente y las especies neutras logran su máximo a un pH isoelectrico.

Su máxima solubilidad se logra a un pH de 5.02 y el mayor porcentaje de transferencia de fase acuosa a fase orgánica se encuentra a un pH de 7.00. Cuando el pH del medio está cercano a la neutralidad se favorece el ingreso del enrofloxacin a las bacterias en forma de zwitterion a través de los canales de porinas hidrofílicas mientras que, al encontrarse en pH ácido predomina la forma ionizada y no puede entrar a la bacteria por difusión o por los canales de porinas (Brown, 1996).



2.6.7.1 Propiedades fisicoquímicas

En la Tabla 4 se resumen las propiedades fisicoquímicas del enrofloxacin y su metabolito activo ciprofloxacino así como los LMR establecidos por la Legislación Europea mediante el Reglamento (EU) N°37/2010.

Antibiótico	Enrofloxacin	Ciprofloxacino
Número CAS	93106-60-6	85721-33-1
Fórmula química	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	C ₁₇ H ₁₈ N ₃ FO ₃
Nombre químico	Ácido 1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolincarboxílico	Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolincarboxílico.
Solubilidad	25 g/L a pH 1 y pH 10	56 g/L a pH 1
Punto de ebullición	560 °C	581 °C
Punto de fusión	220 °C	265 °C
Log P	2.5	1.3
pKa	6.0 y 6.9	6.0 y 8.4
Peso molecular	359 g/mol	331 g/mol
Longitud de onda de máxima absorción	278 nm	
LMR	La suma de enrofloxacin y ciprofloxacino no debe superar los 100 µg/kg.	

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de enrofloxacin y ciprofloxacino.



2.6.7.2 Farmacocinética de enrofloxacinó

2.6.7.2.1 Absorción

En animales las fluoroquinolonas tienen muy buena biodisponibilidad por vía oral en la mayoría de las especies animales excepto en bovinos. El tiempo de aparición del pico de concentración plasmática (T_{max}) de enrofloxacinó administrado en forma oral a caballos, perros, pavos, pollos y terneros es de 0.5; 0.9; 1.4; 2.5 y 5.4 horas, respectivamente. También es fácil y rápidamente absorbido luego de la administración parenteral en terneros, cerdos, perros, gatos, pollos y pavos alcanzando concentraciones máximas dentro de las 0.5 a 2 horas (Sadiek, 1996).

La absorción oral de enrofloxacinó en bovinos es pobre (aproximadamente del 10 %) en contraste, es extensamente absorbido luego una administración subcutánea con una biodisponibilidad mayor al 90 %. En vacas lecheras alcanzan concentraciones plasmáticas máximas (similares tanto para la vía S.C. como I.M.) dentro de las primeras 4 horas (Sadiek, 1996).

2.6.7.2.2 Distribución

En la mayoría de las especies animales el volumen de distribución de las fluoroquinolonas es alto. Se alcanzan altas concentraciones en saliva y secreción nasal, en mucosa, en epitelios y secreción bronquial, así como en el hígado y en el tracto urinario. Penetran bien en el tejido pulmonar, fluido de revestimiento y macrófagos alveolares en concentraciones mayores a las séricas. El enrofloxacinó llega con rapidez a la glándula mamaria.

Las fluoroquinolonas penetran y alcanzan concentraciones intracelulares muy elevadas tanto en las células fagocíticas como en las no fagocíticas y presentan una gran actividad intracelular frente a un amplio rango de microorganismos. El enrofloxacinó se absorbe rápido y se distribuye ampliamente en todo el organismo, con una excelente disponibilidad sistémica y una tasa de eliminación relativamente baja (Pascual *et al.*, 1998).



2.6.7.2.3 Metabolismo y excreción

Las fluoroquinolonas son eliminadas del organismo principalmente por metabolismo hepático y excreción renal. Por lo general son parcialmente metabolizadas en el hígado y, excretadas en la bilis y la orina a altas concentraciones de fármaco activo.

Las rutas metabólicas comunes de estos agentes son la dealquilación, la glucuronización, la oxidación, la sulfoxidación, la acetilación y la ruptura del anillo piperazínico. En animales, la excreción renal es variable aunque ocurre filtración glomerular para la fracción no ligada y, también secreción tubular activa. La filtración glomerular y la secreción tubular permiten alcanzar altas concentraciones urinarias.

El enrofloxacin se metaboliza parcialmente a ciprofloxacino, el cual es responsable de una considerable parte de la actividad antimicrobiana. El metabolismo se lleva a cabo en el hígado y, posiblemente en otros sitios como la ubre o los macrófagos. El efecto de primer paso hepático es bajo, aproximadamente del 7%. Las concentraciones plasmáticas del metabolito con respecto a la droga madre (ABC concentración- tiempo) son del 29 % en vacas (Malbe *et al.*, 1996).

En la Tabla 5 se sintetizan algunos valores de los parámetros farmacocinéticos del enrofloxacin en bovinos (Otero *et al.*, 2009).

Parámetro	I.V.	I.M.	Oral
$t_{1/2}$ (h)	3.53 ± 0.67	4.18 ± 2.23	3.21 ± 0.65
Vdss (L/kg)	1.19 ± 0.10	-	-
Vd beta (L/kg)	1.16 ± 0.20	2.27 ± 0.40	2.66 ± 0.50
Cl (mL/min/kg)	3.83 ± 0.25	9.20 ± 7.39	9.95 ± 3.84
ABC total (µg/min/mL)	1321.2 ± 97.2	972.6 ± 673.8	775.2 ± 298.8
C _{max} (µg/mL)	-	1.73 ± 0.3	1.49 ± 0.49
T _{max} (h)	-	1.2 ± 0.4	2
F (%)	-	90.74	69.81

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos del enrofloxacin administrado (5 mg/kg) por vía I.M., I.V. y oral en bovinos.



2.7 Validación del método analítico

La validación de un método de análisis es un proceso que genera, por medio de estudios de laboratorio, una serie de datos que demuestran científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas, es decir, para cumplir con su propósito, por tanto, el objetivo de la validación es demostrar que el método de análisis es conveniente para los fines previstos (EMA, 2008).

Un método de análisis debe ser validado cuando es necesario verificar que el desempeño de sus parámetros es adecuado para su uso particular en un problema analítico.

La Secretaría de Salud a través de la NOM-177 establece que los métodos analíticos utilizados para análisis químico de muestras biológicas deben estar validados. De acuerdo con este documento y, previo establecimiento de las condiciones analíticas los parámetros de desempeño recomendados para la validación de estos métodos son: rango, recuperación absoluta, especificidad, linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, estabilidad, límite de cuantificación, límite de detección y robustez.

2.7.1 Linealidad

Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener respuestas directamente proporcionales con la concentración del compuesto en la muestra.

2.7.2 Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes proporciones de una muestra homogénea del producto.



2.7.3 Repetibilidad

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones.

2.7.4 Reproducibilidad

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.

2.7.5 Selectividad

Es la capacidad de un método analítico para cuantificar específicamente un compuesto en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

2.7.6 Límite de detección

Es la concentración mínima de un compuesto en una muestra que puede ser detectada bajo las condiciones de análisis establecidas.

2.7.7 Límite de cuantificación

Es la concentración más baja de un compuesto en una muestra que puede ser cuantificado bajo las condiciones de análisis establecidas cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

2.7.8 Exactitud

Es la concordancia entre el valor experimental y el valor teórico o de referencia.

2.7.9 Recobro absoluto

Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra.



2.7.10 Estabilidad

Es la propiedad de un compuesto de mantener sus características desde el momento del muestreo hasta su análisis y bajo las condiciones de almacenamiento.

2.7.11 Robustez

Es la capacidad de un método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros, condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.

Tomando en cuenta estas consideraciones, en el presente trabajo, se evaluaron todos los parámetros de desempeño mencionados anteriormente. En todos los casos los criterios de aceptación fueron los reportados en la NOM-177-SSA1-1998 y la guía para Validación de Métodos Bioanalíticos de la FDA.



3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

El análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) SHIMADZU acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/LCsolution. La respuesta utilizada para evaluar los parámetros de validación fue el área bajo la curva (ABC).

El desarrollo del método analítico se llevó a cabo primeramente probando varias columnas cromatográficas de diferente longitud empacadas con C18, siendo la óptima para el análisis una columna Purospher® STAR (MERCK), con un tamaño de partícula de 5 μm (150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno). Posteriormente se revisó la literatura para encontrar las mejores condiciones de separación entre los antibióticos. Se realizó la elución probando la fase móvil descrita por McKellar y colaboradores, que consistió en una mezcla constituida por acetonitrilo (ACN): metanol (MEOH): agua (H_2O) en una proporción 170:30:800, así como ácido fosfórico (H_3PO_4) al 4% y trietilamina (TEA) al 4%. Las condiciones cromatográficas de operación consistieron en: un volumen de inyección de 50 μL , una velocidad de flujo de 0.6 mL/min y la temperatura empleada para el análisis fue de 25 °C (McKellar *et al.*, 1999) y la longitud de onda empleada para la detección de los antibióticos fue de 278 nm.

Las condiciones generales del método analítico desarrollado para la cuantificación de los antibióticos se resumen en la Tabla 6.



Condiciones cromatográficas de operación	
Longitud de Onda	278 nm
Fase móvil	ACN:MeOH:H ₂ O 170:30:800 0.4% TEA, 0.4% H ₃ PO ₄
Columna	Purospher® STAR (MERCK)
Flujo	0.6 mL/min
Tiempo de análisis	17 min
Temperatura	25°C

Tabla 6. Condiciones de operación cromatográficas para validar el método desarrollado.

3.2 Preparación de las soluciones stock

Para llevar a cabo la preparación de las muestras de trabajo, se realizaron soluciones stock de clorhidrato de ciprofloxacino y enrofloxacin disueltas en agua a concentraciones de 1000 µg/mL y 100 µg/mL, para ambos antibióticos.

A partir de estas soluciones stock se prepararon las curvas de calibración con cinco niveles de concentración en un rango del 25-400% de la C_{max} reportada en bovinos (4 µg/mL), siendo esta el 100% y las concentraciones establecidas fueron las siguientes: 16, 8, 4, 2 y 1 µg/mL.

3.3 Curva de calibración

Una vez establecido el rango de concentraciones de trabajo para preparar las soluciones de la curva de la calibración, se tomaron diferentes alícuotas a partir de ambas soluciones stock de ciprofloxacino y enrofloxacin (Tabla 7) y se llevaron a un aforo final de 10 mL con agua y con las matrices biológicas, para obtener concentraciones de 80, 40, 20, 10 y 5 µg/mL antes de ser sometidas al método de extracción.



Concentración ($\mu\text{g/mL}$) ¹	Ciprofloxacino 1000 $\mu\text{g/mL}$	Enrofloxacinó 1000 $\mu\text{g/mL}$	Ciprofloxacino 100 $\mu\text{g/mL}$	Enrofloxacinó 100 $\mu\text{g/mL}$
	Alícuotas (μL)			
80	800	800		
40	400	400		
20	200	200		
10			1000	1000
5			500	500

¹ El volumen final de esta solución fue de 10 mL.

Tabla 7. Alícuotas tomadas a partir de las soluciones stock de ciprofloxacino y enrofloxacinó.

3.4 Puntos control de calidad

Se prepararon tres concentraciones conocidas alta, media y baja para cada matriz biológica, estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango. En la Tabla 8 se resumen las alícuotas tomadas a partir de las soluciones stock de ciprofloxacino y enrofloxacinó. El aforo final se realizó con las matrices biológicas a 10 mL para obtener concentraciones de 50, 30 y 15 $\mu\text{g/mL}$ antes de ser sometidas al método de extracción.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$) ¹	Ciprofloxacino 1000 $\mu\text{g/mL}$	Enrofloxacinó 1000 $\mu\text{g/mL}$	Ciprofloxacino 100 $\mu\text{g/mL}$	Enrofloxacinó 100 $\mu\text{g/mL}$
	Alícuotas (μL)			
50	500	500		
30	300	300		
15			1500	1500

¹ El volumen final de esta solución fue de 10 mL. Todas las diluciones se prepararon con las matrices biológicas.

Tabla 8. Alícuotas tomadas a partir de las soluciones stock de ciprofloxacino y enrofloxacinó.

3.5 Método de extracción

A 400 μL de las muestras se adicionó 1 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) y se agitaron durante 30 segundos en un vórtex, enseguida las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante cinco minutos. Posteriormente, se eliminó la



fase acuosa y se evaporó la fase orgánica a sequedad por medio de un baño de agua caliente. Se reconstituyeron las muestras con dos mililitros de fase móvil. De nueva cuenta se agitaron por 30 segundos en un vórtex. Finalmente las muestras se colocaron en viales para ser analizadas cromatográficamente.

Aplicando el método de extracción, las concentraciones finales para la curva de calibración fueron 16, 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g/mL}$ y las concentraciones finales para los puntos control de calidad fueron 10, 6 y 3 $\mu\text{g/mL}$ para llevar a cabo la cuantificación de los antibióticos

3.6 Evaluación de los parámetros de desempeño del método analítico

3.6.1 Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema se evaluó mediante el análisis por sextuplicado de una solución estándar que contenía 4 $\mu\text{g/mL}$ de ciprofloxacino y enrofloxacino. El criterio de aceptación para este parámetro de calidad establece que el coeficiente de variación (CV) debe ser menor del 2.0% para considerar que el método es adecuado para la aplicación que se pretende.

3.6.2 Especificidad

Para evaluar la especificidad del método analítico y de las muestras, se empleó el método de extracción a la concentración más baja de la curva de calibración y se analizaron bajo las condiciones establecidas:

- Muestras en solución acuosa de ciprofloxacino y enrofloxacino para conocer sus tiempos de retención a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$.
- Muestras blanco de plasma y leche sin adición de los fármacos.
- Una muestra blanco de un plasma hemolizado.
- Muestras de plasma y leche adicionadas de los fármacos a evaluar a la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras también se analizaron después de someterlas a las condiciones experimentales descritas en la Tabla 9.



Condición	Muestras en solución y Matrices de trabajo	Reactivo	Tiempo
Basicidad	2 mL	2 mL NaOH 1 M	Reflujo por 30 min
Acidez	2 mL	2 mL HCl 1 M	Reflujo por 30 min
Oxidación	2 mL	2 mL de H ₂ O ₂	Reflujo por 30 min

Tabla 9. Condiciones experimentales para evaluar la especificidad del método

El criterio de aceptación para este parámetro de calidad establece que no deben presentarse interferencias con el tiempo de retención de los analitos de interés.

3.6.3 Linealidad

3.6.3.1 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se evaluó mediante la elaboración de tres curvas de calibración para ciprofloxacino y enrofloxacin con cinco niveles de concentración y preparadas por pesadas independientes. Los resultados obtenidos se analizaron mediante regresión lineal simple con las variables de concentración (x) y área bajo la curva (y). Los parámetros calculados fueron: coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), la ordenada al origen (β_0), la pendiente de la recta (β_1), y los intervalos de confianza para la pendiente IC (β_1) y la ordenada al origen IC (β_0). El criterio de aceptación específica que el sistema es lineal sí: $r \geq 0.99$; $r^2 > 0.98$; IC (β_0) = {0} y IC (β_1) $\neq 0$ (para la ordenada del origen incluye el cero y para la pendiente no incluye dicho valor).

3.6.3.2 Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó mediante la elaboración por triplicado de una curva de calibración en las matrices biológicas (una para el plasma y otra para la leche) con cinco niveles de concentración. Los resultados obtenidos (cantidad adicionada vs cantidad recuperada) se analizaron mediante un análisis de regresión lineal simple y los parámetros calculados fueron: coeficiente de



correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), la ordenada al origen (β_0), la pendiente de la recta (β_1) y los intervalos de confianza para la pendiente IC (β_1) y la ordenada al origen IC (β_0). El criterio de aceptación especifica que el método es lineal sí: $r \geq 0.99$; $r^2 > 0.98$; IC (β_0) = {0} y IC (β_1) $\neq 0$ (para la ordenada del origen incluye el cero y para la pendiente no incluye dicho valor).

3.6.4 Limite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC)

Para evaluar el límite de detección se determinó que a la concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$, la señal de los analitos por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido.

Para la evaluación del límite de cuantificación se llevó a cabo analizando por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo (1 $\mu\text{g/mL}$) en plasma sanguíneo y leche de vaca. El criterio de aceptación establece que su valor promedio se encuentra dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal y el CV entre las cinco determinaciones no sea mayor al 20%.

3.6.5 Precisión

La precisión se evaluó por medio de la precisión del sistema y la precisión del método, esta última se realizó por medio dos parámetros principales: repetibilidad y reproducibilidad.

3.6.5.1 Precisión del sistema

Se preparó una muestra de una solución estándar de ciprofloxacino y enrofloxacino a una concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$ y se analizó por sextuplicado. Los resultados así obtenidos se expresaron en términos de CV. Para determinar el cumplimiento de dicho parámetro se determinó el promedio (\bar{y}), la desviación estándar (s) y el CV para cada concentración.

El criterio de aceptación para este parámetro de calidad establece que el CV deberá ser menor del 2.0 % para considerar que el método es preciso.



3.6.5.2 Repetibilidad (precisión intradía)

Éste parámetro de calidad se realizó preparando una curva de calibración y un mínimo de tres concentraciones conocidas alta, media y baja (10, 6 y 3 $\mu\text{g/mL}$) en las matrices de trabajo preparadas independientemente por duplicado durante tres corridas analíticas. Para cada nivel de concentración de las tres corridas se calculó la concentración recuperada de las tres corridas. Para determinar el cumplimiento de dicho parámetro se determinó el promedio (\bar{y}), desviación estándar (s) y el CV para cada concentración. El método es reproducible si el CV para cada nivel concentración no es mayor que el 15%.

3.6.5.3 Reproducibilidad entre analistas

Éste parámetro de calidad se realizó preparando una curva de calibración y un mínimo de tres concentraciones conocidas alta, media y baja (10, 6 y 3 $\mu\text{g/mL}$) en las matrices de trabajo preparadas independientemente por duplicado durante tres días y dos analistas. Para cada nivel de concentración de las tres corridas se calculó la concentración recuperada de las tres corridas. Para determinar el cumplimiento de dicho parámetro se determinó el promedio (\bar{y}), desviación estándar (s) y el CV para cada concentración. El método es reproducible si el CV para cada nivel concentración no es mayor que el 15%.

3.6.6 Exactitud

La exactitud se evalúa a partir de los estudios de precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y deben cumplir con los criterios establecidos en las guías de validación ICH-FDA y en la NOM-177, el método debe ser preciso y reproducible y el CV deberá ser menor del 15% y el porcentaje máximo de desviación con respecto a la concentración nominal de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad deben ser menores al 15%. De igual manera para evaluar el recobro absoluto, se analizaron por quintuplicado tres concentraciones conocidas: baja, media y alta (10, 6 y 3 $\mu\text{g/mL}$) en las matrices de trabajo. Los resultados obtenidos se expresaron en términos de porcentaje de cantidad recuperada (% de



recobro absoluto), de acuerdo a la NOM-177 la recuperación no necesariamente será del 100% pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango.

3.6.7 Estabilidad

La estabilidad se llevó a cabo determinando el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en el que los antimicrobianos permanecieron estables en la matriz de trabajo.

Para ello, se evaluó la respuesta de los compuestos en las matrices biológicas, preparadas en tres niveles de concentración (puntos control) y por duplicado. El protocolo desarrollado fue el siguiente:

3.6.7.1 Ciclos de congelación-descongelación

Se evaluó la estabilidad de los compuestos al congelar y descongelar a temperatura ambiente las muestras de concentración conocida en la matriz biológica. Para tal fin, se prepararon, por duplicado, tres series de muestras de los puntos control y se congelaron.

- A las 24 horas, se descongeló la primera serie a temperatura ambiente. Una vez descongeladas se congelaron por segunda vez.
- A las 48 horas se descongeló nuevamente la primera serie junto con la segunda. Una vez descongeladas, se congelaron nuevamente.
- A las 72 horas se descongelaron las 3 series.

Previo al proceso de congelación serial se analizaron todas las muestras y se interpretaron de la siguiente manera:

Si la primera serie cumple con el criterio de aceptación no se consideran la segunda y tercera serie. En el caso en que la primera serie no cumpla se considera la segunda serie. Si la segunda serie cumple con los criterios de aceptación, no se considera entonces, la tercera serie. Finalmente, si la segunda serie no cumple con los criterios de aceptación se considera la tercera serie.

La concentración recuperada se calculó interpolando los valores obtenidos en la curva de calibración. También se calculó el porcentaje de desviación estándar



absoluta (DEA) para cada nivel de concentración y se comparó con la respuesta obtenida de una serie de puntos control preparada el día del análisis. El criterio de aceptación establece que el % de DEA con respecto a las soluciones preparadas el día del análisis y/o las muestras, a t_0 , no debe ser mayor del 15% en cada nivel de concentración (Ver el Anexo A para el cálculo del % de DEA).

3.6.7.2 Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente

Para evaluar este parámetro se prepararon, por duplicado, una serie de puntos control y se mantuvieron a temperatura ambiente entre 4-24 horas. Transcurrido el tiempo de almacenamiento se analizaron en el sistema cromatográfico junto con una curva de calibración y una nueva serie de puntos control preparados el mismo día del análisis. En todos los casos se analizaron dos réplicas.

El criterio de aceptación indica que el porcentaje de DEA entre los puntos control preparados y almacenados a temperatura ambiente y las muestras preparadas el día del análisis para cada nivel de concentración no debe ser mayor del 15%.

3.6.7.3 Estabilidad de las muestras en refrigeración

Para evaluar este parámetro se siguió la metodología descrita en el inciso 3.6.7.2. La única diferencia fue que las muestras se almacenaron en refrigeración durante 4-24 horas.

3.6.7.4 Estabilidad de las muestras procesadas sin reconstituir en refrigeración o congelación

Este parámetro de calidad se evaluó mediante la preparación, por duplicado, de tres series de puntos control hasta el proceso de evaporación. La serie de puntos se almacenó en refrigeración o congelación por un periodo de 24 a 72 horas. El análisis de las muestras se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

- A las 24 horas, la primera serie se equilibra a temperatura ambiente y se reconstituye para su análisis.
- A las 48 horas la segunda serie se también se reconstituye y se analiza en el sistema cromatográfico.



- Finalmente, a las 72 horas la tercera serie se reconstituye y se analiza a temperatura ambiente.

Si la primera serie cumple con el criterio de aceptación no se consideran para análisis la segunda y la tercera serie. En caso de que la primera serie no cumpla, se considera la segunda serie. Si la segunda serie cumple con los criterios de aceptación, no se considera la tercera serie. En caso de que la segunda serie no cumpla con los criterios de aceptación, se considera la tercera serie.

El día de análisis de las muestras se preparó una curva de calibración y una serie de puntos control (por duplicado). El cálculo de la concentración recuperada se realizó interpolando los valores en la curva de calibración. Por último, se compararon los valores promedio de las concentraciones recuperadas entre las series preparadas el día de análisis y las almacenadas en refrigeración.

El criterio de aceptación establece que el % DEA con respecto a los preparados el día del análisis y/o las muestras a t_0 no debe ser mayor del 15% para cada nivel de concentración.

3.6.8 Robustez

La evaluación de este parámetro de desempeño se realizó preparando el punto control medio (6 $\mu\text{g/mL}$, inciso 3.4) para cada antibiótico. El análisis en el sistema cromatográfico se realizó por triplicado utilizando, en primer lugar, las condiciones de operación utilizadas para validar el método. Posteriormente, se modificaron en un $\pm 4\%$ dichas condiciones. Las variables evaluadas fueron: la velocidad de flujo, la proporción de disolventes en la fase móvil y el volumen de inyección (Tabla 10).

Condiciones cromatográficas	Condiciones de operación	Condiciones modificadas (+) 4 %	Condiciones modificadas (-) 4 %
Velocidad de flujo	0.6 mL/min	0.84 mL/min	0.36 mL/min
Volumen de inyección	50 μL	70 μL	30 μL
Proporción de la fase móvil	ACN:MEOH:H ₂ O 170:30:800 0.4% TEA, 0.4% H ₃ PO ₄	ACN:MEOH:H ₂ O 238:42:720 0.56% TEA, 0.56% H ₃ PO ₄	ACN:MEOH:H ₂ O 102:18:880 0.24% TEA, 0.24% H ₃ PO ₄

Tabla 10. Condiciones modificadas de operación para evaluar la robustez.

El criterio de aceptación establece que el tiempo de retención y la respuesta del analito, no deben desviarse más del 15% del valor nominal.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La leche es un producto universal que por su elevado valor nutritivo y alta digestibilidad es de gran importancia en la nutrición humana. Por tal motivo, su control sanitario debe realizarse en forma cuidadosa por las instancias competentes (Sumano y Ocampo, 1995).

De manera general, los antibióticos se emplean en las actividades ganaderas de tres formas básicas: en la terapéutica, para la profilaxis y como promotores del crecimiento. Como agentes terapéuticos, los antibióticos se han utilizado, desde hace muchos años, para el tratamiento de la mastitis en las vacas lecheras (Shahani y Whalen, 1986).

Debido a que los antimicrobianos de administración intramamaria son económicos y de fácil aplicación, su uso es muy popular en las explotaciones lecheras. El uso indiscriminado de los antibióticos en los animales se ha convertido en una preocupación para los investigadores debido a que actualmente, es necesaria su detección e identificación en los productos y subproductos de origen animal, destinados al consumo humano. Es por ello, que su empleo requiere de la vigilancia de un médico veterinario con la finalidad de lograr la sanidad animal y evitar riesgos para la salud de los consumidores así como, efectos indeseables en los procesos de fabricación de los productos lácteos fermentados (Gutiérrez, 1993).

Con base en estas consideraciones se desarrolló y validó un método analítico por HPLC, con detección UV, para cuantificar el contenido de ciprofloxacino y enrofloxacino en plasma sanguíneo y leche de vaca. Durante, el desarrollo del método analítico se registró, en primer lugar, un espectro en el UV con la finalidad de verificar la máxima longitud de onda de absorción del ciprofloxacino y del enrofloxacino (278 nm).

Los cromatogramas obtenidos durante el análisis nos permiten observar que los tiempos de retención del ciprofloxacino y del enrofloxacino en plasma sanguíneo son 7.9 y 10.3 y, en leche de vaca son 8.5 y 11.1, respectivamente (Figuras 4 y 5). Es importante mencionar que en los cromatogramas aparecen dos longitudes de



onda sin embargo, la máxima longitud de onda empleada para realizar la cuantificación de los antibióticos fue de 278 nm. 254 nanómetros es una longitud que no se suprimió en el sistema cromatográfico pero no es útil para ningún fin.

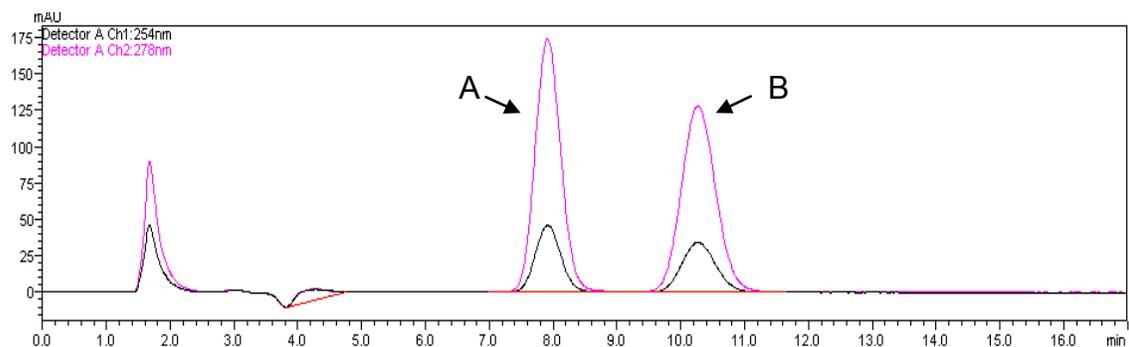
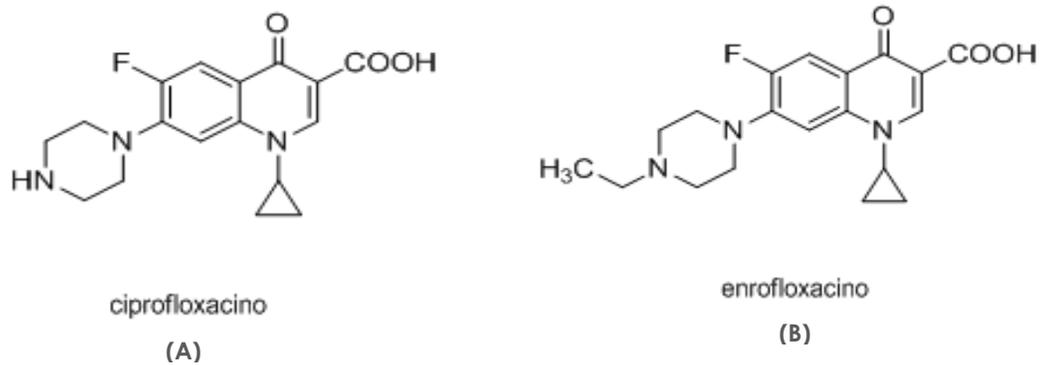


Figura 4. Cromatograma generado por el ciprofloxacino ($t_R=7.9$) y el enrofloxacino ($t_R=10.3$) en plasma sanguíneo de vaca.

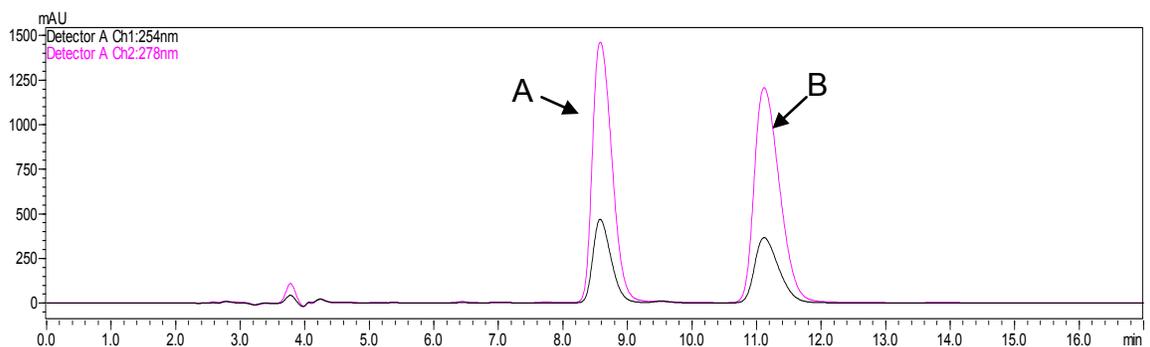


Figura 5. Cromatograma generado por el ciprofloxacino ($t_R=8.5$) y el enrofloxacino ($t_R=11.1$) en leche de vaca.

Para establecer las condiciones del método analítico primero se probaron varias columnas cromatográficas, de diferente longitud, empacadas con C-18, así como



diferentes sistemas de elución y flujo hasta encontrar las mejores condiciones de separación entre los antibióticos presentes en las matrices biológicas. La mezcla de disolventes empleada como fase móvil fue descrita previamente por Idowu y colaboradores para analizar fluoroquinolonas en plasma de bovino. El rango de concentraciones utilizado en la curva de calibración se estableció considerando la C_{max} (4 $\mu\text{g/mL}$) como punto intermedio y cinco niveles de concentración (Sumano *et al.*, 2001).

La literatura científica describe diferentes métodos cromatográficos para la determinación del enrofloxacin y del ciprofloxacino en fluidos biológicos de animales (Tabla 11). Sin embargo, dentro de estos métodos no existe uno que utilice detector UV para cuantificar antibióticos de tipo quinolona en fluidos biológicos de animales.

Método	Rango de determinación	Bibliografía
Extracción por par de disolventes	2-100 ng/mL	Idowu y Peggins, 2004
Extracción por fase sólida utilizando un cartucho C18	0.05- 10 $\mu\text{g/mL}$	Manceau <i>et al.</i> 1999
HPLC con detector de fluorescencia	2-100 ng/mL	Idowu y Peggins, 2004
HPLC por par iónico	20-200ng/mL	Tyczkowska <i>et al.</i> , 1994
HPLC de arreglo de diodos	0.05-1.0 $\mu\text{g/ mL}$	Cinquina <i>et al.</i> , 2003

Tabla 11. Métodos reportados en la literatura para cuantificar el contenido de enrofloxacin en matrices biológicas.

Por otro lado, una vez establecidos los parámetros cromatográficos de separación, se desarrollaron las condiciones óptimas de extracción de los antibióticos a partir de las matrices biológicas. En primer lugar, se realizó una extracción en fase sólida para extraer los antibióticos presentes en las matrices empleando cartuchos C18 marcas Sep-Pak[®] Vac (Waters) y SUPELCO. Los cartuchos se activaron con 2 mL de MeOH y 2 mL de agua (Manceau *et al.* 1999). Enseguida, se adicionaron las muestras y se lavaron con 0.5 mL de agua y 0.5 mL de ACN. Finalmente, la elución se llevó a cabo con 0.1mL de MeOH-ácido (2% de HCl) y 1.4 mL de agua. Después de analizar las muestras en el sistema cromatográfico se observó que la



recuperación de los analitos era mínima, por lo tanto, la extracción en fase sólida no era eficiente.

Posteriormente, se desarrolló un proceso de extracción por par de disolventes basado en la metodología descrita por Idowu y colaboradores. Para ello, se utilizó diclorometano (CH_2Cl_2) como disolvente de extracción y las grasas y proteínas se eliminaron por centrifugación. La fase orgánica se evaporó en baño de agua y el residuo se reconstituyó en 2 mL de fase móvil (Idowu y Peggins, 2004). Finalmente, el análisis cromatográfico de las muestras permitió calcular un 70% de recuperación de los antibióticos en las matrices de trabajo. Con base en estas consideraciones se seleccionó el método de extracción por par de disolventes para recuperar los antibióticos en las matrices biológicas seleccionadas.

Tomando en cuenta que el método analítico está clasificado en función de su propósito (método para cuantificar el analito) los parámetros de calidad que se evaluaron para validar la metodología fueron: adecuabilidad, especificidad, linealidad, precisión, exactitud, estabilidad y robustez. Los resultados del presente trabajo se dividen en dos partes. La primera abarca todo aquello concerniente a la estandarización del método empleando agua como disolvente. La segunda, comprende la validación del método utilizando las dos matrices biológicas.



4.1 Evaluación de los parámetros de desempeño

4.1.1 Validación del sistema

4.1.1.1 Adecuabilidad

La adecuabilidad del sistema es una parte integral de muchos procedimientos analíticos entre ellos, los cromatográficos. Este parámetro indica si un sistema es adecuado para la ejecución del análisis. Las pruebas de adecuabilidad del sistema están basadas en el concepto de que el equipo, los dispositivos electrónicos, la operación analítica y las muestras constituyen un sistema analítico único (FDA, 2001). Éste criterio de calidad se determinó mediante la inyección por sextuplicado de una solución de ciprofloxacino y enrofloxacino a una concentración de 4 µg/mL. Los resultados obtenidos permitieron estimar que la resolución de los picos es mayor a 2.0 y que los coeficientes de variación son menores del 2.0 % (Tabla 12 y Figura 6). Por lo tanto, el sistema en general, es adecuado para la ejecución del análisis y cumple con las características de desempeño para llevar a cabo la validación del método analítico.

Concentración de Ciprofloxacino	Área bajo la curva (ABC)	Concentración de Enrofloxacino	Área bajo la curva (ABC)
4 µg/mL-1	1778242	4 µg/mL-1	1689996
4 µg/mL-2	1745553	4 µg/mL-2	1690443
4 µg/mL-3	1800214	4 µg/mL-3	1714643
4 µg/mL-4	1767593	4 µg/mL-4	1722336
4 µg/mL-5	1803143	4 µg/mL-5	1699890
4 µg/mL-6	1789869	4 µg/mL-6	1720054
ȳ	1780769.0	ȳ	1706227.0
s	22223.0	s	146557.8
CV	1.2 %	CV	0.9 %

Tabla 12. Resultados obtenidos para evaluar la adecuabilidad del sistema.

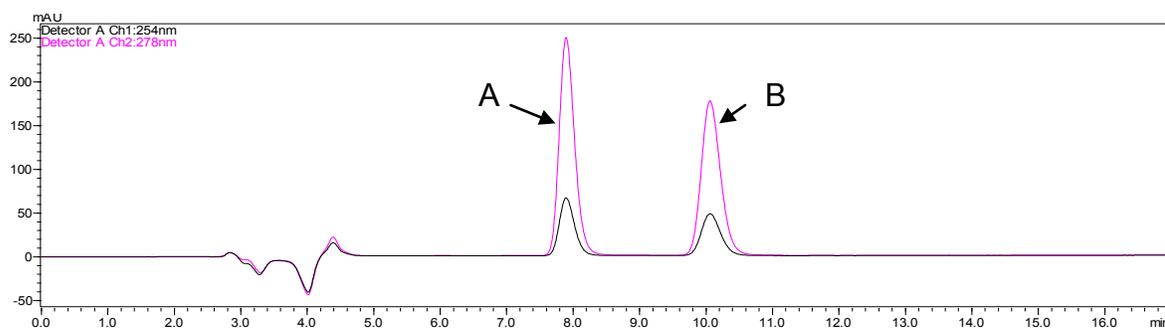


Figura 6. Cromatograma correspondiente a una solución de ciprofloxacino y enrofloxacino a una concentración de 4 µg/mL.

4.1.1.2 Especificidad

La especificidad/selectividad es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, que pueden estar presentes (especificidad) o que pudieran presentarse por efectos ambientales y/o de interacción con los mismos componentes (selectividad) tales como impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra. La falta de especificidad en un procedimiento analítico individual puede ser compensado por otro procedimiento analítico de apoyo (FDA, 2001). Para evaluar la especificidad del sistema se determinó la influencia de condiciones de degradación ácida, básica y oxidación sobre las muestras. El criterio de aceptación para este parámetro de calidad establece que no deben presentarse interferencias en el tiempo de retención de los analitos de interés.

Factor a evaluar	Ciprofloxacino [1 µg/mL]	Tiempo de retención (tr)	Área bajo la curva (ABC)
Estándar	1	7.95	271203
	2	8.04	273870
Acidez	1	7.96	137453
	2	7.92	137627
Basicidad	1	7.75	165735
	2	7.80	165512
Oxidación	1	7.95	126801
	2	7.99	125954

Tabla 13. Resultados obtenidos para una muestra en solución para ciprofloxacino.



Factor a evaluar	Enrofloxacin [1 µg/mL]	Tiempo de retención (t _R)	Área bajo la curva (ABC)
Estándar	1	10.14	139152
	2	10.11	141132
Acidez	1	10.13	66397
	2	10.17	67088
Basicidad	1	10.15	126785
	2	10.18	127593
Oxidación	1	10.18	64451
	2	10.20	64398

Tabla 14. Resultados obtenidos para una muestra en solución para enrofloxacin.

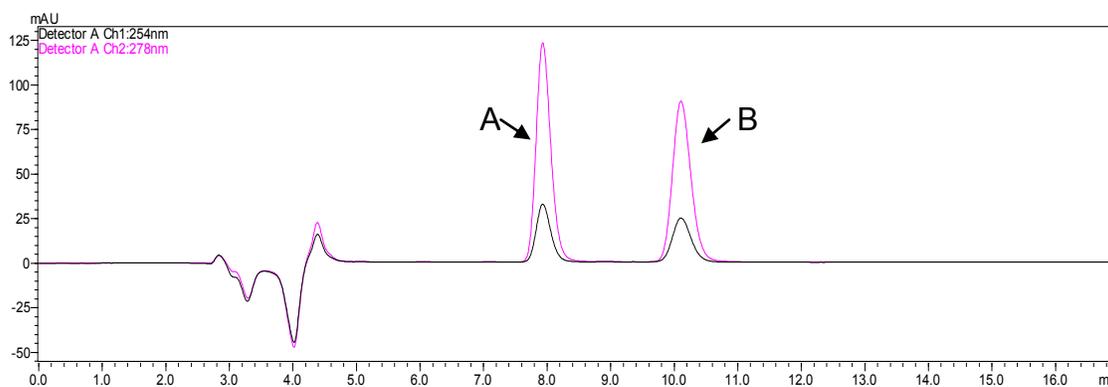


Figura 7. Cromatograma correspondiente a una solución de ciprofloxacino y enrofloxacin a la concentración de 1 µg/mL antes de ser sometido a degradación.

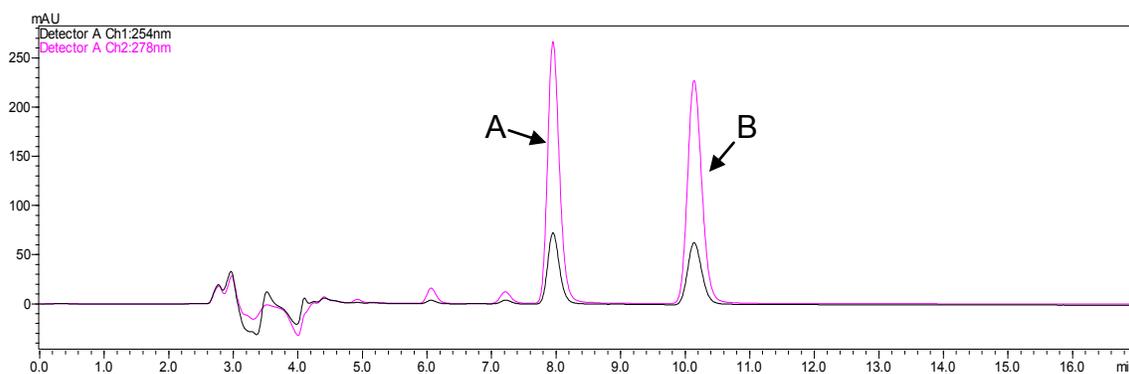


Figura 8. Cromatograma correspondiente a una solución de ciprofloxacino y enrofloxacin a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con HCl 1M.

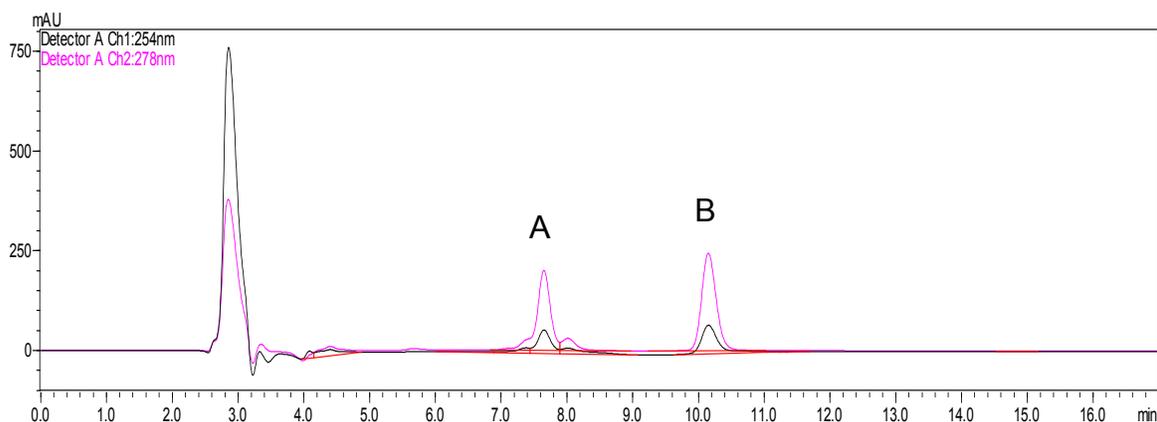


Figura 9. Cromatograma correspondiente a una solución de ciprofloxacino y enrofloxacino a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con NaOH 1M.

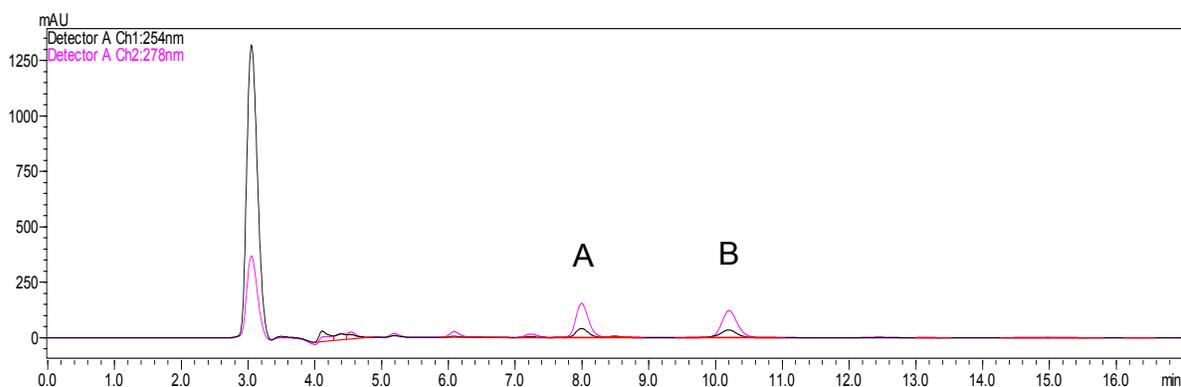


Figura 10. Cromatograma correspondiente a una solución de ciprofloxacino y enrofloxacino a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con H₂O₂ al 10%.

Para demostrar la selectividad analítica, en la Tabla 15 se presentan los porcentajes de degradación de cada uno de los antibióticos sometidos a diferentes condiciones de degradación.

	Ciprofloxacino		Enrofloxacino	
	% Degradación	CV (%)	% Degradación	CV (%)
Hidrólisis ácida	49.5	0.7	52.4	0.1
Hidrólisis básica	39.2	0.4	9.2	0.1
Oxidación	53.6	0.1	54.0	0.5

Tabla 15. Porcentajes de degradación para cada tratamiento, en solución.



Como se deduce de las Figuras 8, 9 y 10 el ciprofloxacino y enrofloxacino se degradan en condiciones ácidas, básicas y de oxidación. Las condiciones de estrés provocaron porcentos de degradación entre el 39-54% del ciprofloxacino y del 9-52% del enrofloxacino, respectivamente (Tabla 15). En los cromatogramas se observan claramente señales atribuibles a los productos de degradación generados que no fueron identificados pero, que no interfieren con los tiempos de retención de las fluoroquinolonas analizadas. Con base en todos los resultados generados se concluye que la respuesta obtenida en las condiciones cromatográficas empleadas, se debe exclusivamente a la presencia de ciprofloxacino y enrofloxacino. Por lo tanto, el método analítico propuesto es específico y selectivo.

4.1.1.3 Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico se define como su capacidad para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito en la muestra, en un intervalo de concentración pertinente con su aplicación (FDA, 2001).

La linealidad se evaluó estableciendo un rango de trabajo que comprendió cinco niveles de concentración (25-400% de la C_{max}). Considerando que el punto intermedio de la curva fue de 4 $\mu\text{g/mL}$ el rango de concentraciones establecidas comprende: 16, 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados de este parámetro se resumen en las Tablas 16 y 17 y en las Gráficas 1 y 2.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante una regresión lineal simple; los parámetros estadísticos calculados fueron: el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), la ordenada al origen (β_0), la pendiente de la recta (β_1), así como los intervalos de confianza para la pendiente IC (β_1) y la ordenada al origen IC (β_0). Los coeficientes de regresión calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar las siguientes ecuaciones de regresión:

$$\text{Área bajo la curva (ABC)} = 500030 * \text{Concentración de ciprofloxacino} - 107047$$

$$\text{Área bajo la curva (ABC)} = 493268 * \text{Concentración de enrofloxacino} - 225710$$

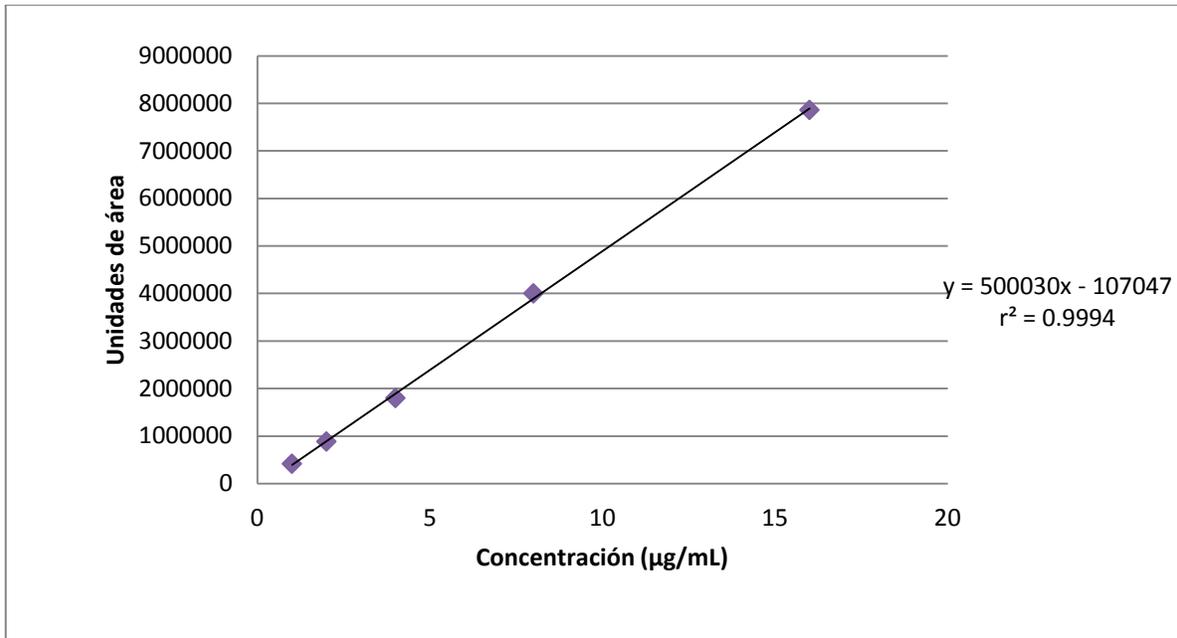


Concentración de Ciprofloxacino	t _R (min)	Área bajo la curva (ABC)	Concentración real de Ciprofloxacino (µg/mL)	ȳ Área bajo la curva (ABC)	s	CV (%)
16 µg/mL-1	7.88	7861891	15.94	7888926.7	23574.3	0.3
16 µg/mL-2	7.67	7905193	16.02			
16 µg/mL-3	7.78	7899696	16.01			
8 µg/mL-1	7.89	3949802	8.11	3973228.0	26378.2	0.7
8 µg/mL-2	7.89	3968082	8.15			
8 µg/mL-3	7.86	4001800	8.22			
4 µg/mL-1	7.99	1797984	3.81	1802308.7	5873.9	0.3
4 µg/mL-2	7.93	1808996	3.83			
4 µg/mL-3	7.88	1799946	3.81			
2 µg/mL-1	7.88	881099	1.98	888086.3	7191.5	0.8
2 µg/mL-2	7.99	897980	2.01			
2 µg/mL-3	7.69	885180	1.98			
1 µg/mL-1	7.74	416051	1.05	416574.3	10645.4	2.0
1 µg/mL-2	7.84	429866	1.07			
1 µg/mL-3	7.88	403806	1.02			

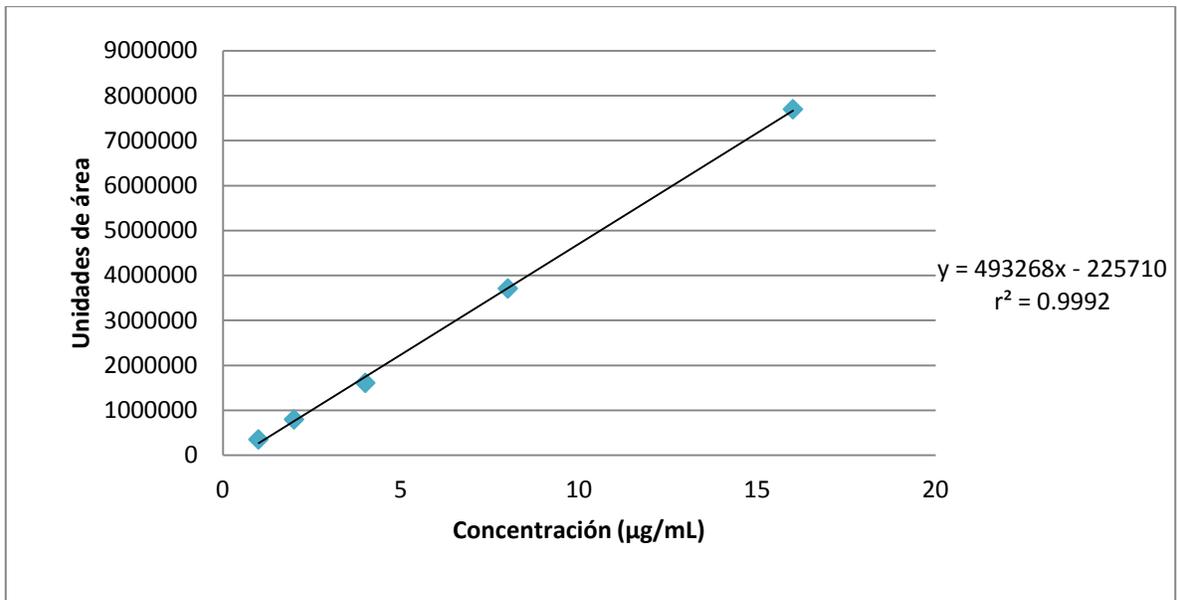
Tabla 16. Resultados de linealidad del sistema para ciprofloxacino.

Concentración de Enrofloxacinó	t _R (min)	Área bajo la curva (ABC)	Concentración real de Enrofloxacinó (µg/mL)	ȳ Área bajo la curva (ABC)	s	CV (%)
16 µg/mL-1	10.09	7612244	15.89	7672450.0	42811.2	0.6
16 µg/mL-2	10.19	7708087	16.08			
16 µg/mL-3	10.04	7697019	16.06			
8 µg/mL-1	9.98	3720946	8.00	3769815.0	36699.8	1.0
8 µg/mL-2	10.11	3809388	8.18			
8 µg/mL-3	10.12	3779111	8.12			
4 µg/mL-1	10.08	1688959	3.88	1687735.3	27962.5	1.7
4 µg/mL-2	9.94	1652893	3.81			
4 µg/mL-3	9.99	1721354	3.95			
2 µg/mL-1	10.04	811934	2.10	799270.7	9305.2	1.2
2 µg/mL-2	10.10	789839	2.06			
2 µg/mL-3	9.99	796039	2.07			
1 µg/mL-1	10.01	350782	1.17	341899.0	6915.9	2.0
1 µg/mL-2	10.05	333913	1.09			
1 µg/mL-3	10.16	341002	1.15			

Tabla 17. Resultados de linealidad del sistema para enrofloxacinó.



Gráfica 1. Linealidad del sistema para cuantificar ciprofloxacino.



Gráfica 2. Linealidad del sistema para cuantificar enrofloxacino.



Los parámetros determinados en la curva de regresión ajustada para el ciprofloxacino y enrofloxacinó se ilustran en las Tablas 18 y 19.

Estadístico de la regresión	Resultados	
	Ciprofloxacino	Enrofloxacinó
Ordenada al origen (β_0)	-107046.7917	-225710
Pendiente de la recta (β_1)	500029.9019	493267.5484
Coefficiente de correlación (r)	0.9997	0.9996
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9994	0.9992

Tabla 18. Regresión lineal del sistema para el ciprofloxacino y el enrofloxacinó.

	Ciprofloxacino			Enrofloxacinó		
	Coefficientes	Límite Inferior	Límite Superior	Coefficientes	Límite Inferior	Límite Superior
Ordenada al origen (β_0)	-107046.792	-291955.459	77861.8757	-225710	-434400.035	17019.9648
Pendiente de la recta (β_1)	500029.902	477639.335	522420.468	493267.548	467997.299	518537.798

Tabla 19. Intervalos de confianza para la ordenada al origen y la pendiente.

Para evaluar si el modelo estadístico calculado describe la relación lineal entre las variables, se realizó el análisis de varianza para cada una de las ecuaciones calculadas. Para ello, se plantearon las siguientes hipótesis:

- H_0 : el modelo estadístico no describe una relación lineal.
- H_1 : el modelo estadístico describe una regresión lineal.

En las Tablas 20 y 21 se resumen los resultados del análisis de varianza para cada modelo.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	1	3.72044E+13	3.72044E+13	5051.0766	6.13883E-06
Residual	13	2.2097E+10	7365647386		
Total	14	3.72265E+13			

Tabla 20. Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema para ciprofloxacino.



	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	1	3.6205E+13	3.6205E+13	3858.9416	9.19101E-06
Residual	13	2.8146E+10	9382094682		
Total	14	3.62331E+13			

Tabla 21. Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema para enrofloxacino.

Como se observa en la Tabla 18 los valores de los coeficientes de correlación y de determinación para el ciprofloxacino y el enrofloxacino indican que existe una fuerte relación lineal entre las variables (Gráficas 1 y 2). Por otra parte, el valor del coeficiente de determinación (r^2) permite inferir que el 99.9% de la variabilidad en la respuesta se encuentra explicada por dicho modelo. En la Tabla 19 se observa que con un nivel de confianza del 95% el intervalo de la ordenada del origen incluye el cero mientras que, para la pendiente no incluye dicho valor. Por lo tanto, el modelo cumple con las especificaciones establecidas para linealidad. Con base en estas evidencias se concluye que el sistema es lineal para la cuantificación de ciprofloxacino y enrofloxacino dentro del intervalo de trabajo establecido.

4.1.1.4 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre las mediciones obtenidas por múltiples muestreos con una muestra homogénea bajo las condiciones prescritas. La precisión se evalúa en tres niveles: precisión del sistema, repetibilidad y reproducibilidad, estas dos últimas corresponden a precisión del método (FDA, 2001).

La precisión del sistema se evaluó midiendo la concordancia entre los resultados analíticos individuales aplicando el procedimiento repetidamente a una muestra independiente de una solución acuosa de ciprofloxacino y enrofloxacino (4 $\mu\text{g/mL}$). Cada una de ellas se analizó por sextuplicado. Los resultados de estas determinaciones y su análisis estadístico se resumen en la Tabla 22. Con base en los resultados obtenidos (CV menor del 2.0%) se concluye que el sistema es preciso bajo las condiciones de ensayo.



Concentración	Ciprofloxacino	Enrofloxacino
	Área bajo la curva (ABC)	Área bajo la curva (ABC)
4µg/mL- 1	1778242	1689996
4µg/mL- 2	1745553	1690443
4µg/mL-3	1800214	1714643
4µg/mL- 4	1767593	1722336
4µg/mL- 5	1803143	1699890
4µg/mL- 6	1789869	1720054
Promedio (ȳ)	1780769.0	1706227.0
Desviación estándar (s)	22223.0	146557.8
CV	1.2 %	0.9 %

Tabla 22. Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema para ciprofloxacino y enrofloxacino.

4.2 Validación del método analítico

4.2.1 Especificidad analítica de la muestra

Para evaluar la especificidad del método con los fluidos biológicos se determinó la influencia de las condiciones de estrés sobre las muestras (inciso 4.1.1.2).

Como se observa en las Figuras 15, 16 y 17 el ciprofloxacino y el enrofloxacino se degradan en condiciones ácidas, básicas y de oxidación. Las condiciones de estrés provocaron porcentos de degradación entre el 33-53% del ciprofloxacino y del 10-47% del enrofloxacino, respectivamente (Tabla 25). Estos resultados se encuentran en armonía con los previamente descritos para los antibióticos cuando se degradaron en soluciones acuosas. También se registraron los cromatogramas de blancos de reactivos, soluciones de los antibióticos, plasma, mezclas de plasma de diferentes animales, plasma hemolizado, leche y mezclas de leche de diferentes animales. De nueva cuenta, en los cromatogramas se observan señales atribuibles a los productos de degradación generados que no fueron identificados pero no interfieren con los tiempos de retención de las fluoroquinolonas analizadas. Con base en todos los resultados presentados se concluye que la



respuesta obtenida en las condiciones cromatográficas empleadas, se debe exclusivamente a la presencia de ciprofloxacino y enrofloxacin.

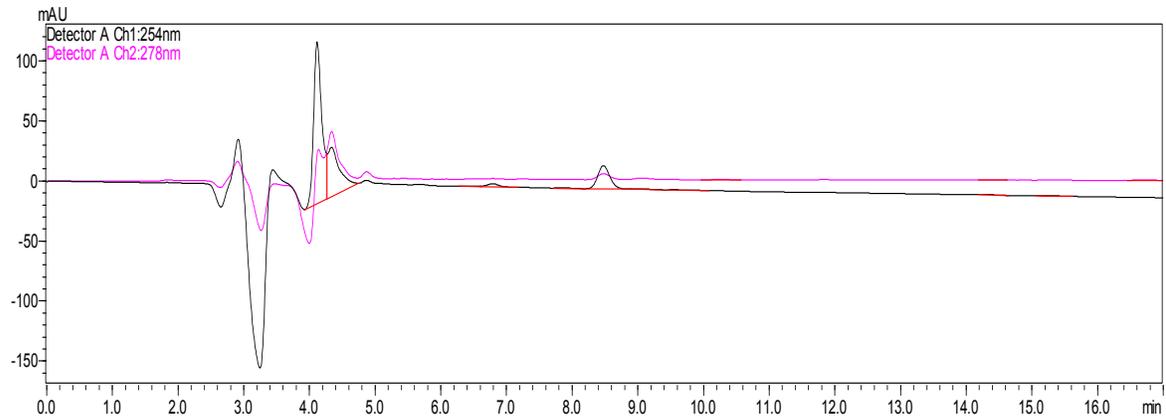


Figura 11. Cromatograma correspondiente a una muestra blanco de plasma sin adición de los antibióticos.

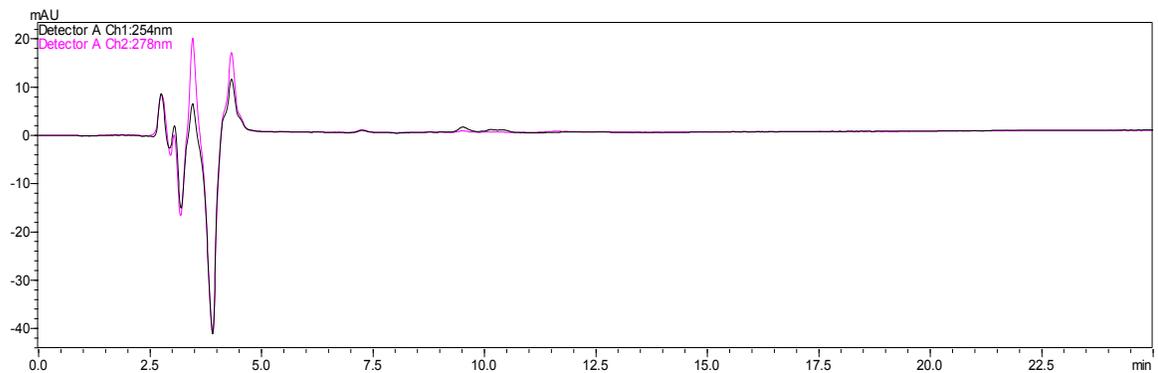


Figura 12. Cromatograma correspondiente a una muestra blanco de leche sin adición de los antibióticos.

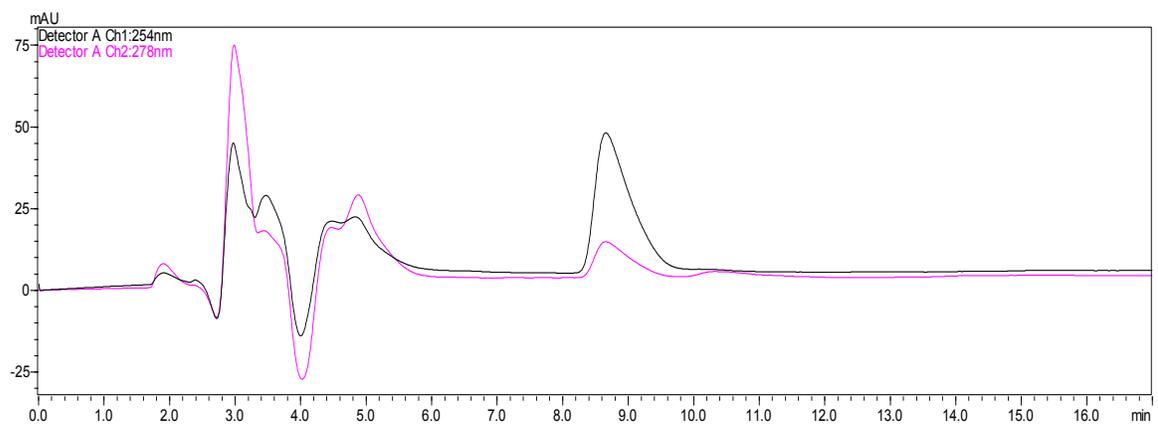


Figura 13. Cromatograma correspondiente a una muestra blanco de un plasma hemolizado.



Factor a evaluar	Ciprofloxacino [1 µg/mL]	Tiempo de retención (t _R)	Área bajo la curva (ABC)
Plasma en condiciones normales	1	7.99	275815
	2	8.12	273652
Acidez	1	8.14	128209
	2	7.94	128634
Basicidad	1	7.97	183156
	2	7.81	183452
Oxidación	1	7.91	173998
	2	8.19	173636

Tabla 23. Resultados obtenidos para una muestra de ciprofloxacino en un pool de plasma.

Factor a evaluar	Enrofloxacin [1 µg/mL]	Tiempo de retención (t _R)	Área bajo la curva (ABC)
Plasma en condiciones normales	1	10.19	137745
	2	10.33	137624
Acidez	1	10.77	57973
	2	10.61	57536
Basicidad	1	10.11	123192
	2	10.05	123539
Oxidación	1	9.99	72466
	2	10.01	73731

Tabla 24. Resultados obtenidos para una muestra de enrofloxacin en un pool de plasma.

	Ciprofloxacino		Enrofloxacin	
	% Degradación	CV (%)	% Degradación	CV (%)
Hidrólisis ácida	53.3	0.2	58.1	0.5
Hidrólisis básica	33.3	0.1	10.4	0.2
Oxidación	36.7	0.2	46.9	1.2

Tabla 25. Porcentajes de degradación para cada tratamiento, en plasma.

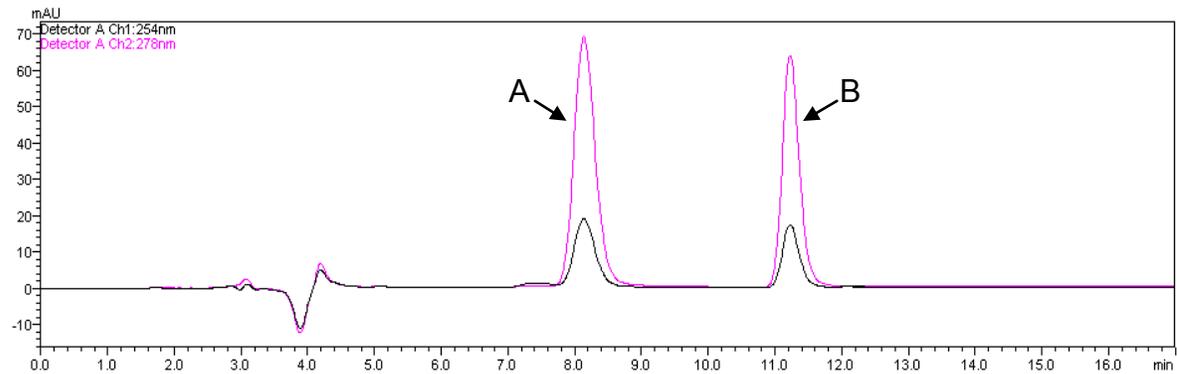


Figura 14. Cromatograma correspondiente a una muestra de pool de plasma adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacino a la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, antes de ser sometido a degradación.

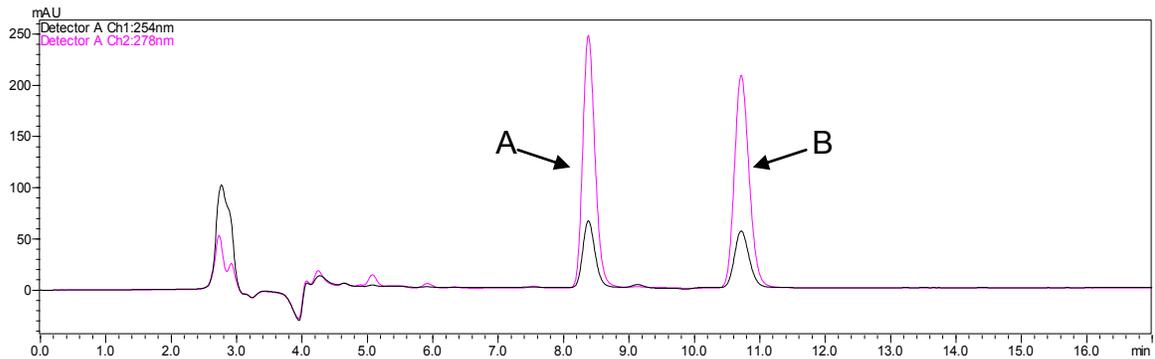


Figura 15. Cromatograma correspondiente a una muestra de pool de plasma adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacino a la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ después de someterse a un tratamiento con HCl 1M.

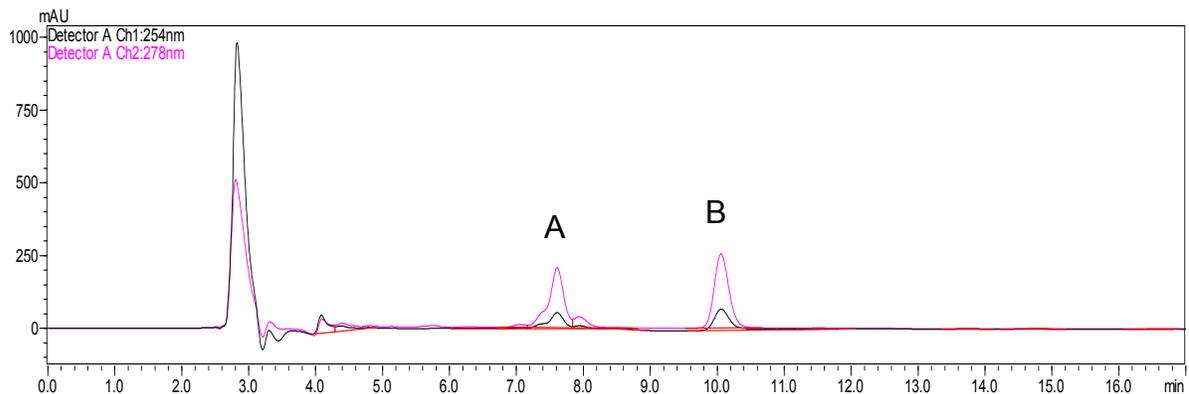


Figura 16. Cromatograma correspondiente a una muestra de pool de plasma adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacino a la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ después de someterse a un tratamiento con NaOH 1M.

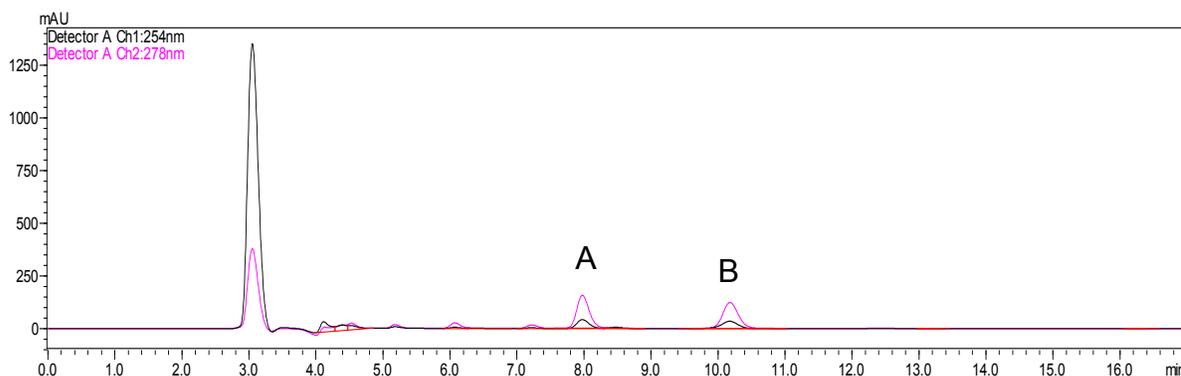


Figura 17. Cromatograma correspondiente a una muestra de pool de plasma adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacin a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con H₂O₂ al 10%.

Factor a evaluar	Ciprofloxacino [1 µg/mL]	Tiempo de retención (t _R)	Área bajo la curva (ABC)
Leche en condiciones normales	1	8.49	289694
	2	8.23	287533
Acidez	1	8.02	175339
	2	7.95	175648
Basicidad	1	7.92	154615
	2	7.88	155714
Oxidación	1	7.88	206153
	2	7.86	206206

Tabla 26. Resultados obtenidos para una muestra de ciprofloxacino en leche.

Factor a evaluar	Enrofloxacin [1 µg/mL]	Tiempo de retención (t _R)	Área bajo la curva (ABC)
Leche en condiciones normales	1	10.98	167533
	2	10.79	166492
Acidez	1	10.24	83507
	2	10.13	83864
Basicidad	1	10.15	128472
	2	10.11	128699
Oxidación	1	10.02	96354
	2	10.03	97014

Tabla 27. Resultados obtenidos para una muestra de enrofloxacin en leche.

	Ciprofloxacino		Enrofloxacin	
	% Degradación	CV (%)	% Degradación	CV (%)
Hidrólisis ácida	39.2	0.1	49.9	0.3
Hidrólisis básica	46.2	0.5	23.0	0.1
Oxidación	28.6	0.1	42.1	0.4

Tabla 28. Porcentajes de degradación para cada tratamiento en leche.

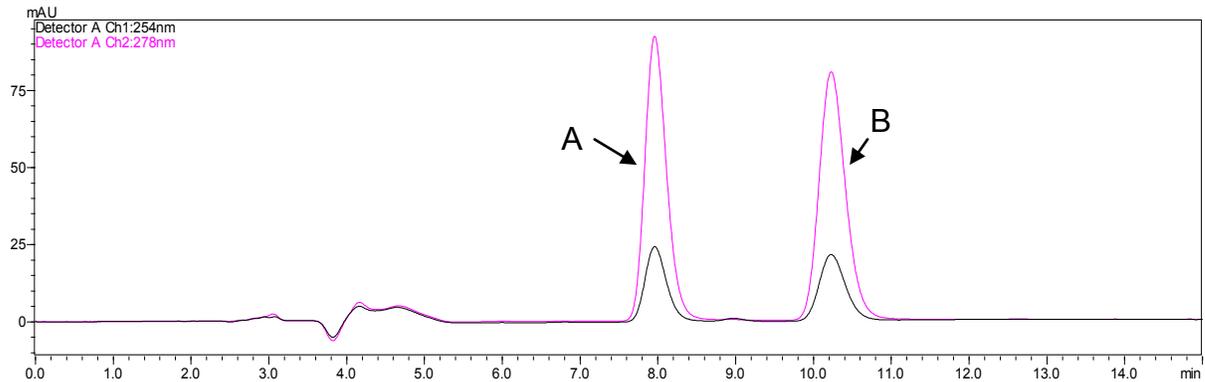


Figura 18. Cromatograma correspondiente a una muestra de leche adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacino a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antes de ser sometido a degradación.

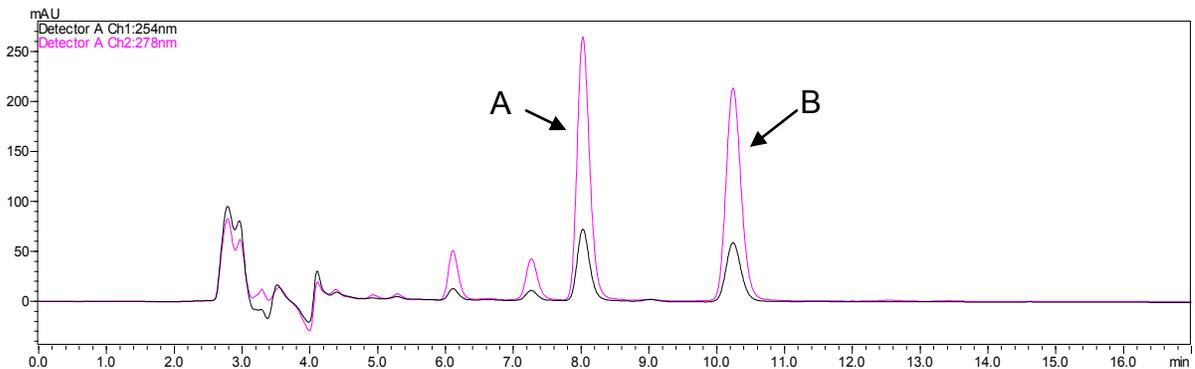


Figura 19. Cromatograma correspondiente a una muestra de leche adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacino a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ después de someterse a un tratamiento con HCl 1M.

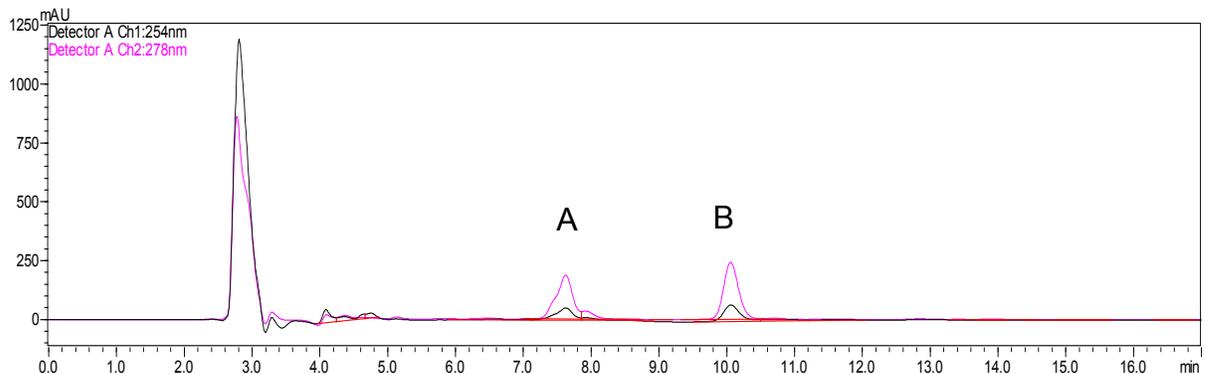


Figura 20. Cromatograma correspondiente a una muestra de leche adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacino a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ después de someterse a un tratamiento con NaOH 1M.

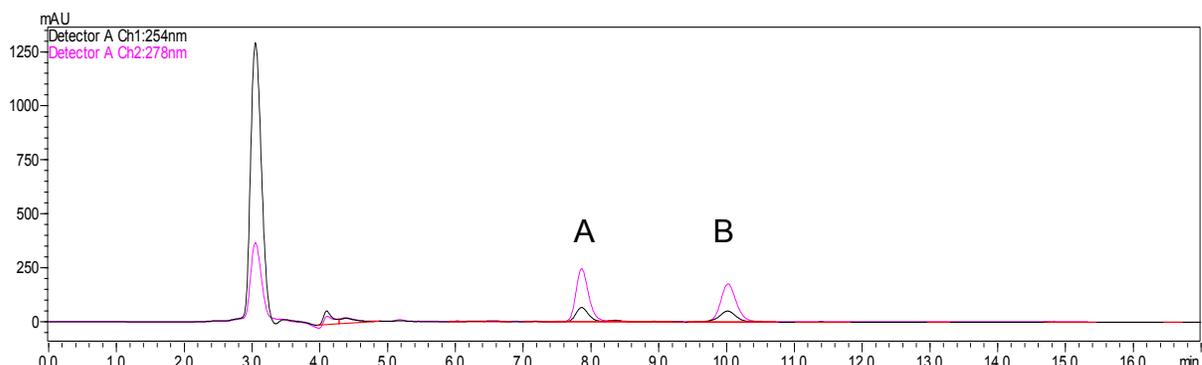


Figura 21. Cromatograma correspondiente a una muestra de leche adicionada de ciprofloxacino y enrofloxacinó a la concentración de 1 µg/mL después de someterse a un tratamiento con H₂O₂ al 10%.

4.2.2 Linealidad

Para evaluar la linealidad del método se construyeron tres curvas con cinco niveles de concentración para cada analito. Con los resultados obtenidos se construyeron gráficas que relacionan la respuesta y la concentración (Gráficas 3, 4, 5 y 6). En las Tablas 29, 30, 31 y 32 se resumen los datos generados para cada antibiótico en plasma y leche de vaca, respectivamente. Como se observa en las gráficas los resultados generados siguen una tendencia lineal. El análisis estadístico de los datos a través del modelo de regresión permitió estimar las siguientes ecuaciones de la recta.

*Concentración recuperada de Ciprofloxacino en plasma (µg/mL) = 0.6861*Concentración adicionada + 0.213*

*Concentración recuperada de Enrofloxacinó en plasma (µg/mL) = 0.7232*Concentración adicionada + 0.1233*

*Concentración recuperada de Ciprofloxacino en leche (µg/mL) = 0.7206*Concentración adicionada+0.1771*

*Concentración recuperada de Enrofloxacinó en leche (µg/mL) = 0.7013*Concentración adicionada +0.1571*

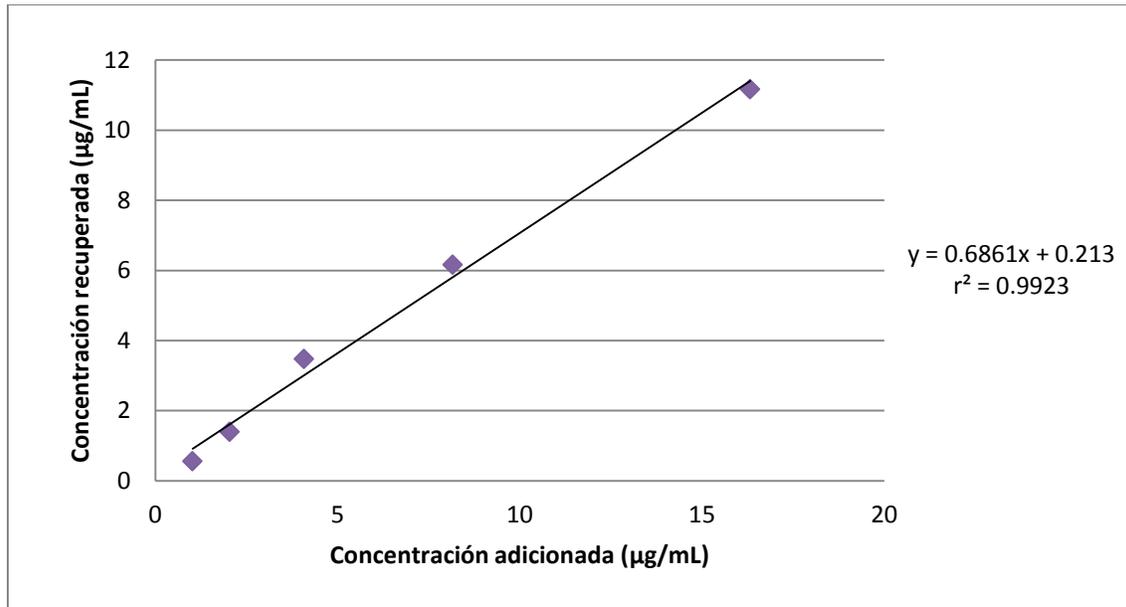


Concentración de Ciprofloxacino	t _R (min)	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada de Ciprofloxacino (µg/mL)	Concentración recuperada de Ciprofloxacino (µg/mL)
16 µg/mL-1	7.89	5410465	16.32	11.03
16 µg/mL-2	7.87	5277129	16.32	10.77
16 µg/mL-3	7.83	5719993	16.32	11.65
8 µg/mL-1	7.77	2990938	8.16	6.19
8 µg/mL-2	7.78	3130249	8.16	6.47
8 µg/mL-3	7.79	2899211	8.16	6.01
4 µg/mL-1	7.99	1613715	4.08	3.44
4 µg/mL-2	7.81	1530027	4.08	3.27
4 µg/mL-3	7.89	1719986	4.08	3.65
2 µg/mL-1	7.90	679501	2.04	1.57
2 µg/mL-2	7.87	712850	2.04	1.64
2 µg/mL-3	7.74	669012	2.04	1.55
1 µg/mL-1	7.89	270251	1.02	0.75
1 µg/mL-2	7.79	249902	1.02	0.71
1 µg/mL-3	7.75	229091	1.02	0.67

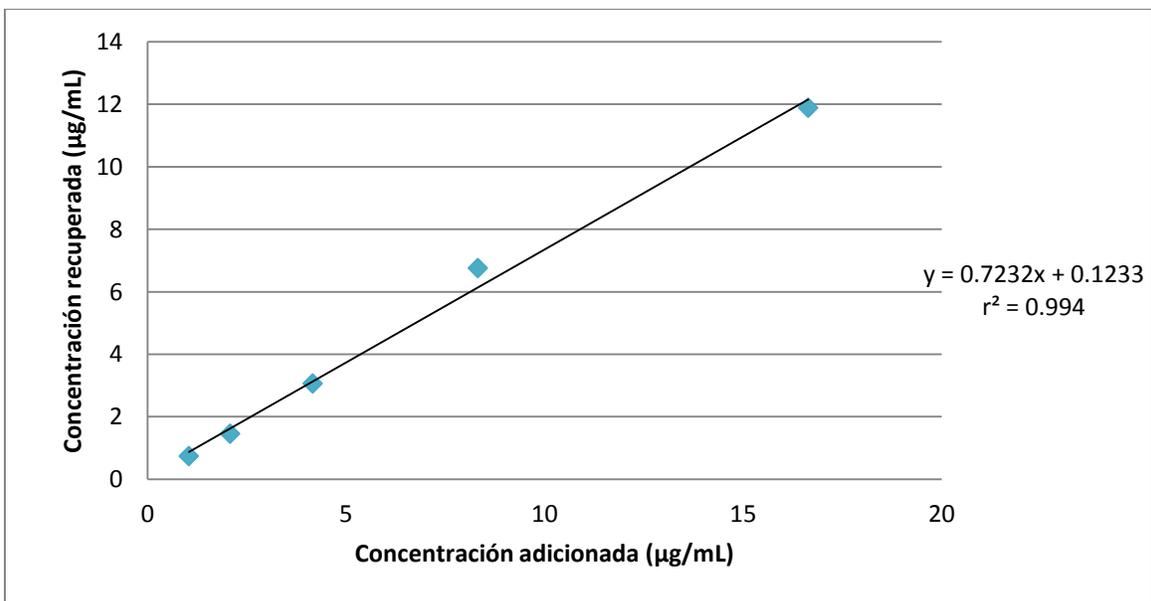
Tabla 29. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del método con ciprofloxacino en plasma.

Concentración de Enrofloxacin	t _R (min)	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada de Enrofloxacin (µg/mL)	Concentración recuperada de Enrofloxacin (µg/mL)
16 µg/mL-1	10.12	5310103	16.64	11.22
16 µg/mL-2	10.01	4927685	16.64	10.45
16 µg/mL-3	10.19	5139811	16.64	10.87
8 µg/mL-1	10.22	2649105	8.32	5.83
8 µg/mL-2	10.13	2913708	8.32	6.36
8 µg/mL-3	10.20	2863304	8.32	6.26
4 µg/mL-1	10.19	1193502	4.16	2.88
4 µg/mL-2	10.10	1288378	4.16	3.07
4 µg/mL-3	10.01	1079899	4.16	2.65
2 µg/mL-1	10.12	489633	2.08	1.45
2 µg/mL-2	10.11	465881	2.08	1.40
2 µg/mL-3	10.21	447992	2.08	1.36
1 µg/mL-1	10.10	139052	1.04	0.74
1 µg/mL-2	10.17	143108	1.04	0.75
1 µg/mL-3	10.09	131074	1.04	0.72

Tabla 30. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del método con enrofloxacin en plasma.



Gráfica 3. Linealidad del método para el ciprofloxacino en plasma



Gráfica 4. Linealidad del método para el enrofloxacino en plasma.

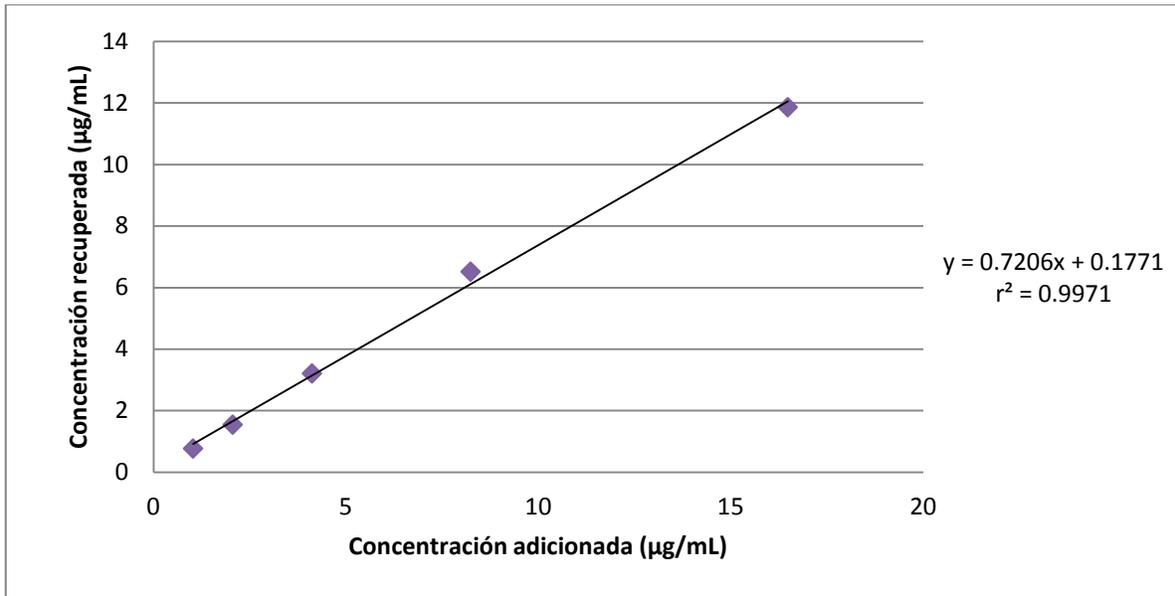


Concentración de Ciprofloxacino	t _R (min)	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada de Ciprofloxacino (µg/mL)	Concentración recuperada de Ciprofloxacino (µg/mL)
16 µg/mL-1	8.24	6062490	16.48	12.34
16 µg/mL-2	8.31	5806521	16.48	11.83
16 µg/mL-3	8.23	5601952	16.48	11.42
8 µg/mL-1	8.33	3320245	8.24	6.85
8 µg/mL-2	8.33	2950988	8.24	6.12
8 µg/mL-3	8.27	3181732	8.24	6.58
4 µg/mL-1	8.25	1494042	4.12	3.20
4 µg/mL-2	8.13	1496636	4.12	3.21
4 µg/mL-3	8.24	1507152	4.12	3.23
2 µg/mL-1	8.19	679640	2.06	1.58
2 µg/mL-2	8.36	669207	2.06	1.55
2 µg/mL-3	8.16	644235	2.06	1.50
1 µg/mL-1	8.29	283423	1.03	0.77
1 µg/mL-2	8.23	290313	1.03	0.80
1 µg/mL-3	8.10	256245	1.03	0.73

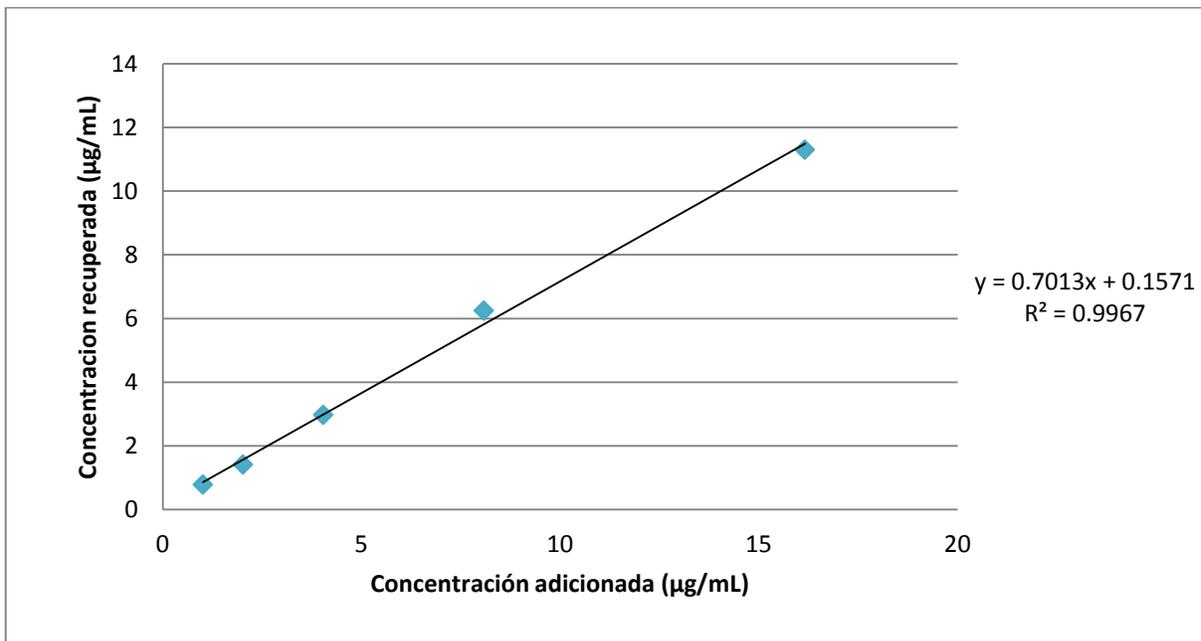
Tabla 31. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del método con ciprofloxacino en leche.

Concentración de Enrofloxacinó	t _R (min)	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada de Enrofloxacinó (µg/mL)	Concentración recuperada de Enrofloxacinó (µg/mL)
16 µg/mL-1	10.593	5500309	16.16	11.61
16 µg/mL-2	10.627	5244351	16.16	11.09
16 µg/mL-3	10.709	5303789	16.16	11.21
8 µg/mL-1	10.269	2847364	8.08	6.23
8 µg/mL-2	10.537	2925635	8.08	6.34
8 µg/mL-3	10.503	2800311	8.08	6.13
4 µg/mL-1	10.599	1283421	4.04	3.06
4 µg/mL-2	10.378	1267832	4.04	3.03
4 µg/mL-3	10.501	1179473	4.04	2.85
2 µg/mL-1	10.233	485133	2.02	1.44
2 µg/mL-2	10.604	458338	2.02	1.39
2 µg/mL-3	10.241	479918	2.02	1.43
1 µg/mL-1	10.601	150233	1.01	0.76
1 µg/mL-2	10.395	178432	1.01	0.82
1 µg/mL-3	10.525	163932	1.01	0.79

Tabla 32. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del método con enrofloxacinó en leche.



Gráfica 5. Linealidad del método para el ciprofloxacino en leche.



Gráfica 6. Linealidad del método para el enrofloxacin en leche.

Para evaluar la calidad del ajuste de cada modelo se calcularon los coeficientes de correlación y de determinación (Tablas 33 y 34). Como se observa en dichos



cuadros los coeficientes de determinación indican que por lo menos, el 99.0% de los datos se encuentran explicados por el modelo de regresión lineal calculado.

Estadístico de la regresión	Resultados	
	Ciprofloxacino	Enrofloxacinó
Ordenada al origen (β_0)	0.21295417	0.1233375
Pendiente de la recta (β_1)	0.68605722	0.72322309
Coficiente de correlación (r)	0.9961	0.9970
Coficiente de determinación (r^2)	0.9922	0.9940

Tabla 33. Regresión lineal del método para cuantificar ciprofloxacino y enrofloxacinó en plasma.

Estadístico de la regresión	Resultados	
	Ciprofloxacino	Enrofloxacinó
Ordenada al origen (β_0)	0.17711667	0.15706667
Pendiente de la recta (β_1)	0.72056739	0.7012669
Coficiente de correlación (r)	0.9985	0.9983
Coficiente de determinación (r^2)	0.9970	0.9966

Tabla 34. Regresión lineal del método para cuantificar ciprofloxacino y enrofloxacinó en leche.

Con la finalidad de evaluar si las ecuaciones describen adecuadamente la relación lineal entre las variables se realizó un análisis de varianza. Los resultados derivados de este estudio se resumen en las Tablas 35, 36, 37 y 38. Como se deduce de la información presentada el valor de F calculada para los cuatro modelos supera su valor crítico. Por lo tanto, se concluye que la variación en la respuesta se encuentra explicada por los modelos propuestos.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	1	72.8658353	72.8658353	384.974826	0.00028925
Residual	13	0.56782286	0.18927429		
Total	14	73.4336582			

Tabla 35. Análisis de varianza de la regresión lineal del método para cuantificar ciprofloxacino en plasma.



	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	1	84.1810191	84.1810191	500.002441	0.00019584
Residual	13	0.50508365	0.16836122		
Total	14	84.6861028			

Tabla 36. Análisis de varianza de la regresión lineal del método para cuantificar enrofloxacinó en plasma.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	1	81.9646492	81.9646492	1031.2937	6.6356E-05
Residual	13	0.23843251	0.0794775		
Total	14	82.2030817			

Tabla 37. Análisis de varianza de la regresión lineal del método para cuantificar ciprofloxacino en leche.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	1	74.6470004	74.6470004	904.699871	8.0721E-05
Residuos	13	0.24753071	0.08251024		
Total	14	74.8945311			

Tabla 38. Análisis de varianza de la regresión lineal del método para cuantificar enrofloxacinó en leche.

	Ciprofloxacino			Enrofloxacinó		
	Coefficientes	Límite Inferior	Límite Superior	Coefficientes	Límite Inferior	Límite Superior
Ordenada al origen (β_0)	0.21295417	-0.72438684	1.15029517	0.1233375	-0.76070437	1.00737937
Pendiente de la recta (β_1)	0.68605722	0.57478026	0.79733418	0.72322309	0.62029183	0.82615436

Tabla 39. Intervalos de confianza para la ordenada al origen y la pendiente de los modelos de linealidad del método utilizando plasma.



	Ciprofloxacino			Enrofloxacin		
	Coefficientes	Límite Inferior	Límite Superior	Coefficientes	Límite Inferior	Límite Superior
Ordenada al origen (β_0)	0.17711667	-0.43028211	0.78451545	0.15706667	-0.4618123	0.77594563
Pendiente de la recta (β_1)	0.72056739	0.64915978	0.791975	0.7012669	0.62706891	0.77546489

Tabla 40. Intervalos de confianza para la ordenada al origen y la pendiente de los modelos de linealidad del método utilizando leche.

Por otra parte, todos los intervalos de confianza, calculados al 95%, para la pendiente de los modelos no incluyen el cero mientras que, para la ordenada al origen incluyen dicho valor (Tabla 39 y 40). Con base en estas evidencias se concluye que el método analítico desarrollado para cuantificar a las fluoroquinolonas en plasma y leche de vaca es lineal en el intervalo de concentraciones establecido.

4.2.3 Límite de cuantificación (LC)

El límite inferior de la curva de calibración se determinó mediante el análisis por quintuplicado del punto más bajo de la curva de calibración (1 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados obtenidos para éste parámetro se resumen en las Tablas 41 y 42.

Concentración	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	s	CV (%)	DEA (%)
1 $\mu\text{g/mL}$	Ciprofloxacino						
	298263	1.17	0.86	0.86	0.0137	1.6	14.0
	309901		0.89				
	294334		0.83				
	302043		0.85				
	309011		0.86				
	Enrofloxacin						
	148952	1.23	0.85	0.85	0.0105	1.2	15.0
	144858		0.83				
	152073		0.87				
151295	0.87						
149898	0.85						

Tabla 41. Resultados para evaluar el límite de cuantificación en plasma.



Concentración	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	s	CV (%)	DEA (%)
1 $\mu\text{g/mL}$	Ciprofloxacino						
	289421	1.11	0.89	0.89	0.0095	1.1	11.0
	289312		0.89				
	299724		0.91				
	289832		0.89				
	288924		0.89				
	Enrofloxacin						
	153306	1.19	0.85	0.87	0.0081	1.0	13.0
	173274		0.89				
	169352		0.88				
	159865		0.86				
168575	0.87						

Tabla 42. Resultados para evaluar el límite de cuantificación en leche.

El límite de cuantificación fue de 1 $\mu\text{g/mL}$ en plasma y leche, para esta concentración el coeficiente de variación fue menor al 20% y la desviación con respecto al valor nominal fue menor al 15%. Como se deduce de la información resumida el CV cumple con los criterios de aceptación para el LC. Es decir, el CV es menor a 20% y el por ciento de la desviación estándar absoluta entre las cinco determinaciones no es mayor de 15%.

4.2.4 Precisión

Para determinar la precisión del método analítico se evaluó en dos niveles: repetibilidad y reproducibilidad.

4.2.4.1 Repetibilidad (precisión intradía)

Este parámetro se determinó mediante el análisis, duplicado, de los puntos control durante tres corridas analíticas. En las Tablas 43-46 se sintetizan los resultados obtenidos para cada nivel. De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que el método es repetible ya que, el CV para cada nivel concentración no es mayor del 15%.



Día	Concentración de Ciprofloxacino	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} Concentración recuperada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	s	CV (%)	DEA (%)
1	10 $\mu\text{g/mL}$	3596038 3708863	10.4	8.54 8.85	8.69	0.1551	1.8	13.1
	6 $\mu\text{g/mL}$	2091309 2119873	6.24	5.76 5.82	5.79	0.0303	0.5	3.5
	3 $\mu\text{g/mL}$	1000157 1019903	3.12	2.57 2.64	2.60	0.0356	1.3	13.3
2	10 $\mu\text{g/mL}$	3638889 3542837	10.0	8.60 8.50	8.55	0.0504	0.6	14.5
	6 $\mu\text{g/mL}$	2015250 1982213	6.0	5.64 5.50	5.57	0.0708	1.3	7.2
	3 $\mu\text{g/mL}$	968535 1007553	3.0	2.51 2.59	2.55	0.0406	1.6	15.0
3	10 $\mu\text{g/mL}$	3711703 3871862	10.5	8.67 8.86	8.76	0.0955	1.1	12.4
	6 $\mu\text{g/mL}$	2192766 2143239	6.3	5.91 5.84	5.87	0.0358	0.6	2.2
	3 $\mu\text{g/mL}$	1009408 1040297	3.15	2.64 2.71	2.67	0.0353	1.3	11.0

Tabla 43. Resultados para evaluar la repetibilidad (precisión intradía) del ciprofloxacino en plasma.

Día	Concentración de Enrofloxacin	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada de Enrofloxacin ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada de Enrofloxacin ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} Concentración recuperada de Enrofloxacin ($\mu\text{g/mL}$)	s	CV (%)	DEA (%)
1	10 $\mu\text{g/mL}$	3348219 3395983	10.2	8.56 8.61	8.58	0.0255	0.3	14.2
	6 $\mu\text{g/mL}$	1803494 1867428	6.12	5.22 5.30	5.26	0.0403	0.8	12.3
	3 $\mu\text{g/mL}$	849480 860087	3.06	2.54 2.63	2.58	0.0458	1.7	14.0
2	10 $\mu\text{g/mL}$	3198802 3300031	10.2	8.47 8.54	8.50	0.0354	0.4	15.0
	6 $\mu\text{g/mL}$	1858124 1795184	6.12	5.35 5.13	5.24	0.1104	2.1	12.6
	3 $\mu\text{g/mL}$	839431 833394	3.06	2.57 2.52	2.55	0.0257	1.0	15.0
3	10 $\mu\text{g/mL}$	3464845 3405563	10.4	8.75 8.66	8.70	0.0455	0.5	13.0
	6 $\mu\text{g/mL}$	1961347 2001309	6.24	5.33 5.42	5.40	0.0433	0.8	10.0
	3 $\mu\text{g/mL}$	857303 851150	3.12	2.69 2.60	2.60	0.0454	1.7	13.3

Tabla 44. Resultados para evaluar la repetibilidad (precisión intradía) del enrofloxacin en plasma.



Día	Concentración de Ciprofloxacino	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} Concentración recuperada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	s	CV (%)	DEA (%)
1	10 $\mu\text{g/mL}$	3801101 3716031	10.2	8.92 8.81	8.86	0.0551	0.6	11.4
	6 $\mu\text{g/mL}$	2103845 2198794	6.12	5.70 5.80	5.75	0.0503	0.8	4.2
	3 $\mu\text{g/mL}$	1067404 1033439	3.06	2.85 2.71	2.78	0.0705	2.5	7.3
2	10 $\mu\text{g/mL}$	3816330 3806149	10.3	8.94 8.87	8.90	0.0352	0.4	11.0
	6 $\mu\text{g/mL}$	2193373 2168712	6.18	5.79 5.72	5.76	0.0354	0.6	4.0
	3 $\mu\text{g/mL}$	1070485 1053893	3.09	2.87 2.75	2.81	0.0601	2.1	6.3
3	10 $\mu\text{g/mL}$	3696321 3828004	10.2	8.81 8.93	8.87	0.06032	0.7	11.3
	6 $\mu\text{g/mL}$	2101268 2151370	6.12	5.67 5.70	5.68	0.0152	0.3	5.8
	3 $\mu\text{g/mL}$	1063493 1051105	3.06	2.81 2.74	2.77	0.0356	1.3	8.0

Tabla 45. Resultados para evaluar la repetibilidad (precisión intradía) del ciprofloxacino en leche.

Día	Concentración de Enrofloxacinó	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada de Enrofloxacinó ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada de Enrofloxacinó ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} Concentración recuperada de Enrofloxacinó ($\mu\text{g/mL}$)	s	CV (%)	DEA (%)
1	10 $\mu\text{g/mL}$	3493984 3408244	10.3	8.63 8.51	8.57	0.0885	1.0	14.3
	6 $\mu\text{g/mL}$	2010322 2043834	6.18	5.24 5.32	5.28	0.0565	1.1	7.2
	3 $\mu\text{g/mL}$	871134 882023	3.09	2.61 2.73	2.67	0.0848	3.2	3.3
2	10 $\mu\text{g/mL}$	3404996 3311094	10.2	8.54 8.50	8.52	0.0282	0.3	14.8
	6 $\mu\text{g/mL}$	1851725 1909297	6.12	5.12 5.21	5.16	0.0636	1.2	8.3
	3 $\mu\text{g/mL}$	859391 851189	3.06	2.56 2.50	2.53	0.0424	1.7	4.7
3	10 $\mu\text{g/mL}$	3505332 3586036	10.5	8.69 8.72	8.70	0.0212	0.2	12.9
	6 $\mu\text{g/mL}$	2195851 2140982	6.3	5.33 5.27	5.30	0.0424	0.8	7.0
	3 $\mu\text{g/mL}$	900794 929931	3.15	2.76 2.78	2.77	0.0141	0.5	2.3

Tabla 46. Resultados para evaluar la repetibilidad (precisión intradía) del enrofloxacinó en leche.



Como se deduce de los resultados obtenidos los valores del CV en todos los casos fueron menores del 15%. Por lo tanto, el método desarrollado es repetible bajo las condiciones de ensayo.

4.2.4.2 Reproducibilidad entre analistas

Este parámetro se determinó mediante el análisis, por duplicado, de los puntos control durante tres corridas analíticas y dos analistas. En las Tablas 47-50 se sintetizan los resultados obtenidos para cada nivel. De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que el método es reproducible ya que, el CV para cada nivel concentración no es mayor del 15%.

Día	Ciprofloxacino					
	Concentración					
	10 µg/mL		6 µg/mL		3 µg/mL	
	Analista		Analista		Analista	
	1	2	1	2	1	2
1	3696038	3778269	2091309	2248130	1002157	1091142
	3758863	3814192	2119873	2262397	1019903	1062893
2	3648889	3654098	2092250	2160569	998535	1009726
	3702837	3597123	2128213	2189753	1007553	1019862
3	3711703	3618621	2112766	2209834	1009408	1069237
	3671862	3630234	2143239	2163462	1007297	1086239
\bar{y}	3690227.42		2160149.58		1031996	
s	66898.8		57266.4		34770.9	
% CV	1.8		2.6		3.4	

Tabla 47. Resultados obtenidos para evaluar la reproducibilidad entre analistas en plasma para ciprofloxacino.

Día	Enrofloxacin					
	Concentración					
	10 µg/mL		6 µg/mL		3 µg/mL	
	Analista		Analista		Analista	
	1	2	1	2	1	2
1	3338219	3276398	1903494	1799234	857180	867249
	3285983	3309512	1897428	1872525	861487	869023
2	3298802	3278634	1898124	1842421	867431	876327
	3300031	3299983	1915184	1852345	863394	889234
3	3364845	3472358	1961347	2091348	853303	846623
	3395563	3502935	2001309	2123853	841150	858732
\bar{y}	3343605.25		1929884.33		862594.417	
s	76379.8		98526.5		12905.3	
% CV	2.3		5.1		1.5	

Tabla 48. Resultados obtenidos para evaluar la reproducibilidad entre analistas en plasma para enrofloxacin.



Día	Ciprofloxacino					
	Concentración					
	10 µg/mL		6 µg/mL		3 µg/mL	
	Analista		Analista		Analista	
	1	2	1	2	1	2
1	3801104	3754372	2183845	2175642	1059744	1044768
	3716038	3757764	2187394	2163484	1053439	1049754
2	3816330	3800432	2193373	2175445	1070485	1056843
	3806149	3788845	2168712	2199932	1053893	1068483
3	3812004	3785356	2178268	2200111	1063493	1049932
	3800321	3754395	2191370	2169929	1053565	1037788
\bar{y}	3782759.17		2182292.08		1055182.25	
s	30476.9		12286.8		9434.4	
% CV	0.8		0.6		0.9	

Tabla 49. Resultados obtenidos para evaluar la reproducibilidad entre analistas en leche para ciprofloxacino.

Día	Enrofloxacin					
	Concentración					
	10 µg/mL		6 µg/mL		3 µg/mL	
	Analista		Analista		Analista	
	1	2	1	2	1	2
1	3493984	3395484	2010322	1929323	880334	889423
	3468244	3423923	2043834	1897453	880023	875493
2	3408996	3248594	2001725	1842374	865391	864923
	3401194	3294851	1999297	1837434	874989	859256
3	3505332	3478595	2085851	2003384	900794	893432
	3486036	3494833	2090982	2010024	889931	895323
\bar{y}	3425005.5		1979333.58		880776	
s	82191.3		84987.2		13295.2	
% CV	2.4		4.3		1.5	

Tabla 50. Resultados obtenidos para evaluar la reproducibilidad entre analistas en leche para enrofloxacin.

Como se deduce de los resultados obtenidos los valores del CV en todos los casos fueron menores del 15%. Por lo tanto, el método desarrollado es reproducible bajo las condiciones de ensayo.

4.2.5 Exactitud

La exactitud se define como la concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia (FDA, 2001). En fluidos biológicos la exactitud se evalúa a partir de los estudios de precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y



deben cumplir con los criterios establecidos en las guías de validación emitidas por la FDA y con la NOM-177.

De manera general, los resultados derivados del análisis para evaluar esta característica de calidad indican que para ambas quinolonas, el por ciento de desviación estándar absoluta, se encuentra por debajo del 15%. Con base en estas evidencias de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad se concluye que el método desarrollado es exacto.

Por otro lado, en las Tabla 51 y 54 se muestran los porcentajes de recuperación absoluta para cada quinolona en las matrices biológicas.

Concentración de Ciprofloxacino	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	% de Recobro	\bar{y} % de Recobro	CV (%)	DEA (%)
10 $\mu\text{g/mL}$	3628589	10.4	8.47	71.8348	73.0324	1.3	14.8
	3712018		8.54	73.4391			
	3696038		8.51	73.1318			
	3658829		8.50	72.4163			
	3758863		8.58	74.3399			
6 $\mu\text{g/mL}$	2153378	6.24	5.52	72.4451	71.8200	1.5	8.7
	2091309		5.40	70.4559			
	2129965		5.47	71.6948			
	2179873		5.57	73.2943			
	2114833		5.44	74.0942			
3 $\mu\text{g/mL}$	1021870	3.12	2.56	72.3621	72.0411	1.3	15.0
	1002157		2.52	71.0985			
	1029903		2.58	72.8770			
	1030150		2.60	72.8928			
	1000234		2.49	70.9752			

Tabla 51. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando ciprofloxacino y plasma.



Concentración de Enrofloxacinó	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada de Enrofloxacinó ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada de Enrofloxacinó ($\mu\text{g/mL}$)	% de Recobro	\bar{y} % de Recobro	CV (%)	DEA (%)
10 $\mu\text{g/mL}$	3338219	10.2	8.53	70.8346	71.3281	1.4	14.8
	3401103		8.58	72.0845			
	3397199		8.54	72.0069			
	3392724		8.51	71.9179			
	3285983		8.44	69.7964			
6 $\mu\text{g/mL}$	1903494	6.12	5.32	70.5314	69.8476	1.6	12.1
	1823499		5.15	67.8815			
	1890494		5.29	70.1008			
	1899334		5.31	70.3936			
	1897428		5.30	70.3305			
3 $\mu\text{g/mL}$	857180	3.06	2.49	71.7430	72.0162	1.8	14.7
	876972		2.53	73.0543			
	861487		2.60	72.0284			
	879952		2.64	73.2517			
	830928		2.54	70.0038			

Tabla 52. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando enrofloxacinó y plasma.

Concentración de Ciprofloxacino	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	% de Recobro	\bar{y} % de Recobro	CV (%)	DEA (%)
10 $\mu\text{g/mL}$	3760321	10.2	8.43	75.8261	74.3355	0.8	14.3
	3801104		8.62	76.6258			
	3716038		8.65	74.9579			
	3765694		8.54	75.9315			
	3750023		8.61	74.1699			
6 $\mu\text{g/mL}$	2201073	6.12	5.22	75.4242	74.9028	0.7	14.6
	2183845		5.18	74.8612			
	2187394		5.09	74.9772			
	2159832		5.13	74.0765			
	2193443		5.00	75.1749			
3 $\mu\text{g/mL}$	1050134	3.06	2.51	75.6280	75.6154	0.6	15.0
	1059744		2.55	76.2562			
	1053439		2.54	75.8442			
	1041135		2.53	75.0400			
	1045245		2.56	75.3086			

Tabla 53. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando ciprofloxacino y leche.



Concentración de Enrofloxacino	Área bajo la curva (ABC)	Concentración adicionada de Enrofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada de Enrofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	% de Recobro	\bar{y} % de Recobro	CV (%)	DEA (%)
10 $\mu\text{g/mL}$	3510423	10.3	8.57	73.5363	73.0656	0.7	14.8
	3493984		8.54	73.2128			
	3468244		8.49	72.7061			
	3510399		8.57	73.5358			
	3449490		8.45	72.3370			
6 $\mu\text{g/mL}$	2050422	6.18	5.21	74.6665	73.8513	0.7	13.6
	2020322		5.19	73.6791			
	2033834		5.20	74.1223			
	2011982		5.17	73.4055			
	2011298		5.16	73.3831			
3 $\mu\text{g/mL}$	870233	3.09	2.55	71.9029	72.4630	0.5	15.0
	880334		2.53	72.5656			
	880023		2.52	72.5452			
	884432		2.56	72.8344			
	878833		2.55	72.4671			

Tabla 54. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando enrofloxacino y leche.

Con respecto al por ciento de recuperación se observa que para cada nivel evaluado el por ciento de recobro absoluto oscila entre el 70-76 % pero es preciso en cada nivel evaluado.

4.2.6 Estabilidad

En métodos bioanalíticos es importante determinar las condiciones de temperatura y tiempo en las que, el compuesto, permanezca estable en la matriz biológica durante su manejo, almacenamiento y análisis (NOM-177,1998). Por este motivo, se evaluó el efecto de: la temperatura ambiente; los ciclos de congelación-descongelación; la temperatura de refrigeración y la temperatura de refrigeración en muestras almacenadas sin reconstituir sobre las muestras preparadas a las concentraciones de los puntos control. Los resultados obtenidos para cada condición se resumen en los siguientes párrafos.



4.2.6.1 Ciclos de congelación-descongelación

Para evaluar el efecto del ciclo congelación-descongelación se prepararon, por duplicado, tres series de los puntos control y se comparó la respuesta con la obtenida en una serie de puntos preparada el día del análisis.

Los resultados generados se sintetizan en las Tablas 55 y 56. Debido a que la primera serie cumple con el criterio de aceptación se descartaron los resultados de la segunda y tercera serie. Esto es, el promedio de la desviación estándar absoluta no es mayor del 15% en cada nivel de concentración.

Serie	Concentración de Ciprofloxacino	Área bajo la curva (ABC)	Concentración recuperada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} concentración recuperada Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	% DEA
1	10 $\mu\text{g/mL}$ -1	3497899	8.52	8.50	15.0
	10 $\mu\text{g/mL}$ -2	3479009	8.49		
	6 $\mu\text{g/mL}$ -1	1786967	5.12	5.15	14.2
	6 $\mu\text{g/mL}$ -2	1800519	5.18		
	3 $\mu\text{g/mL}$ -1	1063821	2.82	2.80	6.7
	3 $\mu\text{g/mL}$ -2	1028193	2.79		

Tabla 55. Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad mediante ciclos de congelación y descongelación del ciprofloxacino en plasma.

Serie	Concentración de Enrofloxacin	Área bajo la curva (ABC)	Concentración recuperada de Enrofloxacin ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} concentración recuperada Enrofloxacin ($\mu\text{g/mL}$)	% DEA
1	10 $\mu\text{g/mL}$ -1	3105951	8.51	8.50	15.0
	10 $\mu\text{g/mL}$ -2	3017001	8.49		
	6 $\mu\text{g/mL}$ -1	1685075	5.09	5.10	15.0
	6 $\mu\text{g/mL}$ -2	1695359	5.11		
	3 $\mu\text{g/mL}$ -1	849946	2.51	2.56	14.7
	3 $\mu\text{g/mL}$ -2	859550	2.60		

Tabla 56. Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad mediante ciclos de congelación y descongelación del enrofloxacin en plasma.

Como se observa en las Tablas 53 y 54 el valor promedio de desviación absoluta se encuentra en rangos del 6.7 al 15.0 % para el ciprofloxacino y del 14.7 al 15.0% para el enrofloxacin. Con base en esta evidencia se concluye que las muestras



de la primera serie son estables durante los ciclos de congelación y descongelación.

4.2.6.2 Estabilidad de las muestras a temperatura ambiente

Par el cumplimiento de este parámetro se prepararon y almacenaron, a temperatura ambiente, los puntos control. Los resultados obtenidos se encuentran sintetizados en las Tablas 57 y 58.

Concentración de Ciprofloxacino	Área bajo la curva (ABC)	Concentración recuperada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} concentración recuperada Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	% DEA
10 $\mu\text{g/mL}$ -1	3622293	8.55	8.68	13.2
10 $\mu\text{g/mL}$ -2	3880227	8.82		
6 $\mu\text{g/mL}$ -1	2010707	5.67	5.65	5.8
6 $\mu\text{g/mL}$ -2	1948939	5.63		
3 $\mu\text{g/mL}$ -1	995072	2.56	2.55	15.0
3 $\mu\text{g/mL}$ -2	992379	2.55		

Tabla 57. Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra con ciprofloxacino, a temperatura ambiente, en plasma.

Concentración de Enrofloxacinó	Área bajo la curva (ABC)	Concentración recuperada de Enrofloxacinó ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} concentración recuperada Enrofloxacinó ($\mu\text{g/mL}$)	% DEA
10 $\mu\text{g/mL}$ -1	3414976	8.70	8.66	13.4
10 $\mu\text{g/mL}$ -2	3324126	8.62		
6 $\mu\text{g/mL}$ -1	1804519	5.27	5.23	12.8
6 $\mu\text{g/mL}$ -2	1786177	5.19		
3 $\mu\text{g/mL}$ -1	847022	2.51	2.54	15.0
3 $\mu\text{g/mL}$ -2	854947	2.57		

Tabla 58. Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra con enrofloxacinó, a temperatura ambiente, en plasma.

Como se observa en las Tablas 55 y 56 el valor promedio de la desviación estándar absoluta se encuentra en rangos del 5.8 al 15.0% para el ciprofloxacino y del 12.8 al 15.0% para enrofloxacinó. Con base en esta evidencia se concluye que las muestras son estables a temperatura ambiente.



4.2.6.3 Estabilidad de las muestras en refrigeración

El análisis de las muestras (puntos control) en refrigeración permitió obtener los resultados que se resumen en las Tablas 59 y 60. De nueva cuenta, el análisis estadístico permitió estimar un valor promedio de desviación estándar absoluta menor al 15% por lo tanto, las muestras son estables en refrigeración.

Concentración de Ciprofloxacino	Área bajo la curva (ABC)	Concentración recuperada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} concentración recuperada Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	% DEA
10 $\mu\text{g/mL}$ -1	3505508	8.52	8.53	14.7
10 $\mu\text{g/mL}$ -2	3528822	8.54		
6 $\mu\text{g/mL}$ -1	2054812	5.70	5.67	5.5
6 $\mu\text{g/mL}$ -2	2047541	5.64		
3 $\mu\text{g/mL}$ -1	1013179	2.67	2.63	12.3
3 $\mu\text{g/mL}$ -2	1000467	2.59		

Tabla 59. Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra con ciprofloxacino, en refrigeración, en plasma

Concentración de Enrofloxacinó	Área bajo la curva (ABC)	Concentración recuperada de Enrofloxacinó ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} concentración recuperada Enrofloxacinó ($\mu\text{g/mL}$)	% DEA
10 $\mu\text{g/mL}$ -1	3228419	8.52	8.51	14.9
10 $\mu\text{g/mL}$ -2	3198912	8.49		
6 $\mu\text{g/mL}$ -1	1787483	5.20	5.19	13.5
6 $\mu\text{g/mL}$ -2	1772642	5.18		
3 $\mu\text{g/mL}$ -1	840065	2.56	2.54	15.0
3 $\mu\text{g/mL}$ -2	838291	2.51		

Tabla 60. Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra con enrofloxacinó, en refrigeración, en plasma.

4.2.6.4 Estabilidad de las muestras procesadas sin reconstituir en refrigeración o congelación

Este parámetro de estabilidad se cumplió mediante el análisis de tres puntos control procesados hasta su evaporación y almacenados en refrigeración. Una vez más, el análisis de la primera serie cumplió con el criterio de aceptación y no se



consideraron la segunda y tercera serie. Los resultados para éste parámetro se resumen en las Tablas 61 y 62.

Concentración de Ciprofloxacino	Área bajo la curva (ABC)	Concentración recuperada de Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} concentración recuperada Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	% DEA
10 $\mu\text{g/mL}$ -1	3443892	8.49	8.51	14.9
10 $\mu\text{g/mL}$ -2	3509011	8.53		
6 $\mu\text{g/mL}$ -1	2082304	5.76	5.16	14.0
6 $\mu\text{g/mL}$ -2	2029084	4.57		
3 $\mu\text{g/mL}$ -1	1037146	2.79	2.73	9.0
3 $\mu\text{g/mL}$ -2	1027087	2.68		

Tabla 61. Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra procesada y sin reconstituir en refrigeración con ciprofloxacino en plasma.

Concentración de Enrofloxacinó	Área bajo la curva (ABC)	Concentración recuperada de Enrofloxacinó ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{y} concentración recuperada Enrofloxacinó ($\mu\text{g/mL}$)	% DEA
10 $\mu\text{g/mL}$ -1	3214921	8.53	8.54	14.6
10 $\mu\text{g/mL}$ -2	3253909	8.56		
6 $\mu\text{g/mL}$ -1	1707876	5.09	5.10	15.0
6 $\mu\text{g/mL}$ -2	1726704	5.10		
3 $\mu\text{g/mL}$ -1	843447	2.61	2.58	14.0
3 $\mu\text{g/mL}$ -2	840454	2.55		

Tabla 62. Resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestras procesada y sin reconstituir en refrigeración con enrofloxacinó en plasma.

En síntesis, los valores promedio de la concentración recuperada de los puntos control (t_0) con respecto a los valores promedio de concentración de los puntos control procesados y refrigerados permitieron estimar que el porcentaje de desviación estándar absoluta no es mayor al 15% en cada nivel de concentración. Con base en estas evidencias se concluye que las muestras son estables bajo estas condiciones.

4.2.7 Robustez

La robustez es la capacidad del método analítico para obtener resultados reproducibles ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y



condiciones de trabajo debido a la influencia de factores internos y que proporciona un indicio de su confiabilidad durante el uso normal (NOM-177, 1998). El objetivo de esta determinación es identificar las variables controlables que puedan contribuir, a determinar cambios significativos, de acuerdo con el criterio de aceptación. Las variables que se modificaron para evaluar este parámetro fueron velocidad de flujo, volumen de inyección y proporción de la fase móvil. Los resultados obtenidos para este parámetro se resumen en las Tablas 63 y 64, así como en las Figuras 22-28.

Ciprofloxacino				
Condiciones de operación cromatográficas		Área Bajo la Curva (ABC)	Tiempo de retención (T _R)	Factor de resolución
6 µg/mL-1 condiciones normales		2114388	7.824	2.193
6 µg/mL-2 condiciones normales		2127036	7.976	2.510
6 µg/mL-3 condiciones normales		2114625	7.897	2.300
6 µg/mL-1	AcN:MEOH:H ₂ O 238:42:720 0.56% TEA, 0.56% H ₃ PO ₄	2137542	5.218	0.854
6 µg/mL-2		2147006	5.154	0.851
6 µg/mL-3		2152614	5.156	0.816
6 µg/mL-1	AcN:MEOH:H ₂ O 102:18:880 0.24% TEA, 0.24% H ₃ PO ₄	2016138	29.992	3.238
6 µg/mL-2		2012379	29.898	3.143
6 µg/mL-3		2014732	29.839	3.214
6 µg/mL-1 0.84 mL/min		1545910	5.834	1.539
6 µg/mL-2 0.84 mL/min		1485536	5.736	1.595
6 µg/mL-3 0.84 mL/min		1483341	5.721	1.485
6 µg/mL-1 0.36 mL/min		3293536	15.032	2.865
6 µg/mL-2 0.36 mL/min		3232382	14.795	2.865
6 µg/mL-3 0.36 mL/min		3237339	14.668	3.102
6 µg/mL-1 70 µL		2786420	7.930	2.222
6 µg/mL-2 70 µL		2813949	7.914	2.386
6 µg/mL-3 70 µL		2660595	7.908	2.494
6 µg/mL-1 30 µL		1390419	7.855	2.587
6 µg/mL-2 30 µL		1366590	7.853	2.061
6 µg/mL-3 30 µL		1390353	7.842	2.541

Tabla 63. Resultados obtenidos para evaluar la robustez con ciprofloxacino en plasma.



Enrofloxacin				
Condiciones de operación cromatográficas	Área Bajo la Curva (ABC)	Tiempo de retención (TR)	Factor de resolución	
6 µg/mL-1 condiciones normales	2011576	10.272	2.193	
6 µg/mL-2 condiciones normales	1991264	10.196	2.510	
6 µg/mL-3 condiciones normales	2002298	10.211	2.300	
6 µg/mL-1	AcN:MEOH:H ₂ O 238:42:720 0.56% TEA, 0.56% H ₃ PO ₄	1958288	6.211	0.854
6 µg/mL-2		1964328	6.135	0.851
6 µg/mL-3		1974686	6.138	0.816
6 µg/mL-1	AcN:MEOH:H ₂ O 102:18:880 0.24% TEA, 0.24% H ₃ PO ₄	1817319	44.290	3.238
6 µg/mL-2		1798283	44.733	3.143
6 µg/mL-3		1800357	44.695	3.214
6 µg/mL-1 0.84 mL/min	1216860	7.526	1.539	
6 µg/mL-2 0.84 mL/min	1186700	7.398	1.595	
6 µg/mL-3 0.84 mL/min	1188032	7.380	1.485	
6 µg/mL-1 0.36 mL/min	3179746	19.606	2.865	
6 µg/mL-2 0.36 mL/min	3097517	19.237	2.865	
6 µg/mL-3 0.36 mL/min	3086802	19.146	3.102	
6 µg/mL-1 70 µL	2621104	10.211	2.222	
6 µg/mL-2 70 µL	2650601	10.189	2.386	
6 µg/mL-3 70 µL	2504915	10.181	2.494	
6 µg/mL-1 30 µL	1210983	10.122	2.587	
6 µg/mL-2 30 µL	1180635	10.118	2.061	
6 µg/mL-3 30 µL	1210175	10.106	2.541	

Tabla 64. Resultados obtenidos para evaluar la robustez con enrofloxacin en plasma

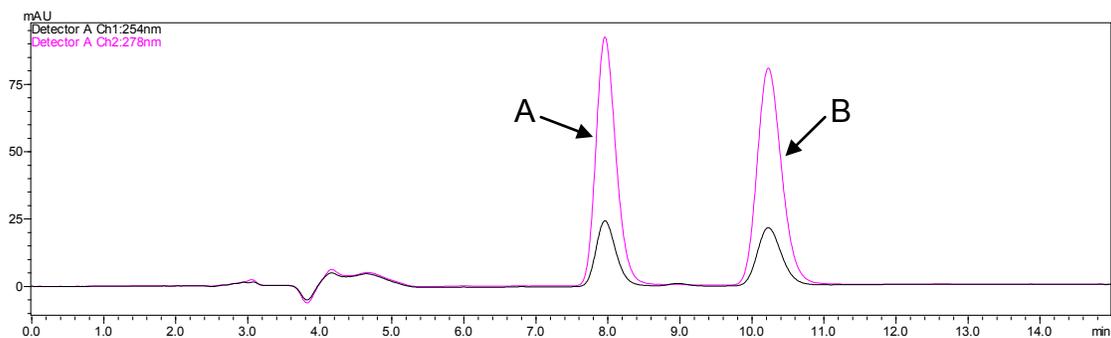


Figura 22. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacinio a una concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en condiciones normales de operación.

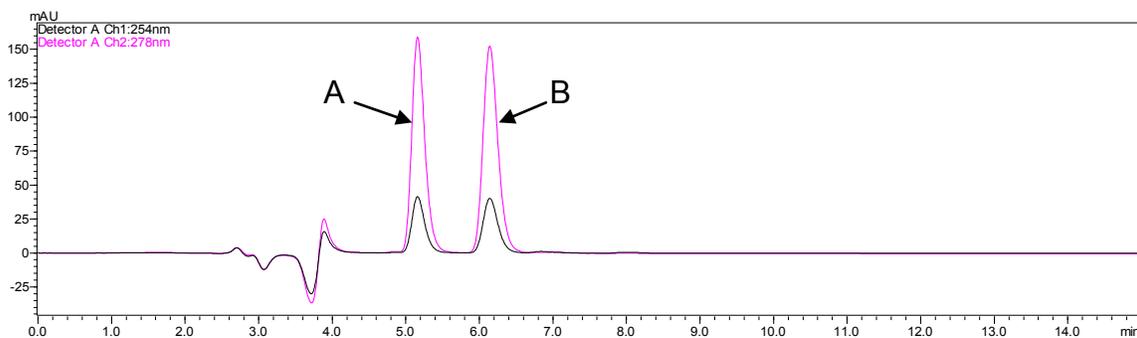


Figura 23. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacinio a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando como fase móvil ACN: MEOH: H_2O en proporción 238:42:720, 0.56% de TEA y 0.56% de H_3PO_4 .

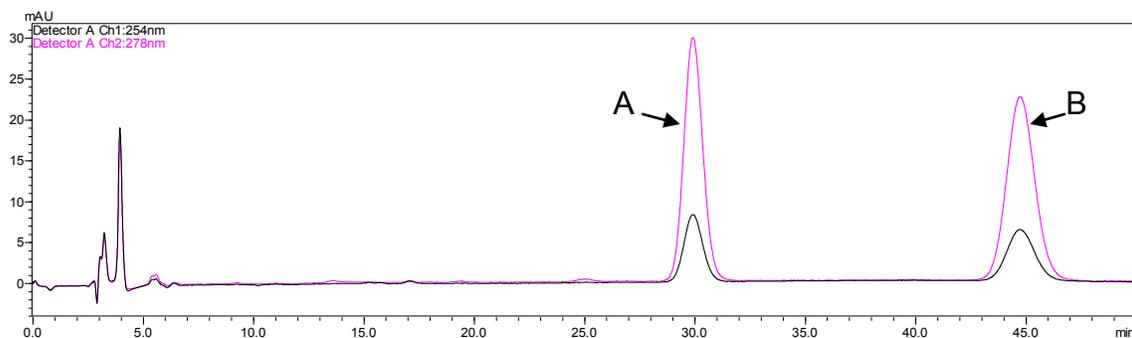


Figura 24. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacinio a una concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando como fase móvil ACN: MEOH: H_2O en proporción 102:18:880, 0.24% de TEA y 0.24% de H_3PO_4 .

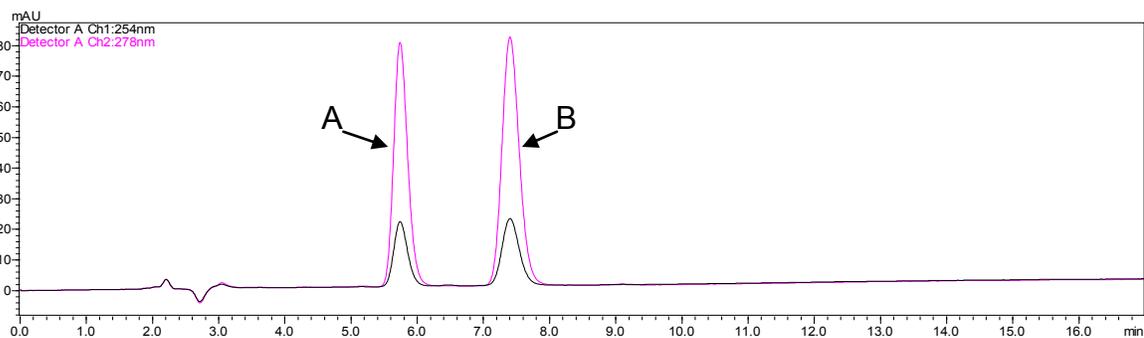


Figura 25. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacin a una concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando un flujo de 0.84 mL/min.

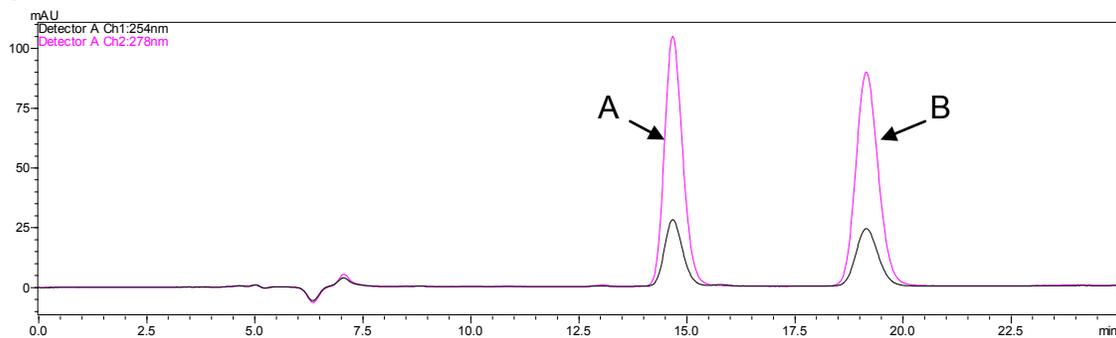


Figura 26. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacin a una concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando un flujo de 0.36 mL/min.

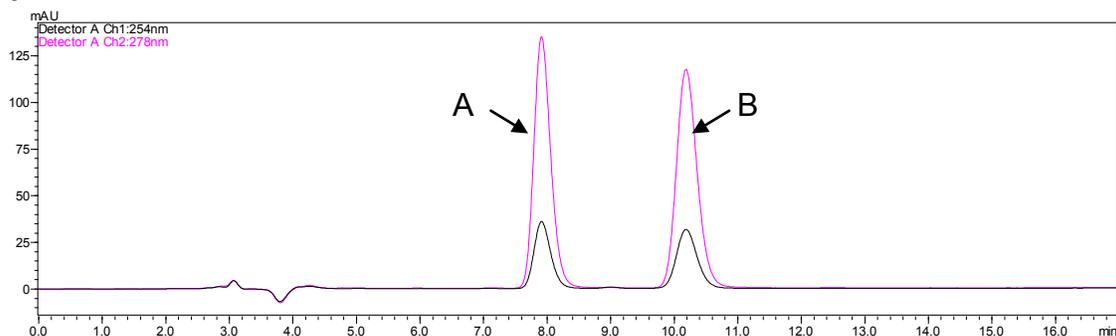


Figura 27. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacin a una concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando un volumen de inyección de 70 μL .

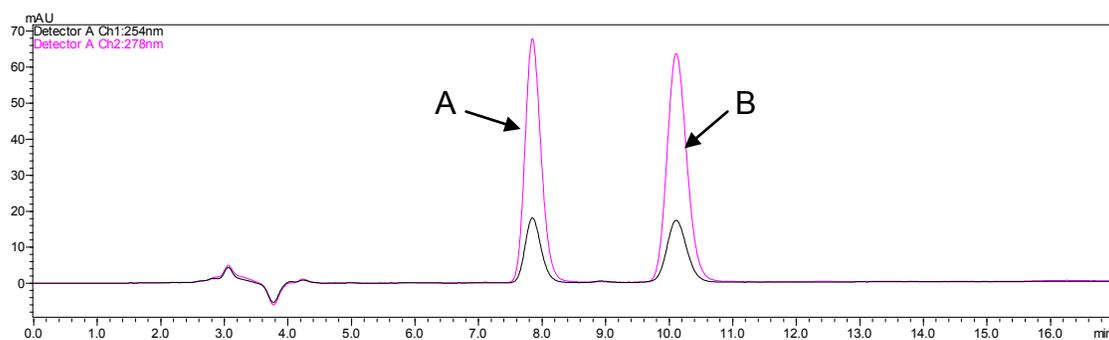


Figura 28. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma adicionado con ciprofloxacino y enrofloxacino a una concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando un volumen de inyección de 30 μL .

Como se deduce de los resultados ilustrados anteriormente cuando se modifica la velocidad de flujo y la proporción de la fase móvil el impacto generado representa más del 15% en la respuesta (tiempos de retención y factor de resolución) por lo tanto, el método analítico no tolera cambios en sus parámetros cromatográficos.



5. CONCLUSIONES

a) El método analítico desarrollado para llevar a cabo la cuantificación del ciprofloxacino y enrofloxacino en plasma y leche de vaca es simple, rápido y económico comparándolo con los métodos de extracción en fase sólida. El procedimiento desarrollado requiere de un sólo paso de extracción utilizando diclorometano como disolvente orgánico.

b) El método analítico desarrollado es específico, lineal en el intervalo de concentraciones establecido, estable, exacto, preciso y reproducible para cuantificar a los fármacos en el rango de concentraciones establecido, de acuerdo a lo descrito en la guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la FDA y la NOM-177-SSAA1-1998.

d) La información generada en el presente trabajo servirá de base para cuantificar la presencia de residuos de estos quimioterapéuticos en plasma y leche de vaca para evitar los riesgos en los consumidores de productos de origen animal.

6. PERSPECTIVAS

a) Aplicar el método analítico para cuantificar el contenido de enrofloxacino y su principal metabolito activo ciprofloxacino en muestras de vacas con mastitis.

b) Realizar un modelo farmacocinético que describa el comportamiento de estos antibióticos en plasma sanguíneo y en leche en vacas después de su administración intramamaria e intramuscular.



7. BIBLIOGRAFIA

1. Ávila T., S., Gutiérrez C., A. Mastitis. 2004. Universidad Nacional Autónoma de México. (en línea). Consultado 8 marzo 2013. Disponible en: <http://academicos.cualtos.udg.mx/DiplomadoCalidadLeche/doctos/24jul04/Mastitis%20en%20Ganado%20Bovino.doc>
2. Ball, P. 2001. Future of the quinolones. *Semin. Respir. Infect.* **16**: 215-224.
3. Brown S. A. 1996. Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics.* **19**: 1-14.
4. Cano, C. 2006. Nuevas alternativas en el diagnóstico clínico de campo y en el tratamiento de mastitis. Boletín Técnico Virtual. (en línea). México. Consultado 9 mar. 2013. Disponible en www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgCliC004.htm.
5. Cinquina, A.L., Roberti, P., Giannetti, L., Longo F., Draisci, R., Fagiolo, A., Brizioli N.R. 2003. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection optimization and validation. *Journal of Chromatography.* **987**: 221–226.
6. Cray, P.J., Dargatz, D. A., Wells, S. J., Wineland, N. E., Miller, M. A., Tollefson L., Petersen, K.E. 1999. Impact of antimicrobial use in veterinary medicine. *American Veterinary Medical Association Abstract.* **12**: 1739-1741.
7. EMA, CENAM. 2008. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. 1a edición. México.
8. García, M., Soberón., E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J. y Alcántara, A. 2002. Comisión de Validación de Métodos Analíticos. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos: 8-11.
9. Gutiérrez, R. T., Noa, M. P., Díaz, G. G., Vega, S. L., González, M. L., Prado, G. F. 1993 Determination of the presence of 10 antimicrobial residues in Mexican pasteurize milk. *Interciencia.* **30**: 291-294.
10. Harmon, R.J. 1994, Physiology of mastitis and factors affecting somatics cells counts. *J. Dairy Res.* **77**: 2103- 2112.



11. Heringstad, B., Klemetsdal, G., Ruane, J., 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*. **64**: 95-106.
12. Hooper, D. C. 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis*. **2**: 530-8.
13. ICH-FDA Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2001
14. Idowu, O. R. and Peggins, J. O. 2004. Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **35**: 143–153.
15. King, D.E., Malone, R., Lilley, S.H. 2000. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am. Fam. Physician*. **61**: 2741-2748.
16. Luquet. En: Leche y productos lácteos Vaca – Oveja – Cabra: La leche. De la mama a la lechería; Editorial Acribia, S.A. de C.V.; Edición en lengua española 1991, Volumen 1. 137-139.
17. Malbe, M., Salonen, M., Fang, W., Öpik, T., Jalakas, M., Klaassen, M., Sandholm, M. 1996. Disposition of enrofloxacin (Baytril) into the udder after intravenous and intraarterial injections into dairy cows. *Journal of Veterinary Medicine A*. **43**: 377-386.
18. Manceau, J., Gicquel, M., Laurentie, M., Sanders, P. 1999. Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biological fluids by high-performance liquid chromatography. Application in pharmacokinetic studies in pig and rabbit. *Journal of Chromatography B*, **726**: 175–184.
19. McEwen, A.S., Black, D. W., Meek, H. A. 1992. Antibiotic residues (bacterial inhibitory substances) in the milk of cows treated under label and extra-label conditions. *Can Vet J*. **33**: 527-534.
20. McKellar, Q.I., Gibson, A., Montero, Bregante, M. 1999. Pharmacokinetics of Enrofloxacin and Danofloxacin in Plasma, Inflammatory Exudate, and Bronchial Secretions of Calves following Subcutaneous Administration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **43**: 1988-1992.
21. NMX-F-700-COFOCALEC-2004, Sistema Producto Leche – Alimento – Lácteo – Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba.



22. NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
23. NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias.
24. Oliphant, C.M., Green, G.M. 2002. Quinolones: a comprehensive review. *Am. Farm. Physician*. **65**: 455-464.
25. Otero, J.L., Mestorino, N., Errecalde, J.O. 2009. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous administration in sheep. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **28**: 1129-1142.
26. Pascual, A., García, I. 1998 Penetración y actividad intracelular de las fluorquinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **16**: 138-143.
27. Pedraza, M.L. and Streicher, K.L. 1991. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. **7**: 135-146.
28. Piddock, L. J. 1995. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones: state-of-the-art 1992-1994. *Drugs*. **492**: 29-35.
29. REGLAMENTO (UE) No 37/2010 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.
30. Roginski, H., Fox, F.P. and Fuquay, W.J. 2003. *Encyclopedia of dairy sciences*. Ed. Advisory board. **3**:1680-1751.
31. Ruiz, J. 2003. Mechanism of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother*. **51**: 1109-1117.
32. Sadiq, A. 1996. Effects of orally administered enrofloxacin (Baytril()) on the ruminal functions of adult cattle. *Assiut Veterinary Medical Journal*. **35**: 114-129.
33. Shahani, M.J., Ocampo, L.E. 1986. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* **85**: 2589-2599.



34. Seegers, H., Fourichon, C. y Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.***34**: 475-491.
35. Schällibaum, M. 2001. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. *Annual Meeting Proceeding. National Mastitis Council.* **40**: 38-46.
36. Schmitz, F.J., Higgins, P.G., Mayer, S., Fluit, A.C., Dalhoff, A. 2002. Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**: 647-659.
37. Schukken, Y., Bennett, G., Green, L., Van Werven, T. 2001. Can somatic cell counts get too low? *Annual Meeting Proceeding. National Mastitis Council.* **40**: 19-28.
38. Sumano, L. H., Ocampo, C. L. 1995. Bases farmacológicas de la vigilancia de residuos de fármacos en productos de origen animal. *Vet. Mex.* **26**: 175-181.
39. Sumano, L. H., Ocampo, C. L., Gutiérrez, O. L. 2001a. Non-bioequivalence of various trademarks of enrofloxacin and Baytril® in cows. *Dtsch, tierarztl. Wschr.* **108**: 311-314.
40. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines and inspections. January 2002. EMEA/MRL/820/02-FINAL.
41. Tyczkowska, K. L., Voyksner, R. D., Anderson, K. L., Papich, M. G. 1994. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in bovine milk and plasma by ion-pairing liquid chromatography. *Journal of Chromatography B.* **658**: 341-348.
42. Wigley, D. B. 1995. Structure and mechanism of DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **24**: 185-208.
43. Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B., Zschock, M. *Mastitis Bovina, Prevención, Diagnostico y Tratamiento.* Editorial Universitaria, Guadalajara, Jalisco. 2004, 132-138.
44. Zhao, X. and Lacasse, P. 2007. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Dairy Sci.* **86**: 57-65.



ANEXO

Ecuaciones para determinar los parámetros estadísticos

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ABREVIATURA	ECUACIÓN
Coefficiente de correlación	r	$r = \sqrt{\frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{((n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2))}}$
Coefficiente de determinación r	r^2	$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{((n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2))}$
Coefficiente de variación	CV	$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$
Desviación estándar	S	$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$
Desviación estándar de la ordenada al origen	b_0	$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}\right)}$
Desviación estándar de la pendiente	S_{b_1}	$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\left(\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}\right)}$
Desviación estándar de la regresión	$S_{y/x}$	$S_{y/x} = \sqrt{\left(\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}\right)}$
Diferencia absoluta de las medias	$ d_i $	$ d_i = \bar{y}_i - \bar{y}_0 $
Intervalo de confianza para la media poblacional	$IC(\mu)$	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0,975,n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$



PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ABREVIATURA	ECUACIÓN
Intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional	$IC(\beta_0)$	$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0,975,n-2}, Sb_0$
Intervalo de confianza para la pendiente poblacional	$IC(\beta_1)$	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975,n-2}, Sb_1$
Media aritmética	$\bar{x}, \bar{y}, \bar{y}_i$	$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}, \bar{y} = \frac{\sum y}{n}, \bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n}$
Ordenada al origen	b_0	$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$
Pendiente	b_1	$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Suma de x	$\sum x$	$\sum x = \sum_{i=1}^n x_i$
Suma de y	$\sum y$	$\sum y = \sum_{i=1}^n y_i$
Suma al cuadrado de x	$(\sum x)^2$	$(\sum x)^2 = (\sum_{i=1}^n x_i)^2$
Suma al cuadrado de y	$(\sum y)^2$	$(\sum y)^2 = (\sum_{i=1}^n y_i)^2$
Suma de x al cuadrado	$\sum x^2$	$\sum x^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2$
Suma de y al cuadrado	$\sum y^2$	$\sum y^2 = \sum_{i=1}^n y_i^2$



PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ABREVIATURA	ECUACIÓN
Suma de x por y	$\sum x y$	$\sum x y = \sum_{i=1}^n x_i y_i$
Suma de x por suma de y	$\sum x \sum y$	$\sum x \sum y = \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i = 1n x_i \sum_{i=1}^n y_i = 1n y_i$
% de Recobro	%R	$\%R = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$
Calculo del % de Desviación Estándar Absoluta		
$\frac{\text{Valor nominal} - \text{Valor calculado}}{\text{Valor nominal}} \times 100$		