



## PREMIO A LA INVESTIGACIÓN 2006

### DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO BASADO EN LA EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS FLUOROQUINOLONAS EN HUEVOS

S. Herranz, M.C. Moreno-Bondi and M.D. Marazuela\*

Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas. Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain.

\* Contacto:

Dr. María Dolores Marazuela  
Departamento de Química Analítica .  
Universidad Complutense de Madrid  
E-28040 Madrid, Spain  
Teléfono: 91 394 4322  
Fax: 91 394 4329

e-mail: [marazuela@quim.ucm.es](mailto:marazuela@quim.ucm.es)

## 1. Introducción.

El empleo rutinario de antibióticos de uso veterinario, para el tratamiento o la prevención de enfermedades, o como promotores del crecimiento de animales sometidos a cría intensiva, representa un riesgo potencial para los consumidores. Existe la posibilidad y en algunos casos la evidencia, de que aparezcan residuos de antibióticos en tejidos o productos animales que a su vez comporten riesgos sanitarios, tales como alergias, resistencias bacterianas, etc. Este riesgo aumenta en el caso de que el medicamento, la dosis o el modo de administración empleado no sean los adecuados. Los tratamientos aplicados deben incluir un periodo de espera durante el cual el organismo del animal elimina los residuos del fármaco administrado. Si no se respeta dicho periodo de espera, aparecerán residuos de estos medicamentos, por ejemplo en la carne, la leche o los huevos producidos por el animal, que posteriormente pueden pasar al organismo del consumidor. Este tipo de contaminación entraña un segundo riesgo adicional, puesto que muchos de los antibióticos de uso veterinario conservan su capacidad farmacológica en el ser humano tras el consumo de los productos contaminados derivados. El resultado final es que los microorganismos que conviven con nosotros generan resistencias, de forma que en caso de infección puede llegar a ser muy difícil erradicarlos con los tratamientos habituales.

Una de las familias de antibióticos de uso veterinario más empleada es la familia de las fluoroquinolonas (FQs) (ver Anexo II, Figura 1): antibióticos con un amplio espectro de acción hacia microorganismos, tanto Gram(+) como Gram(-) que presentan además carácter bactericida y provocan una resistencia limitada [1,2].

En España, desde la aprobación de las FQs para uso veterinario (ENRO, 1990) se emplean para el tratamiento de neumonías en terneros y lechones, e infecciones alimentarias en aves de corral [3]. Uno de estos antibióticos es la **enrofloxacina** (ENRO) cuyo metabolito, la **ciprofloxacina** (CIPRO), aparece también como residuo en animales tratados con enrofloxacina, debido a la transformación bioquímica de la misma y ésta última se utiliza en medicina en el tratamiento de otitis, infecciones de orina, etc [4]. El incremento de la demanda de ENRO y su uso desmedido ha originado un aumento espectacular de los casos de resistencia a FQs por infecciones de *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* y *E. coli* que se ha hecho especialmente grave en el caso de las aves de corral, debido a la amplia utilización de las FQs en la producción avícola. La Unión Europea ha establecido en su Reglamento 2377/90 [5] y sucesivas modificaciones, los límites máximos de residuos (LMRs) para las FQs de uso veterinario en diferentes tejidos y

productos animales. Sin embargo, en el caso de los huevos, la legislación no ha establecido los LMRs, por lo que el reglamento 1181/2006 [6] prohíbe su empleo en las aves ponedoras, lo que no evita su uso fraudulento siendo necesario un control rutinario que garantice su cumplimiento.

Debido a la importancia del tema, el presente trabajo tiene como objetivos:

- 1) Desarrollo de un **método analítico sencillo, sensible y selectivo** que permita realizar los controles sistemáticos de estos antibióticos en huevos y comprobar, en su caso, el cumplimiento de los periodos de espera.
- 2) Evaluar en qué grado y cuanto tiempo **persisten los residuos de enrofloxacin (ENRO)** y su metabolito **ciprofloxacina (CIPRO)** en los huevos procedentes de gallinas tratadas con el medicamento veterinario HIPRALONA ENRO S (10 % ENRO), con objeto de establecer los periodos de supresión.

En este trabajo se describe la optimización y validación de un método analítico, basado en el empleo de la técnica de **extracción con disolventes presurizados (PLE)** y posterior análisis cromatográfico con detección fluorescente (HPLC-FLD) [7] para su aplicación a la detección y cuantificación de residuos de ENRO, CIPRO y sarafloxacin (SARA) en huevos. Asimismo, se ha evaluado la velocidad de depleción de estos residuos en huevos de gallinas tratadas con ENRO, con objeto de establecer los periodos de espera que se han de respetar tras el tratamiento con el medicamento.

## **2. Experimental.**

### **2.1. Reactivos y materiales.**

- Acetonitrilo y metanol (HPLC), (SDS).
- Ácido ortofosfórico (HPLC, 85 %), (Fluka).
- Hidrocloruro de ciprofloxacina (CIPRO, 99.8 %), (Bayer AG).
- Enrofloxacin (ENRO 99.7 %), (Bayer AG).
- Sarafloxacin (SARA, 90 %), (Fort Dodge Veterinaria, S.A.).
- Lomefloxacin (LOME), (Sigma-Aldrich).
- Arena de cuarzo (Sigma-Aldrich).
- Tierra de diatomea (Isolute HM-N-Sorbent, Symta).
- Agua, purificada con un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA).
- Filtros de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ , 47 mm (Phenomenex).

Todas las disoluciones preparadas para HPLC se filtraron con los filtros de nylon antes de usarse. Las estructuras químicas de las FQs incluidas en este trabajo se muestran en la Figura 2 (Anexo II).

### **2.2. Instrumentación.**

Las muestras de huevo se homogeneizaron empleando una batidora IKA M 20 (Dismadel S.L). Para llevar a cabo la extracción mediante la técnica PLE se empleó un equipo ASE 200 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) provisto de células de extracción de acero inoxidable de 11 mL, con filtros de fibra de vidrio de Dionex (Grade GF/B part. No 047017) en su extremo inferior. Los extractos se recogieron en viales de 40 mL. El sistema cromatográfico estaba formado por un cromatógrafo HP-1100 de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipado con una bomba cuaternaria, un degasificador, portamuestras, inyector automático y detector de fluorescencia (FLD). Para concentrar los extractos se utilizó un evaporador TurboVap LV (Zymark, Hopkinton, MA).

### **2.3. Disoluciones patrón.**

Se prepararon disoluciones individuales de cada una de las FQs, de concentración 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en metanol, teniendo en cuenta la pureza de los patrones. Estas disoluciones se almacenaron a 4 °C protegidas de la luz, durante un periodo de tiempo no superior a los 30 días. Para la cuantificación de los extractos durante la optimización del método, se

construyeron curvas de calibrado a partir de extractos de muestra control (2 mL) enriquecidas con las FQs objetivo, en un intervalo de concentraciones de 10 a 300 ng mL<sup>-1</sup>. Para los estudios de recuperación, se enriquecieron muestras de huevo control, previamente homogeneizadas, (2 g) con cantidades de las disoluciones patrón de las FQs, en un intervalo de 50 a 1000 ng g<sup>-1</sup>. Como patrón interno se empleó lomefloxacina (LOME), a una concentración de 500 ng g<sup>-1</sup>.

#### **2.4. Extracción de las muestras mediante la técnica PLE.**

En primer lugar, se procedió a homogeneizar la muestra de huevo utilizando una batidora IKA M 20. A continuación se mezclaron minuciosamente dos gramos del homogeneizado de huevo con la hidromatriz, con el objeto de impedir la compactación de la matriz durante la extracción y facilitar el contacto del disolvente con la muestra. La mezcla se trasvasó a células de extracción de acero inoxidable de 11 mL, provistas de filtros de fibra de vidrio. Se probaron dos hidromatrices: arena de cuarzo (8 g) y tierra de diatomea (2 g). Las condiciones óptimas de extracción se muestran en la Tabla 1 (Anexo I).

Tras la extracción, el extracto de aproximadamente 16 mL, se enrasó a un volumen final de 20 mL, y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio, para eliminar los lípidos y las proteínas co-extraídas. De los extractos obtenidos, se evaporaron alícuotas de 5 mL a una temperatura de 60 °C, hasta sequedad, y posteriormente el residuo se redisolvió en 2 mL de la fase móvil empleando agitación con Vortex. Finalmente, se inyectaron 8 µL del extracto en el cromatógrafo para la separación y análisis cromatográfico.

#### **2.5. Análisis cromatográfico.**

La separación cromatográfica de las FQs se llevó a cabo empleando una columna AQUA™ C<sub>18</sub> (250 x 4.6 mm, 5 µm), conectada por una precolumna RP18 (4.0 x 3.0 mm, 5 µm), ambas de Phenomenex (Torrance, CA, USA). La separación se llevó a cabo utilizando un programa de gradiente, combinando un disolvente A (ácido ortofosfórico 25 mM ajustado a pH 3.0 con NaOH) y un disolvente B (acetonitrilo), como se indica a continuación: 18 % B (4 min), 18 – 37 % B (8 min), 37 % B (1 min), 37 – 18 % B (2 min). El caudal empleado fue de 1 mL min<sup>-1</sup> y el volumen de inyección, 8 µL. Las longitudes de onda de excitación y emisión de fluorescencia fueron 280/440 nm, respectivamente.

## **2.6. Análisis de muestras de huevos contaminados.**

Para el estudio se seleccionaron un total de seis gallinas, que se trataron con el medicamento veterinario Hipralona Enro S, que contiene un 10% del antibiótico enrofloxacina. El medicamento se administró a las gallinas con el agua de bebida, durante cuatro días consecutivos, empleando una dosis de  $1 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$  de agua. Los huevos (uno por gallina y día) se recogieron durante los veinte días posteriores al inicio del tratamiento.

Posteriormente, los seis huevos de un mismo día se dividieron en tres lotes de dos unidades. Se procedió a la homogeneización de los lotes y a continuación se prepararon seis submuestras de cada lote mezclando cuidadosamente alrededor de 2 g del homogeneizado de huevo (pesados con una precisión de 0.1 mg) con 2 g de la hidromatriz (tierra de diatomea). Las muestras así preparadas se almacenaron en la oscuridad a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

El análisis de cada lote de muestras se realizó por triplicado, siguiendo el procedimiento descrito en las secciones 2.4 y 2.5. En cada serie de análisis se incluyó una muestra control, muestra de huevo control fortificada con una concentración conocida de las FQs, a la que se sometió al proceso de extracción, detección y cuantificación completo para garantizar la calidad del análisis.

### **3. Resultados y discusión**

#### **3.1. Optimización del proceso de extracción.**

La técnica de extracción con disolventes presurizados (PLE) combina la extracción con disolventes a temperaturas y a presiones elevadas, para extraer rápida y eficazmente analitos de matrices sólidas [8]. La utilización de disolventes líquidos en estas condiciones de temperatura y presión mejora el rendimiento de la extracción frente a las realizadas a presión atmosférica y temperatura ambiente ya que: (a) se incrementa la solubilidad y se mejora la transferencia de masa y (b) se facilita la ruptura del equilibrio superficial analito-matriz. Esta técnica ha conseguido una rápida aceptación ya que proporciona extracciones cuantitativas con tiempos de extracción muy cortos. Es, además, una técnica sencilla de aprender y aplicar en los laboratorios.

Se realizaron estudios iniciales para evaluar la influencia de los parámetros que afectan en mayor medida al proceso de extracción PLE: naturaleza del disolvente, temperatura y número de ciclos de extracción, con el propósito de encontrar las condiciones más adecuadas para la extracción de las FQs. Además de éstos, también se evaluaron otros factores relacionados con el pretratamiento de la muestra que pueden afectar al proceso de extracción PLE (p.e. el tipo de hidromatriz).

##### *a) Naturaleza del disolvente de extracción.*

La elección del disolvente de extracción dependerá: 1) de su capacidad para extraer los analitos de interés, minimizando la coextracción de otros componentes de la matriz y 2) de la compatibilidad del mismo con las etapas posteriores del análisis (p.e. preconcentración y análisis cromatográfico).

Así, se han ensayado diferentes disolventes orgánicos, puros (metanol, acetonitrilo) o combinados con mezclas acuosas para la extracción de los antibióticos de la matriz de huevo. Los resultados obtenidos en función de la mezcla de extracción se muestran en la Tabla 2 (Anexo I).

La optimización se realizó empleando tres réplicas de muestras de huevo fortificadas a una concentración de  $1.25 \mu\text{g g}^{-1}$  a las que se sometió al proceso analítico completo. La eficacia del proceso de extracción (R, %) se calculó a partir del área de los picos cromatográficos de las muestras de huevo fortificadas y de los calibrados preparados

inyectando en el sistema cromatográfico extractos de la matriz de huevo enriquecidos con concentraciones conocidas de los patrones de las FQs. Los disolventes orgánicos puros, como el acetonitrilo o el metanol, así como la mezcla de tampón fosfato 50 mM pH 3.0/metanol dan lugar a una extracción insuficiente de las FQs de la matriz de huevo (Tabla 2). Sin embargo, la mezcla acetonitrilo/tampón fosfato 50 mM pH 3.0 (50:50, v/v) resultó ser la más eficaz para la extracción de las FQs objetivo, como ya han señalado otros autores para otro tipo de matrices [9-11]. Dado que las FQs presentan valores de  $pK_a$  ( $pK_{a1} = 5.5 - 6.0$ ,  $pK_{a2} = 7.5 - 8.5$ ) [12], se encuentran en forma de zwitteriones a pH neutro, dificultando su extracción en un disolvente polar, como el acetonitrilo. Sin embargo, en las condiciones ácidas empleadas (acetonitrilo/tampón fosfato 50 mM pH 3.0) aumenta la solubilidad de las FQs al encontrarse en forma catiónica. Otros ácidos fuertes (como el ácido clorhídrico o el ácido nítrico) no se pueden utilizar en el proceso de extracción PLE, porque a elevadas temperaturas pueden oxidar el acero de las células de extracción. Por consiguiente, se eligió como medio de extracción la mezcla de tampón fosfato 50 mM pH 3.0/acetonitrilo (50:50, v/v) porque proporcionaba los extractos más limpios y resultados más precisos. Un incremento del porcentaje de fase acuosa del 50 al 70 %, originó extractos más turbios, dando lugar a problemas en la manipulación de la muestra y por tanto, peor precisión por lo cual se desestimó su empleo.

#### *b) Selección de la hidromatriz.*

La extracción PLE a menudo requiere la dispersión de la muestra con un material inerte que: (1) evite la formación de agregados, previniendo el posible bloqueo de la célula de extracción y (2) proporcione una gran superficie de exposición y por tanto, un mejor contacto entre el disolvente de extracción y la matriz. Con este objetivo, los agentes de dispersión empleados habitualmente en extracción PLE han sido la tierra de diatomeas y la arena de cuarzo [9]. Para evaluar la probable interacción entre la hidromatriz y las FQs se adicionaron los antibióticos directamente sobre la hidromatriz (arena de cuarzo o tierra de diatomeas) y se realizó la extracción por triplicado, empleando las condiciones experimentales indicadas en la Tabla 1 (Anexo I). En todos los casos las recuperaciones obtenidas fueron mayores del 88 %, asegurándose así que las pérdidas de analito no se deben a la adsorción de las FQs en la hidromatriz. Sin embargo, cuando se realizó la extracción de las muestras fortificadas, las recuperaciones obtenidas fueron del 74 – 88 % (RSD = 3 – 10 %, n = 3) al utilizar tierra de diatomea, y entre 39 – 42 % (RSD =

3 – 13 %, n = 3) con arena de cuarzo. Esto se debe a la mayor capacidad de absorción que presenta la tierra de diatomeas, relacionada con la mayor porosidad de este material, que mejora el contacto de la muestra con el disolvente y aumenta la eficacia de extracción. De hecho, fue suficiente el empleo de 1 g de tierra de diatomea por gramo de muestra, frente a los 4 g requeridos en el caso de utilizar arena de cuarzo.

*c) Selección de la temperatura de extracción.*

El efecto de la temperatura de extracción en la recuperación de las FQs objetivo se evaluó en el intervalo entre 60 y 80 °C (Figura 3). No se han observado evidencias de degradación térmica de las FQs a esas temperaturas ni a temperaturas superiores [14]. Sin embargo, el empleo de temperaturas más altas (100 °C), favorece la extracción de gran cantidad de matriz soluble en medio orgánico y los extractos son demasiado turbios e insolubles en la fase móvil. Además, se debe evitar la utilización de temperaturas superiores a los 100 °C cuando se emplea ácido fosfórico, para prevenir la oxidación de la célula de extracción [15]. En el intervalo de temperaturas de 60 – 80 °C se obtuvieron recuperaciones del 69 – 82 % (RSD = 4 – 12 %; n = 3). La turbidez de los extractos fue en aumento al incrementar la temperatura de extracción (60 °C < 70 °C < 80 °C). Por otra parte, los resultados obtenidos a 60 °C muestran menor precisión, con valores de RSD entre 5 – 12 %. Por tanto, se eligió una temperatura de 70 °C para las extracciones restantes, como compromiso entre la eficacia de extracción (R, %), la precisión y los componentes co-extraídos de la matriz.

*d) Número de ciclos de extracción.*

Al investigar el efecto del número de ciclos sobre la eficacia de extracción de las FQs de la matriz de huevo, se aumentó el número de ciclos de extracción de dos a cuatro, manteniendo cinco minutos de tiempo estático por cada ciclo (Figura 4, Anexo II). En general, el empleo de varios ciclos de extracción facilita la exposición de la muestra a nuevas porciones de disolvente, favoreciendo el equilibrio disolvente/muestra e incrementando así la recuperación de analito. En el caso particular que nos ocupa, el número de ciclos no juega un papel demasiado importante en la eficacia de extracción, ya que no se han encontrado diferencias significativas en los R % obtenidos (70 – 78 %, RSD = 2 – 7 %, n = 4) aplicando dos, tres o cuatro ciclos. Así, se seleccionó un total de tres ciclos de extracción (3 ciclos, 5 min cada uno) para asegurar la máxima recuperación, incluso en el análisis de muestras de huevos contaminados, que en ocasiones

pueden ser más problemáticos que las muestras fortificadas por las diferencias en las interacciones analito-matriz.

### **3.2. Validación del método.**

Para la validación del método se han seguido los criterios especificados en la Directiva Europea 2002/657/EC [16], en relación a las características de los métodos analíticos para el análisis de residuos de medicamentos veterinarios.

Entre los parámetros del método que hay que evaluar se encuentran la especificidad, recuperación, límite de decisión ( $CC\alpha$ ), capacidad de detección ( $CC\beta$ ), precisión y exactitud. Teniendo en cuenta estos parámetros, se procedió a llevar a cabo un estudio detallado de las características analíticas del método propuesto, para su validación y futura aplicación en el control sistemático de los residuos de FQs en muestras de huevo.

Para determinar la especificidad del método se analizaron extractos de muestras de huevo control, no observándose en los cromatogramas obtenidos ninguna interferencia de la matriz a los tiempos de retención a los que aparecen las FQs (Figura 5, Anexo II) lo que demuestra la especificidad del método propuesto. Por otra parte, para evaluar la recuperación, precisión y repetibilidad del método, se analizaron muestras control de huevo fortificadas a tres niveles de concentración (50, 200 y 600 ng g<sup>-1</sup>; n = 4) empleando el método analítico descrito. Los resultados se muestran en la Tabla 4 (Anexo I).

Se obtuvieron recuperaciones entre 66 – 89 % para las FQs a todos los niveles de concentración ensayados con RSDs inferiores al 9 %. Del mismo modo, la recuperación del patrón interno (LOME) empleando muestras de huevos fortificadas a un nivel de concentración de 500 ng g<sup>-1</sup> fue de (75 ± 10) %. Para determinar la linealidad y la reproducibilidad del método analítico completo, se enriquecieron muestras de huevo control con concentraciones de FQs comprendidas entre 50 – 1000 ng g<sup>-1</sup>, añadiendo además 500 ng g<sup>-1</sup> del patrón interno (LOME). Se repitieron los análisis en tres días diferentes empleando el proceso descrito en los apartados 2.4 y 2.5. En este caso, el extracto final se redisolvió en 1 mL de fase móvil en lugar de los 2 mL empleados durante la optimización de las variables experimentales de la extracción, con el objetivo de aumentar así la sensibilidad. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5 (Anexo I).

No se observaron diferencias significativas en las pendientes de los calibrados obtenidos para cada analito en días diferentes. Se consiguió una reproducibilidad excelente

con recuperaciones entre el 68 – 88 % para ENRO, 67 – 90 % para CIPRO y 71 – 87 % para SARA, y valores de RSD inferiores al 11 % en todos los casos. Basándonos en los criterios de la Directiva Europea [16] se obtuvieron límites de decisión ( $CC\alpha$ ) entre 17 – 24 ng g<sup>-1</sup> y valores de capacidad de detección ( $CC\beta$ ) entre 29 – 41 ng g<sup>-1</sup> para las distintas FQs estudiadas.

### **3.3. Análisis de muestras de huevos contaminados.**

Las muestras, preparadas como se indicó en la sección 2.6, se fortificaron con 500 ng g<sup>-1</sup> del patrón interno (LOME) antes de proceder a su análisis. Tras su estabilización se analizaron por triplicado, siguiendo el procedimiento descrito en los apartados 2.4 y 2.5. En este caso, los extractos finales se reconstituyeron en 1 mL de fase móvil, y se llevaron a cabo las diluciones oportunas de forma que las concentraciones se calcularon a partir de las rectas de calibrado mostradas en la Tabla 5 (Anexo I). En la Figura 6 (Anexo II) se observan los resultados obtenidos tras el análisis de las muestras. Los residuos de ENRO encontrados alcanzaron concentraciones máximas superiores a los 2000 ng g<sup>-1</sup> entre los días 3 – 6, con una concentración máxima en el quinto día tras el inicio del tratamiento, superior a los 3000 ng g<sup>-1</sup>. Además de los residuos de ENRO, aparecen residuos de su metabolito activo, CIPRO a las 24 h del inicio del tratamiento (aunque en cantidades inferiores), alcanzando una concentración máxima el sexto día, superior a los 200 ng g<sup>-1</sup>. El contenido en CIPRO deja de ser cuantificable el día 14, mientras que el contenido en ENRO es cuantificable hasta el día 15.

Durante el análisis de las muestras de huevo contaminadas se incluyó una muestra control (muestra de huevo control fortificada con una concentración de FQs conocida) en cada serie de análisis. No se observaron diferencias significativas entre la concentración de fortificación y la concentración estimada mediante el proceso de análisis descrito, lo que supone una garantía de la fiabilidad de los resultados obtenidos mediante este proceso de análisis.

#### 4. Conclusiones.

Este trabajo presenta por primera vez la aplicación de la técnica PLE para la extracción de tres FQs en muestras de huevo, obteniendo recuperaciones comparables a los métodos de extracción más comúnmente empleados, pero sin necesidad de un proceso de limpieza de muestra tras la extracción previa al análisis cromatográfico. La versatilidad de la técnica PLE, respecto a la gran variedad de analitos y matrices para las que se puede aplicar, así como el alto grado de automatización, que reduce considerablemente la manipulación de la muestra, hace de ella una técnica prometedora y óptima para este tipo de análisis. La optimización del proceso de extracción PLE proporciona buenos valores de precisión y exactitud al elegir como medio de extracción la mezcla acetonitrilo/tampón fosfato 50 mM, pH 3 (50:50, v/v), que conduce a las mayores recuperaciones, y a los extractos más limpios. La temperatura y el tiempo no juegan un papel tan importante en la eficacia de extracción; sin embargo, al aumentar la temperatura de 60 a 80 °C se observa un aumento de la turbidez de los extractos. Los límites de decisión ( $CC_{\alpha}$ ) entre 17 – 24 ng g<sup>-1</sup> y valores de capacidad de detección ( $CC_{\beta}$ ) entre 29 – 41 ng g<sup>-1</sup> obtenidos para las distintas FQs estudiadas demuestran que el método puede resultar útil para la determinación de residuos de FQs en huevos contaminados y como método de cribado para detectar el posible uso ilegal de FQs en gallinas ponedoras. Además, se ha aplicado la metodología desarrollada para la realización de un estudio de depleción de residuos de estos antibióticos en huevos de gallinas, tratadas con un medicamento específico para uso veterinario: la Hipralona Enro S (solución con un contenido del 10 % en ENRO), indicada para el tratamiento de pollos (Colibacilosis, Salmonelosis y Micoplasmosis) y conejos (pasteurelisis). A partir de este estudio se han determinado los niveles de concentración alcanzados durante el tratamiento y en los días posteriores tras la finalización del mismo. Se observó que el contenido máximo de ENRO, superior a los 3000 ng g<sup>-1</sup>, se alcanza el quinto día tras el inicio del tratamiento, encontrándose la máxima concentración de su metabolito CIPRO (mayor de 200 ng g<sup>-1</sup>), en el sexto día tras el inicio del tratamiento. Por último, a la vista de los resultados, se podría concluir que el periodo de espera que se ha de respetar antes de la comercialización de los huevos procedentes de gallinas tratadas con este medicamento debería ser de, al menos, 15 días lo que hace económicamente inviable el uso de este medicamento para el tratamiento de gallinas ponedoras.

### **Agradecimientos.**

Los autores agradecen al M<sup>o</sup> de Educación y Ciencia (Proyecto ref BQU 2002-04515-C02-01) y a la Comunidad de Madrid (Proyecto ref. S-0505/AMB/0374) por la financiación recibida, y a las compañías farmacéuticas BAYER (Alemania) y Fort Dodge Veterinaria (Girona, España) por suministrarnos los compuestos de referencia ENRO, CIPRO y SARA. Finalmente quisiéramos agradecer al veterinario D. Ramón Puig, toda la colaboración prestada durante el estudio con gallinas ponedoras y por proporcionarnos los huevos contaminados analizados en este trabajo.