

## MODIFICACIONES DE LA CONCENTRACION DE OXITETRACICLINA «IN VITRO» EN FUNCION DEL TIEMPO Y DE LA TEMPERATURA EN PLASMA BOVINO

**Autores:** \* M.<sup>a</sup> E. Guimerá, \* C. J. Ponferrada, \* I. Rosado, \* L. Moreno, \*\* C. M. Cárceles y \* J. M. Serrano.

**Dirección:** \* Dpto. de Farmacología y Toxicología. Facultad de Veterinaria. Avda. Medina Azahara, 9. 14071 Córdoba. \*\* Dpto. Ciencias Socio-Sanitarias. Facultad de Veterinaria. Complejo de Espinardo. 30071 Murcia.

**Palabras clave:** Oxitetraciclina. Desnaturalización «in vitro». Temperatura.

### RESUMEN

La desnaturalización de antibióticos del grupo de las tetraciclinas es un hecho conocido casi desde su introducción en terapéutica. En el presente trabajo estudiamos las modificaciones de la concentración de la oxitetraciclina (OTC) «in vitro» disuelta en plasma bovino y tampón fosfato a las temperaturas de 15, 25, 30, 37 y 42°C y durante diferentes tiempos. Los procesos de modificación de la concentración se producen principalmente durante la primera hora y son tanto más manifiestos conforme menor es la concentración del antibiótico. En plasma, además, estos procesos tienden a ser mayores conforme menor es la temperatura del ensayo, mientras que en tampón ocurre lo contrario. La congelación durante tiempos prolongados permite obtener recuperaciones muy altas en concentraciones bajas y algo menores para las concentraciones más elevadas.

### SUMMARY

The denaturalization of the antibiotics belonging to the tetracycline group has been a well-known fact since its discovery. The «in vitro» modification of the concentration of oxytetracycline in bovine plasma and phosphate buffer at temperature of 15, 25, 30, 37 and 42 degrees Celsius at different times has been investigated in this study. The modification of the concentration was found to occur mainly during the first hour and to be more manifest at lower concentrations of the antibiotic. It was also found to be greater at lower temperatures in the case of the bovine plasma, and at higher temperatures in the case of the phosphate buffer. Additionally, the percentage of recuperation obtained after freezing for prolonged periods of time were higher for low concentrations of the antibiotics.

### INTRODUCCION

Los procesos de desnaturalización de antibióticos del grupo de las tetraciclinas comienzan a estudiarse desde su descubrimiento a finales de la década de los cuarenta. Así, Bliss y Chandler (1), Dornbush y Pelcak (2), Paine *et al.* (3) y Price *et al.* (4) señalan que la clortetraciclina (CTC) o aureomicina, sufre un rápido deterioro «in

vitro» a 37°C y a pH neutro o ligeramente alcalino. La disminución de la estabilidad es dependiente de la temperatura y del pH, ya que el deterioro es más rápido a temperatura más alta y a mayor duración del calentamiento por una parte y en solución alcalina que ácida por otra (2, 3, 5). Regna y Solomons (6) y Finland *et al.* (7) señalan que este mismo hecho se presenta con otros antibióticos del mismo grupo como ocurre

con la oxitetraciclina (OTC). Sin embargo, se comprobó que la oxitetraciclina era más estable en miel que en soluciones acuosas tamponadas a diferentes valores de pH y temperatura (8) y que la inactivación de clortetraciclina y oxitetraciclina en leche incubada a 37°C durante 12 horas fue mínima (9).

Womack *et al.* (5) demuestran que la yema de huevo contiene una o varias sustancias que evitan el deterioro de la CTC a 37°C. Pruebas realizadas con albúmina de huevo y con seroalbúmina humana demostraron que estas fracciones carecían de factores protectores. El estudio de la sustancia encontrada en la yema de huevo demostró que ésta resistía el calentamiento a una temperatura de 60°C durante 80 minutos, a 100°C durante una hora y, bajo ciertas condiciones, a 120°C en autoclave durante 15 minutos. Además la concentración en la yema de huevo era tal que incluso diluida a la cuarta parte seguía manteniendo su acción protectora sin una disminución significativa. Con posterioridad se demostró que el componente protector estaba estrechamente relacionada con la fracción polisacárida de la yema de huevo (10).

Estos estudios, de gran importancia farmacéutica debido a que pueden informar sobre las diferentes posibilidades de preparación de los productos comerciales no abordan el problema de la determinación y cuantificación de antibióticos desde una perspectiva clínica en la que las matrices plasmática y/o tisular pueden incidir en la estabilidad junto con las condiciones de almacenamiento. Por tal motivo, en el presente trabajo estudiamos «in vitro» las modificaciones de la concentración de oxitetraciclina en plasma bovino para establecer el papel que juegan las variaciones de temperatura y el tiempo de almacenamiento, partiendo de diferentes concentraciones iniciales. Ello podría permitirnos proponer unas recomendaciones de almacenamiento o bien la posible corrección, o no, de los datos de concentración plasmática que se obtengan en los diferentes estudios.

## MATERIAL Y METODOS

El plasma bovino se obtuvo por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 15 minutos de sangre heparinizada. Posteriormente fue dividido en fracciones alícuotas de aproximadamente 100 ml y se congeló a 18-20° bajo cero hasta el momento de su utilización.

Para la realización de los ensayos se prepararon diferentes disoluciones de OTC (Clorhidrato de Oxitetraciclina -Pfizer S.A.) en plasma a las concentraciones de 2,5; 5; 10; 20; 40; 60; 80 y 100 micromoles/litro. Idénticas concentraciones se realizaron en una solución tamponada de pH = 7,4 y con una concentración de fosfatos de 65 milimoles/litro. Los ensayos con plasma se hicieron por triplicado, en tanto que los de solución tamponada fueron simples.

El proceso se llevó a cabo en oscuridad introduciendo los tubos con las diferentes concentraciones de OTC correspondientes a las tres series de plasma y a la del tampón en un baño termostaticado con agitación. Las temperaturas constantes que se mantuvieron en el baño, y a las que se realizaron los ensayos, fueron 15, 25, 30, 37 y 42°C.

La determinación de la concentración de OTC se realizó mediante lectura espectrofotométrica, en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 55B, a 352 nanómetros, donde la OTC presenta un máximo de absorción. Las lecturas se realizaron siempre transcurridas 1, 2, 4, 6, 18, 24 y 48 horas desde que se comenzó la termostatación, además de una lectura inicial en el momento en que se prepararon las series e inmediatamente antes de introducir los tubos en el baño y que se tomó como lectura a tiempo cero.

Los valores de concentración plasmática se calcularon a partir de la correspondiente recta de calibrado que es la obtenida para cada ensayo a tiempo cero. De similar manera se procedió para calcular las concentraciones en los tampones.

Con estos valores de concentración calculados a los diferentes tiempos de termostatación y los de las rectas de ca-

librado establecidas a partir de los datos a tiempo cero se obtuvieron las rectas de regresión para cada tiempo y temperatura.

Finalmente, realizamos también un ensayo en el que se utilizaron dos series de soluciones de OTC, una en la que estaba en solución acuosa y otra en plasma bovino a las concentraciones de 2,5; 5; 10; 20 y 50 micromoles/litro. De las series de la que la OTC estaba en solución acuosa se realizaron dos alícuotas, la primera se utilizó para cuantificar la OTC en el momento de la preparación, mientras que la otra se congeló a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Con respecto a la serie de plasma bovino se dividió en tres alícuotas de las cuales, la primera se empleó para valorar la OTC en el momento de la preparación, la segunda se desproteinizó con ácido tricloroacético y se congeló el sobrenadante y la tercera se congeló sin ningún proceso previo a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Estas series, junto con la de solución acuosa se mantuvieron durante 5 meses a esta temperatura.

La determinación y cuantificación de la OTC en este último ensayo se realizó por métodos de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) empleando un equipo Spectra-Physics formado por bomba ternaria modelo SP-8800, detector UV de longitud de onda variable Spectra-100 e integrador SP-4400, en el que montamos una columna de Supelcosil-LC-18-DB con 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno cuya fase estacionaria es octadecil-dimetil-silicona con partículas de 5 micras y poros de 100 Angstrom. Para ello nos basamos en el procedimiento descrito por Knox y Jurand (11) y el HPLC-Bulletin 834 de Supelco (12). La preparación de las muestras de plasma para su posterior inyección en el sistema HPLC se realizó como indican McElroy *et al.* (13), añadiendo 0,25 ml de ácido tricloroacético a 1 ml de plasma y tras agitar fuertemente se mantenía en hielo durante 15 minutos para después centrifugar durante 10 minutos a 4000 r.p.m. El sobrenadante se filtraba y posteriormente se inyectaba una alícuota de 50  $\mu\text{l}$ . La fase móvil con un pH ajustado a 3,5 y con un flujo de 1,5 ml/min,

estaba compuesta por un 30 % de N,N-dimetil-formamida y un 70 % de tampón formado por ácido cítrico 0,05 M, citrato sódico 0,013 M, nitrato potásico 0,01 M y EDTA disódico 0,001 M. La cuantificación se realizó relacionando las áreas bajo los picos de OTC, leídos a una longitud de onda de 300 nm, con la recta de calibrado correspondiente.

## RESULTADOS

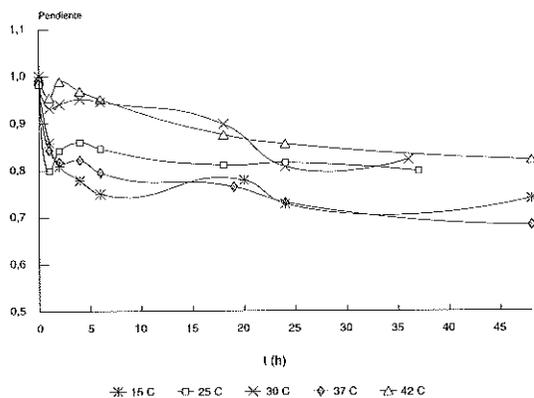
Hemos observado que a las concentraciones más bajas apenas existe diferencia a los distintos tiempos de termostatación, de esas concentraciones entre sí y entre las iniciales, mientras que conforme disminuyen las concentraciones ensayadas esas diferencias se van haciendo mayores pero en el sentido de que parece que aumentan las concentraciones conforme transcurre el tiempo.

La desnaturalización (o el efecto aparentemente contrario), medida por la variación de los valores de absorbancia a 352 nanómetros en función del tiempo, está relacionada, por consiguiente, con la concentración de OTC, al menos en el rango que hemos empleado nosotros, de 2,5 a 100 micromoles/litro. Debido a ello hemos obtenido para cada ensayo la recta de regresión correspondiente entre los valores iniciales de concentración y los determinados a los distintos tiempos. En todos los casos, y como era de esperar, los coeficientes de correlación y las medidas de ajuste fueron altamente significativas, por lo que, para cada ensayo y para poder realizar las pertinentes comparaciones entre ellos, hemos utilizado los valores de la pendiente de la recta de regresión. Estos valores fueron, en todos los casos, próximos a la unidad, de la que, no obstante, diferían de manera estadísticamente significativa y, además, iban descendiendo lentamente en función del tiempo transcurrido y de la temperatura del ensayo. La disminución de los valores de las pendientes de la recta son más la consecuencia del incremento aparente de las concentraciones más bajas que la relativa-

**Tabla I.**—Concentraciones plasmáticas de oxitetraciclina a 25°C, medidas por espectroscopia, pendientes y error estándar a los distintos tiempos de determinación

	Inicial	1 h	2 h	4 h	6 h	18 h	24 h	37 h
2,5 .....	2,83	10,24	11,88	13,55	14,41	16,02	15,12	16,32
5 .....	5,99	12,51	14,58	15,88	16,86	18,41	17,61	19,00
10 .....	11,02	16,65	18,80	20,41	21,25	22,19	21,61	22,66
20 .....	21,24	24,77	27,21	28,81	29,70	30,18	29,53	30,32
40 .....	40,11	39,77	43,52	45,57	46,68	46,66	45,52	45,67
60 .....	62,10	57,78	62,45	64,32	65,04	64,23	63,49	63,82
80 .....	80,64	73,05	78,34	81,00	81,47	79,08	78,58	78,68
100 .....	97,78	87,53	93,17	96,69	95,80	94,62	94,45	94,01
pte. ....	0,9825	0,7988	0,8413	0,8598	0,8459	0,8107	0,8155	0,7980
err .....	0,0120	0,0079	0,0097	0,0070	0,0102	0,0006	0,0059	0,0077

mente pequeña disminución de las concentraciones más elevadas. Esta circunstancia se aprecia claramente en la Tabla 1 en la que recogemos a título de ejemplo las concentraciones equivalentes que se obtuvieron a los distintos tiempos en el ensayo realizado en plasma a 25°C junto con las pendientes calculadas para cada caso. La representación gráfica de los valores de las pendientes, que corresponden a los ensayos realizados en plasma, a los distintos tiempos de termostatación y a las diferentes temperaturas, se recogen en la Figura 1. En ella observamos que se produce una rápida caída de las citadas pendientes en la primera hora para, con posterioridad, seguir descendiendo estos valores pero ya de manera mucho más suave hasta las 48 horas. Este hecho se pone de manifiesto cuando realizamos la comparación de los valores de las pendientes a tiempos consecutivos mediante la «t de Student» como se muestra en la Tabla 2. En efecto, vemos que en todos los casos, y para una misma temperatura, la comparación entre la pendiente de los valores a tiempo cero y a una hora de iniciada la termostatación muestra diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ), en tanto que las comparaciones entre otras parejas de valores de pendientes a tiempos consecutivos no muestran diferencias significativas salvo algunos casos más esporádicos.



**Figura 1.**—Valores de las pendientes frente al tiempo en los ensayos en plasma a las diferentes temperaturas.

También se aprecia en la Figura 1 que la disminución de la pendiente es mayor, en general, a las temperaturas más bajas ensayadas (15 y 25 grados), en tanto que se produce el efecto contrario a temperaturas más elevadas, sobre todo a 42°C. Cuando comparamos las pendientes, a los mismos tiempos pero entre temperaturas ensayadas contiguas (Tabla 3), vemos que no se manifiestan diferencias significativas entre los valores correspondientes a tiempo cero, como era de esperar, en tanto que en los demás casos sí se producen diferencias importantes salvo en algunas de las comparaciones. En efecto, entre 15 y 25 grados centígrados las diferencias encontradas son de menor intensidad y en menor cantidad

**Tabla II.**—Valores de la «t de Student» obtenidos de la comparación de las pendientes entre tiempos consecutivos a la misma temperatura

Horas	15°C	25°C	30°C	37°C	42°C
Ini- 1 .....	5,690***	12,760***	5,543***	9,432***	7,864***
1- 2 .....	2,120	3,398**	0,832	2,315*	3,941**
2- 4 .....	2,082	1,506	1,104	0,337	1,929
4- 6 .....	1,063	1,084	0,446	2,393*	1,814
6-18 .....	1,074	2,887*	2,409*	2,014	6,745***
18-24 .....	1,235	0,540	0,806	2,239	1,799
24-48 .....	0,292	1,807	0,132	3,701**	5,064***

\* Nivel de significación superior al 95 % ( $p < 0,05$ ).

\*\* Nivel de significación superior al 99 % ( $p < 0,01$ ).

\*\*\* Nivel de significación superior al 99,9 % ( $p < 0,001$ ).

**Tabla III.**—Valores de la «t de Student» obtenidos de la comparación de las pendientes entre temperaturas ensayadas consecutivas a los mismos tiempos

Comparación 15-25 25-30 30-37 37-42

Inicial .....	0,512	1,207	0,419	0,064
1 hora .....	2,755*	11,564***	7,440***	11,714***
2 horas .....	2,114	8,870***	13,801***	16,592***
4 horas .....	7,273***	8,633***	10,692***	12,597***
6 horas .....	3,445*	6,386***	11,190***	17,297***
18 horas .....	3,681**	5,081***	6,385***	6,654***
24 horas .....	2,143	0,076	0,677	17,582***
48 horas .....	4,969***		4,653***	10,771***

\* Nivel de significación superior al 95 % ( $p < 0,05$ ).

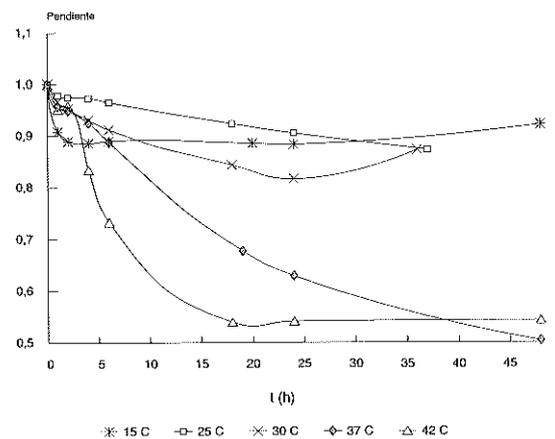
\*\* Nivel de significación superior al 99 % ( $p < 0,01$ ).

\*\*\* Nivel de significación superior al 99,9 % ( $p < 0,001$ ).

que en las comparaciones entre otras temperaturas. De igual manera, en las comparaciones realizadas a las 24 horas no se manifiestan diferencias salvo en la comparación entre 37 y 42 grados centígrados.

La Figura 2 nos muestra la representación gráfica de los valores de las pendientes correspondientes a los ensayos realizados en el tampón a los distintos tiempos y temperaturas. Vemos en ella que también se produce un hecho similar durante la primera hora de termostatación, aunque es menor, en términos generales, al que se producía en plasma. A partir de este momento el comportamiento es diferente, y casi contrario, al que se producía en el plasma ya que los procesos son proporcionales a las temperaturas, siendo mayores a 37 y 42 grados y menores a las temperaturas más bajas.

La Tabla 4 recoge los valores de la «t de Student» entre las pendientes a las distintas



**Figura 2.**—Valores de las pendientes frente al tiempo en los ensayos realizados en tampón a las diferentes temperaturas.

**Tabla IV.**—Valores de la «t de Student» obtenidos de la comparación de las pendientes entre los ensayos en tampón y en plasma a los mismos tiempos y temperaturas

Comparación 15°C 25°C 30°C 37°C 42°C

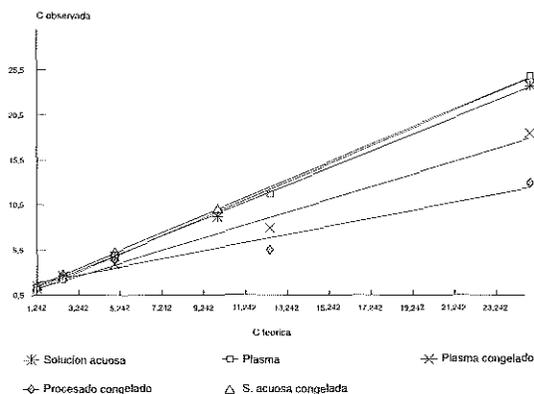
Inicial .....	0,611	0,597	0,031	0,410	1,351
1 .....	2,110	6,160***	3,371**	10,882***	0,432
2 .....	5,843***	4,529***	1,494	14,087***	1,860
4 .....	11,429***	3,983**	1,500	6,726***	6,372***
6 .....	5,371***	3,995**	1,972	4,547***	10,336***
18 .....	16,244***	3,712**	0,893	1,975	29,389***
24 .....	3,815**	2,964*	0,064	2,711*	36,664***
48 .....	12,682***	2,541*	0,441	9,905***	31,801***

\* Nivel de significación superior al 95 % ( $p < 0,05$ ).

\*\* Nivel de significación superior al 99 % ( $p < 0,01$ ).

\*\*\* Nivel de significación superior al 99,9 % ( $p < 0,001$ ).

horas y tiempos entre los ensayos en plasma y en tampón. En ella observamos que la comparación realizada a tiempo cero no muestra diferencias como era de esperar, en tanto que en la comparación realizada a la primera hora de termostatación ya manifiesta diferencias significativas a 25, 30 y 37°C. A partir de la comparación realizada a las dos horas se aprecian diferencias significativas prácticamente en todos los casos salvo a 30°C que no muestra ninguna diferencia más y en las comparaciones realizadas a 42°C en la segunda hora y a 37°C en la decimotava hora de termostatación. Finalmente, en la Figura 3 y la Tabla 5 se muestran los valores correspondiente al ensayo realizado con las soluciones sometidas a congelación durante 5 meses y a las determinaciones iniciales en el momento de la preparación. Observamos que los valores correspondientes a la solución acuosa, iniciales y tras la congelación, son muy similares, aunque cuando realizamos la comparación de sus pendientes mediante la «t de Student», obtenemos un valor de 3,117 cuyo nivel de significación es del 95 % ( $p < 0,05$ ). Diferencias mayores se observan en las series de plasma bovino. En ambos casos existe una pérdida aparente de OTC tras la congelación, aunque ésta es diferente según se trate de los plasmas congelados y después procesados o bien de aquellos que se desproteinizaron antes de la congelación.



**Figura 3.**—Valores de concentración de las distintas series en el ensayo realizado a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

En todos los casos hemos obtenido valores altamente significativos ( $p < 0,001$ ) en la comparación de las pendientes mediante la «t de Student».

## DISCUSION

Como método de determinación y cuantificación de la OTC hemos empleado el método espectrofotométrico basado en el máximo de absorción que presenta este antibiótico a 352 nanómetros. Ello nos permite realizar la determinación de manera directa sobre el plasma o la matriz líquida que contenga al antibiótico en solución, lo que es de suma importancia ya que los métodos fluorimétricos o cromatográficos producen modificaciones del medio matriz como precipitaciones y fuertes cambios de

**Tabla V.**—Valores de concentración milimolar de oxitetraciclina, medidas por HPLC, en solución acuosa y en plasma, iniciales y tras congelación a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 5 meses

	INICIALES		CONGELADOS		
	Solución acuosa	Plasma	Solución acuosa	Plasma	
				entero	desproteín.
50,00 .....	47,81	50,02	49,64	37,04	25,89
25,00 .....		23,47		15,90	11,03
20,00 .....	18,54		20,29		
10,00 .....	9,74	10,06	10,73	7,97	9,20
5,00 .....	5,29	4,55	5,19	5,13	5,54
2,50 .....	63,04	2,62	3,10	2,50	2,60

pH, o del antibiótico como transformaciones en epitetraclinas y otros derivados. Con la determinación espectrofotométrica directa no ocurren estos cambios (salvo la posible interacción entre matriz y antibiótico) ya que dicha matriz no se somete a ningún procedimiento químico que la modifique como en los procedimientos anteriores. Otro hecho importante es que la lectura se realiza de manera inmediata y no requiere espacios de tiempo más o menos largos que puedan dar lugar a diferencias. Estas diferencias pueden ser debidas, en ocasiones, a los tiempos variables que se necesitan para procesamiento de las diferentes muestras según el orden que se siga en dicho procesamiento, o bien porque puedan originar incluso procesos de desnaturalización de la matriz o del antibiótico como puede ocurrir con los métodos microbiológicos que requieren la permanencia del antibiótico en un medio acuoso, a una temperatura y durante un tiempo determinados (generalmente  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas al menos). En estas circunstancias, el deterioro o desnaturalización de los antibióticos del grupo de las tetraciclina en solución acuosa en función de la temperatura del ensayo ya fue puesto de manifiesto por diferentes autores (2, 10, 7). Vemos pues que cualquiera de los métodos citados, puede conllevar procesos que modifiquen la medida de la concentración o de la actividad del antibiótico, si bien la medición espectrofotométrica directa parece sobrevalorar la concentración cuando ésta es baja. No obstante, esta sobreva-

loración, consecuencia de un aumento de la absorción de luz debido a posibles reacciones entre OTC y componentes de la matriz plasmática, no debe ser un parámetro a considerar, sino que, por el contrario, creemos que la disminución de la pendiente es el parámetro a utilizar como medida de la pérdida de concentración o de actividad global de la OTC por ser proporcional a la absorción molar del producto. La disminución de la pendiente con respecto a la medición inicial es próxima, en todos los casos, al 80 %. No menos importante, y que además no se puede valorar, es la respuesta al interrogante que surge inmediatamente después de la observación de los resultados: ¿Ocurren estas modificaciones de la OTC también «in vivo»? por el momento no tenemos respuesta y no sabemos por tanto si estas posibles modificaciones se suman a las que se producen de carácter farmacocinético. Regna y Solomons (6) señalan que en el proceso de desnaturalización de la oxitetraciclina al representar la concentración del antibiótico en función del tiempo se obtiene una gráfica que puede linealizarse al ser representada en papel semilogarítmico. Nosotros no hemos podido demostrar esta aseveración ya que si bien los coeficientes de correlación lineal son mayores en la regresión exponencial que en la directa, en ambos casos fueron bastante bajos. Esta circunstancia también se nos manifestó en pruebas previas en las que se mantuvo la OTC en solución acuosa hasta 4 días.

En síntesis, podemos indicar que en los ensayos realizados a temperaturas superiores al punto de congelación parece ser que el proceso de desnaturalización de la OTC en plasma es tanto más intenso cuanto menor es la temperatura, hecho contrario al que se produce en la solución acuosa tamponada. También la desnaturalización parece ser proporcional al grado de concentración del antibiótico, ya que ésta es tanto mayor cuanto más elevada es la concentración de la OTC. Todo ello puede ser debido a que se favorecen las posibles interacciones entre la OTC y el plasma bovino con la temperatura y se obtienen lecturas de absorbancia más elevadas a las temperaturas más altas, dando la apariencia, cuando relacionamos las pendientes con la desnaturalización, del hecho antes citado, el cual no se produce en tampón por carecer éste de proteínas y otros componentes presentes en plasma. Cuando se procede a la determinación por HPLC tras la congelación de las muestras de plasma o desproteinizados de esta matriz, incluso durante períodos de hasta varios meses, se observa que la desnaturalización también es mayor que en soluciones acuosas más simples, si bien hemos observado en todos los ensayos realizados que a las concentraciones más bajas se encuentran porcentajes de recuperación más elevados, incluso superiores al 100 %, mientras que en las concentraciones mayores los porcentajes de recuperación son menores y próximos al 70 %.

En consecuencia, dado que en la mayoría de los casos las concentraciones que se suelen encontrar en el plasma de los animales tratados son incluso inferiores a las más bajas empleadas por nosotros y por el hecho de que a temperaturas ambientales los procesos de desnaturalización se producen principalmente en los primeros momentos, no estimamos que se deban modificar las condiciones de almacenamiento de las matrices en las que de determina normal-

mente dicho antibiótico, congeladas a 18-20°C bajo cero ya que los tiempos iniciales desde la extracción de sangre hasta la congelación de los plasma no pueden reducirse.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) BLISS, E.A.; CHANDLER, C.A. (1948): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **69**: 467. [Citado por: Womack, C.R. et al (5)].
- (2) DORNBUSH, A.C.; PELCAK, E.J. (1948): The determination of aureomycin in serum and other body fluids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**: 218-220.
- (3) PAINE, T.F. Jr.; COLLINS, H.S.; FINLAND, M. (1948): *J. Bacteriol.* **56**: 489. [Citado por: Womack, C.R. (5)].
- (4) PRICE, C.W.; RANDALL, W.A.; WELCH, H. (1948): *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**: 211. [Citado por: Womack, C.R. (5)].
- (5) WOMACK, C.R.; KAAS, E.H.; MELLIS, E.B.; FINLAND, M. (1949): A substance in egg yolk which inhibits deterioration of aureomycin activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **72**: 706-708.
- (6) REGNA, P.P.; SOLOMONS, I.A. (1950-51): The chemical and physical properties of terramycin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **53**: 229-237.
- (7) FINLAND, M.; PURCELL, E.M.; WRIGHT, S.S.; DELLOVE, B. Jr.; MOV, T.W. (1954): Clinical and laboratory observations of a new antibiotic, tetracyclin. *J. A. M. A.* **154**: 561-568.
- (8) SPORNS, P.; KWAN, S.; ROTH, L.A. (1986): HPLC analysis of oxytetracycline residues in honey. *J. Food Protection*, **49**:5, 383-388.
- (9) ZIV, G.; SULMAN, F. (1975): Absorption of antibiotics by the bovine udder. *J. Dairy Sci.* **58**: 1637-1644.
- (10) WOMACK, C.R.; KAAS, E.H.; FINLAND, M. (1950): Further observations on a substance in egg yolk which protects aureomycin from deterioration. *J. Lab. Clin. Med.* **36**: 655-659.
- (11) KNOX, J.H.; JURAND, J. (1979): Mechanism of reverse-phase separation of tetracyclines by High-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **168**: 763-782.
- (12) SUPELCO. (1986): Isocratic analysis of Tetracycline antibiotics using a Supelcosil LC-18-DB HPLC column. *HPLC Bulletin* **834**.
- (13) McELROY, D.E.; RAVIS, W.R.; CLARK, C.H. (1987): Pharmacokinetics of oxitetracycline hydrochloride in rabbits. *Am. J. Vet. Res.* **48**: 1261-1263.