

01672 2g¹



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FARMACOCINETICA SERICA Y DE RESIDUOS EN VACAS
LECHERAS CON UNA NUEVA MOLECULA DE LA FAMILIA
DE LAS CEFALOSPORINAS
(CQMEPCA)

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS
PRESENTADO POR
M.V.Z. SOFIA MACOUZET GARCIA



ASESOR
DR. HECTOR SUMANO LOPEZ

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II

270566



Universidad Nacional
Autónoma de México

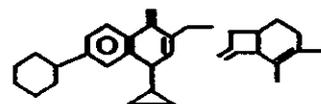


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

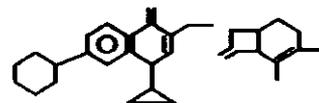


DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario, siempre y cuando se le otorgue el crédito a los autores, colaboradores y a la institución.



SOFÍA MACOUZET GARCÍA



DEDICATORIA

A ti **Señor** que me diste la vida y me acompañas en todo momento.

A mis **Papás, hermanos, mi novio y su familia** que siempre me han apoyado.

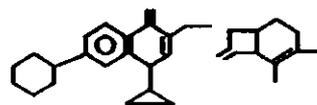
Al **Dr. Arturo Olguín**, porque además de ser mi maestro, amigo y parte de mi jurado, siempre me escucha y tiene una palabra de aliento que me ayuda.

Con mucho cariño y agradecimiento a mis amigos **Sergio, Mariza, y Carmen** que colaboraron incondicionalmente conmigo cuando más ayuda necesité.

Al **Dr. Alejandro Bate**, gracias por creer y confiar en mi, y me disculpo por no haber podido corresponder a su apoyo.

Muy especialmente, y con la más ferviente admiración y cariño, al **Dr. Luis Ocampo** por impulsarme y velar cada paso en mi desempeño personal, profesional y académico.

A mi **perro montana** que todo me perdona y que siempre está conmigo.



AGRADECIMIENTOS

Con mucho cariño a la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**, por toda la enseñanza que me han dado para aprender a vivir.

A la **División de Estudios de Posgrado e Investigación** de la FMVZ.

A mis compañeros del **Departamento de Farmacología y Fisiología Veterinaria**.

A los **Laboratorios ARANDA** por considerarme y permitirme trabajar con ellos para la realización de mi proyecto de tesis.

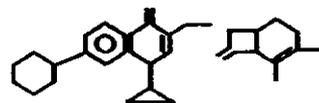
Al personal del **CEPIER** y al **Dr. Javier Valencia** quienes me apoyaron y colaboraron para que la realización de los muestreos fueran adecuados.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por otorgarme el privilegio de financiar mis estudios de Grado

A mi asesor y amigo **Dr. Héctor Sumano López** por su apoyo, paciencia y conocimiento.

A los integrantes de mi **Jurado** por atender mi trabajo y participar en este esfuerzo.

A todos aquellos que de alguna manera han contribuido en el desarrollo y finalización de mi maestría.

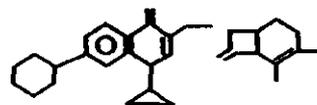


RESUMEN

Macouzet García Sofia. Farmacocinética sérica y de residuos en vacas lecheras con una nueva molécula de la familia de las cefaquinolonas (CQMEPCA). (bajo la dirección del Dr. Héctor Sumano López).

La CQMEPCA es un medicamento único en México, de desarrollo nacional, con patente internacional, el cual se está sometiendo a todas las etapas de pruebas e investigaciones propias para el desarrollo de cualquier antibacteriano aprobado por la FDA, entre dichas pruebas, la farmacocinética, realizada en este estudio, ofrece la información necesaria para darle congruencia y racionalidad al uso clínico de este antibacteriano. Se utilizaron 24 vacas Holstein que se dividieron en 4 grupos: 1° una dosis de 10mg/kg IV; 2° 5mg/kg IV; 3° 10mg/kg IM; 4° 5mg/kg IM. Las muestras de sangre se tomaron en un periodo de 8 horas. Además se hizo un seguimiento de residuos en leche en vacas en producción. Los métodos analíticos utilizados para procesar las muestras fueron espectrofotometría (UV-visible) y HPLC. Los resultados de graficar concentración contra tiempo en los 4 grupos, revelan que el medicamento se comporta con una cinética de 2 compartimentos, que tiene una cinética de primer orden a las dosis utilizadas y una biodisponibilidad promedio de 84 %. La CQMEPCA aplicada IM, alcanza concentraciones pico (t_{max}) a las 2.6 horas y ésta llega a un nivel plasmático (C_{pmax}) de 1.57 μ g/ml. Los volúmenes aparentes de distribución revelan una amplia distribución tisular (ej. $V_{d\text{área}}$ promedio de 2.86 a 10 mg/kg) y una eliminación eficiente en la fase β con vida media de 3.58 horas \pm 1.45 horas, lo que da en el extremo de las desviaciones 5 horas; esto es, más de cuatro días de periodo de retiro para carne (y 60 horas para leche de acuerdo a los resultados). El fármaco tiene una depuración de 0.63 ml/min/kg que concuerda con un K_{12} muy superior a la k_{10} y k_{21} (0.07 contra 1.67 y 1.83 respectivamente). También este ensayo reveló, una elevada unión de la molécula a proteínas plasmáticas, y dado que la potencia de un antimicrobiano depende en parte de la proporción del fármaco libre, se propone como seguimiento a este ensayo, se realicen estudios cinéticos utilizando CQMEPCA y un agente que compita por el grupo cefalosporánico, como la fenilbutazona o algún antiinflamatorio no esteroidal. Estos resultados son familiares a los encontrados en las cefalosporinas de tercera generación y resultan semejantes, en este sentido, al ceftiofur. En resumen, la CQMEPCA tiene las características de un fármaco del alta penetración y lenta eliminación que sugiere una elevada eficacia clínica, pero que obligan a determinar en futuros ensayos, si existe, una tercera fase de eliminación lenta (γ) de residuos. Este ensayo comprende un elemento fundamental que lineariza la continuidad en la investigación que se requiere para proyectar el fármaco al mercado humano.

Palabras clave: antibiótico, cefalosporinas, cefaquinolonas, CQMEPCA, farmacocinética, fluoroquinolonas, vacas.

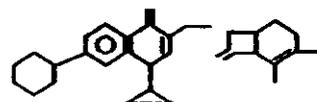


SUMMARY

Macouzet García Sofia. Seric pharmacokinetics and milk elimination of the new cephaquinolone antibacterial CQ-M-EPCA, in dairy cows. (Under the supervision of Dr. Héctor Sumano López).

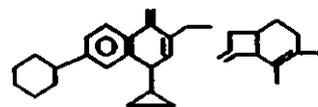
The antibacterial code-named CQ-M-EPCA is perhaps the only drug fully designed and pharmacologically developed in Mexico. The so-called cephaquinolone series, has obtained international patent protection and at the time of this work CQ-M-EPCA is currently being tested under the FDA instructions. Among these tests, pharmacokinetics is regarded as key-stone to further develop clinical work under field and experimental conditions. To define the pharmacokinetic behavior of CQ-M-EPCA, 24 Holstein-Friesian cows in lactation were divided in 4 groups as follows: group 1°: received a dose of 10mg/kg IV; group 2° a dose of 5mg/kg IV; group 3° a dose of 10mg/kg IM; and group 4° received a dose of 5mg/kg IM. Blood samples were taken at various time intervals during 8 hours to obtain plasma concentrations vs. time profiles. Additionally, an attempt was made to detect drug residues in milk. The analytical method elected was HPLC linked spectrometry. Drug plasma concentrations vs. time profiles obtained, revealed that they fit better a two compartment open model with an apparent linear increase in plasma concentrations and clearance values, as dose is increased. This suggests a first order kinetics. Bioavailability after IM injection was calculated to be 84 %, and CQ-M-EPCA reaches a peak concentration at a t_{max} of 2.6 hours, with a C_{pmax} value of 1.57 $\mu\text{g/ml}$. Apparent volumes of distribution revealed high tissue penetration (i.e., mean $V_{d_{area}} = 2.86$ at a dose of 10 mg/kg). This antibacterial showed a rapid clearance (0.63 ml/min/kg) during the β phase with a mean $T_{1/2}$ of 3.58 ± 1.45 hours. Taking deviations into account the maximum $T_{1/2}$ will be 5 hours, which in turn will amount 60 hours of withdrawal period for plasma clearance. This may be extrapolated to meat and is in full agreement with findings in milk. Micro-constants reveal that k_{12} was much higher than k_{10} and k_{21} (0.07, 1.67 and 1.83 respectively), values that suggest high tissue penetration of the drug. This work revealed also that there is a high degree of drug protein-bound. It is therefore, suggested that a displacement of the drug be induced using an specific drug-plasma protein interaction. Similar approach has shown to be useful with other third generation cephalosporins. Taken together these results indicate that CQ-M-EPCA possesses good tissue distribution, sufficiently slow elimination to allow 8 to 12 hour intervals of drug injection and perhaps a *gamma* phase which prompts further research to find out the kinetic patterns of drug-residue elimination.

Key words: antibacterial, cephalosporin, fluoroquinolones, cephaquinolones, CQMEPCA, pharmacokinetics, cows.



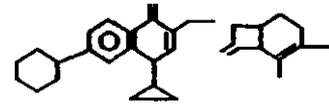
INDICE

Portada	I
Declaración	II
Dedicatoria	III
Agradecimientos	IV
Resumen	V
Summary	VI
Indice	VII
Lista de cuadros	VIII
Lista de figuras	XI
Lista de anexos	XII
Abreviaturas y Siglas usadas	XIII
Introducción	1
Hipótesis y Objetivos	21
Material y Métodos	22
Resultados	38
Discusión	42
Bibliografía	49
Cuadros	53
Figuras	64
Anexos	77



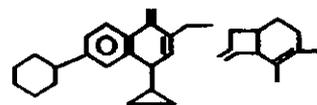
LISTA DE CUADROS

CUADRO	TITULO	PAGINA
1	Concentraciones séricas de CQMEPCA en vacas que recibieron una dosis del fármaco al 10% por vía IV.	53
2	Concentraciones séricas de CQMEPCA en vacas que recibieron una dosis fármaco al 10% por vía IM.	54
3	Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de enrofloxacin en suero de leche de vacas dosificadas con 10 y 5 mg/kg vía IM.	55
4	Valores estadísticos de la determinación por HPLC de las vacas dosificadas por vía IV.	56
5	Valores estadísticos de la determinación por espectrofotometría (absorbancia UV-VIS) de las vacas dosificadas por vía IV.	57
6	Valores estadísticos de la determinación por HPLC de las vacas dosificadas por vía IM.	58
7	Valores estadísticos de la determinación por espectrofotometría (absorbancia UV-VIS) de las vacas dosificadas por vía IM.	59
8	Relación de la media, desviación estándar y mediana de las variables farmacocinéticas de la CQMEPCA inyectada por vía IV a dosis de 10 mg/kg en vacas sanas.	60
9	Relación de la media, desviación estándar y mediana de las variables farmacocinéticas de la CQMEPCA inyectada por vía IV a dosis de 5 mg/kg en vacas sanas	61
10	Relación de la media, desviación estándar y mediana de las variables farmacocinéticas de la CQMEPCA inyectada por vía IM a dosis de 10 mg/kg en vacas sanas.	62
11	Relación de la media, desviación estándar y mediana de las variables farmacocinéticas de la CQMEPCA inyectada por vía IM a dosis de 5 mg/kg en vacas sanas.	63

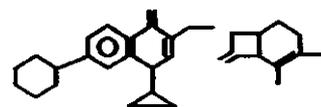


LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PAGINA
1	Inversión realizada para el desarrollo de nuevos fármacos en Estados Unidos.	2
2	Porcentaje que destina la industria farmacéutica para desarrollo e investigación en Estados Unidos	3
3	Porcentaje de las ventas invertidos en desarrollo e investigación, por ciertas industrias en Estados Unidos durante el año de 1993	4
4	Porcentaje estimado de inversión para desarrollo e investigación por la industria farmacéutica en Estados Unidos durante 1998	5
5	Núcleo básico de las quinolonas	9
6	Estructura básica de las fluoroquinolonas	9
7	Estructura molecular de la CQMEPCA	12
8	Cefalosporina C.	12
9	Compuesto denominado 7 ACA (ácido 7-amino cefalosporánico).	12
10.1	Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis bolo de 10 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.	64
10.2	Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis bolo de 10 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.	64
11.1	Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis bolo de 5 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.	65
11.2	Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis bolo de 5 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.	65
12.1	Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis bolo de 10 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por HPLC.	66
12.2	Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis bolo de 10 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por HPLC.	66

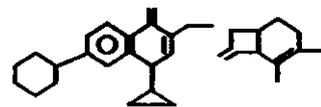


13.1	Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis bolo de 5 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por HPLC.	67
13.2	Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis bolo de 5 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por HPLC.	67
14.1	Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis de 10 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.	68
14.2	Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis de 10 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.	68
15.1	Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis de 5 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por UV-visible.	69
15.2	Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis de 5 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.	69
16.1	Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis de 10 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por HPLC.	70
16.2	Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis de 10 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por HPLC	70
17.1	Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis de 5 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por HPLC.	71
17.2	Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis de 5 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por HPLC.	71
18	Comparación de los valores medios de las concentraciones séricas de CQMEPCA de las vacas a las que se les administró la dosis de 10 mg/kg y 5 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.	72
19	Comparación de los valores medios de las concentraciones séricas de CQMEPCA de las vacas a las que se les administró la dosis de 10 mg/kg y 5 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por HPLC.	72
20	Comparación de los valores medios de las concentraciones séricas de CQMEPCA de las vacas a las que se les administró la dosis de 10 mg/kg y 5 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.	73
21	Comparación de los valores medios de las concentraciones séricas de CQMEPCA de las vacas a las que se les administró la dosis de 10 mg/kg y 5 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por HPLC.	73
22	Comparación de los valores medios de las concentraciones séricas de CQMEPCA de	74



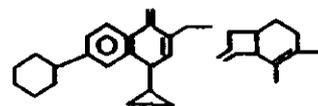
las vacas a las que se les administró el fármaco a dosis de 10 mg/kg por vía IV contra la vía IM. Determinación por HPLC.

- | | | |
|----|---|----|
| 23 | Comparación de los valores medios de las concentraciones séricas de CQMEPCA de las vacas a las que se les administró el fármaco a dosis de 5 mg/kg por vía IV contra la vía IM. Determinación por HPLC. | 74 |
| 24 | Valores de la media poblacional de la CQMEPCA a dosis de 10mg/kg IV, ± 1 desviación estándar y los probables intervalos de dosificación según las CMI's para bacterias sensibles. | 75 |
| 25 | Valores de la media poblacional de la CQMEPCA a dosis de 5 mg/kg IV, ± 1 desviación estándar y los probables intervalos de dosificación según las CMI's para bacterias sensibles. | 75 |
| 26 | Valores de la media poblacional de la CQMEPCA a dosis de 10 mg/kg IM, ± 1 desviación estándar y los probables intervalos de dosificación según las CMI's para bacterias sensibles | 76 |



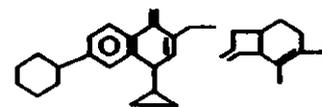
LISTA DE ANEXOS

ANEXO	TITULO	PAGINA
A	Certificado de análisis.	77
B	Absorbancia máxima de la CQMEPCA.	80
C	Absorbancia máxima de la enrofloxacin.	81
D	Absorbancia máxima del precursor 7-ACA.	82
E	Cromatograma de la CQMEPCA.	83
F	Cromatograma de enrofloxacin.	84
G	Cromatograma de precursor 7-ACA.	85
H	Cromatograma donde se determina la presencia del metabolito 3.	86

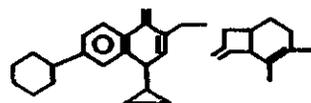


ABREVIATURAS Y SIGLAS UTILIZADAS

CQMEPCA	Cefaquinolona
FDA	Food and Drug Administration
EU	Estados Unidos
DI	Desarrollo e investigación
IND	Investigational New Drug
CANIFARMA	Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica
7-ACA	Acido 7 amino cefalosporánico
TLC	Cromatografía por capa fina
IR	Infra-rojo
RMN	Resonancia magnética nuclear
CQ	Cefaquinolona
CMI'S	Concentración mínima inhibitoria
LD	Dosis letal
ECRC	Enfermedad crónica respiratoria complicada
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
CEPIER	Centro de Enseñanza , Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes
Cbp	Cuanto baste para
Rpm	Revoluciones por minuto
UI	Unidades internacionales
M	molar
ATT	Atenuación
CHT SP	Espacio de la gráfica
AR REJ	Area de rechazo
THRSH	Umbral
PK	Pico
TIME	Tiempo
FLP	Fracción libre de proteínas
A.B.C.	Area bajo la curva
MTRA	Muestra
STD	Estándar
PROT	proteína
PT	Proteína total
Wf	Peso final
Wi	Peso inicial
AUC	Area bajo la curva
AUCM	Area bajo la curva-momento



V _{dc}	Volumen de distribución
α y β	constantes de distribución y posdistribución, respectivamente
A	Extrapolación a tiempo cero de la fase de distribución
B	Extrapolación a cero de la fase de posdistribución
T _{1/2}	Vida media de distribución
T _{1/2} β	Vida media de la fase de posdistribución
Cl _s	Depuración sérica
C _{p0}	Concentración máxima plasmática extrapolada al momento cero
K ₁₂	Constante de difusión del compartimento central al periférico
K ₂₁	Constante de redistribución del compartimento periférico al central
K ₁₀	Constante de eliminación
Cl _s	Depuración sérica
U.V.	Ultra violeta
CICREF	Centro Independiente de Constatación de Residuos y Eficacia Farmacológica.



FARMACOCINÉTICA SÉRICA Y DE RESIDUOS EN VACAS LECHERAS MEDICADAS CON UNA NUEVA MOLECULA DE LA FAMILIA DE LAS CEFAQUINOLONAS (CQMEPCA)¹.

INTRODUCCIÓN

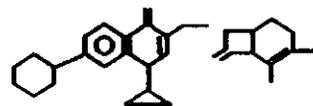
A) PROCEDIMIENTO A TRAVÉS DEL CUAL LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA PRESENTA UN PRODUCTO ANTIBIÓTICO AL MERCADO EN LOS ESTADOS UNIDOS

Aproximadamente 65 años atrás, se inició la industria farmacéutica moderna. Desde entonces la práctica médica se ha revolucionado, sobre todo por la aportación de nuevos compuestos que han salvado la vida al neutralizar diversos procesos infecciosos específicos que no se controlaban con fármacos, tales como, las sulfonamidas, penicilinas, cefalosporinas, aminoglicósidos y quinolonas entre otros. (1).

El proceso a través del cual la industria farmacéutica norteamericana lanza al mercado nuevos productos requiere de un periodo de pruebas preclínicas en animales de experimentación, 3 etapas de ensayos clínicos, 2 etapas de aprobación por la *Food and Drug Administration* (FDA). En estas investigaciones se requieren aproximadamente, 10 años de trabajos con un costo que fluctúa entre 100 y 359 millones de dólares. Empero, aún después de la aprobación de la FDA, el fabricante continúa con las investigaciones en 4 etapas de ensayos clínicos que permite obtener el máximo beneficio para el comprador o usuario (2).

El proceso para desarrollar un medicamento es muy riguroso, ya que únicamente 1 de cada 6000 compuestos probados puede alcanzar el mercado. El desarrollo de estos compuestos, regularmente requiere un mínimo de 7 años para que se puedan utilizar por primera vez en humanos. Antes de 1967, se introdujeron al mercado norteamericano únicamente 823

¹ Under the Patent Cooperation Treaty, PCT WO 95-23153



productos farmacéuticos nuevos; de éstos, 502 se descubrieron en los EU, y 437 fueron producto del desarrollo de otras industrias farmacéuticas manufactureras norteamericanas. En el periodo comprendido entre los años de 1967 y 1992 solamente se introdujeron cerca de 500 productos nuevos al mercado de EU (1).

El tiempo que se invierte no es el único factor involucrado, también lo es el costo económico para el desarrollo de nuevos fármacos, pues se ha disparado en forma exagerada durante los últimos 17 años. En 1976, por ejemplo, la Universidad de Rochester estimó que, el desarrollo de un medicamento nuevo costaba 54 millones de dólares, (véase figura 1) (1). Para 1993 el costo se incrementó en más de un 500% (3). Por ello, se estima en la actualidad, que para el desarrollo de un nuevo producto farmacéutico se requiere el tiempo ya referido, lo que representa un enorme capital de riesgo (2).

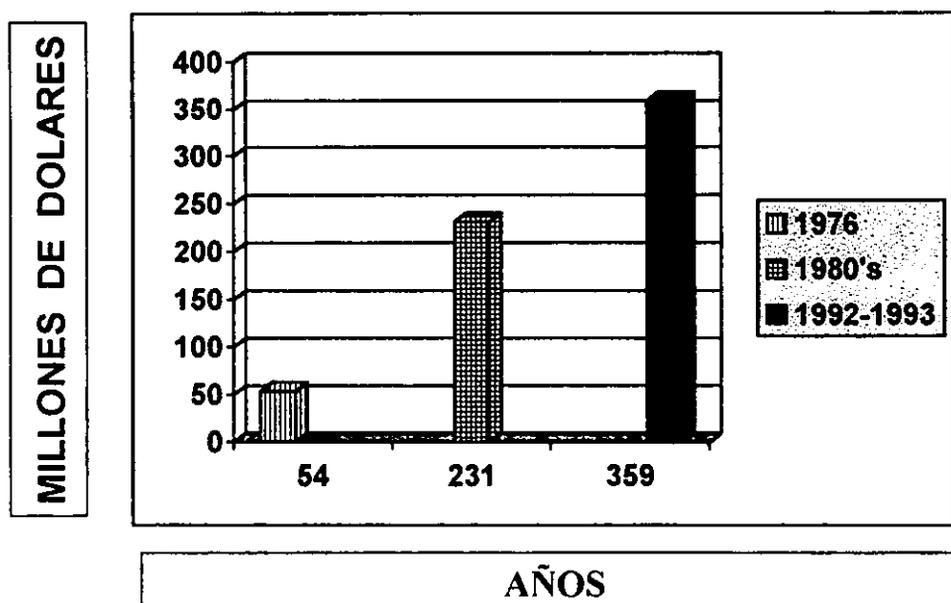
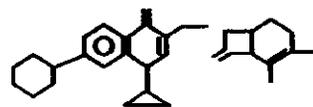


Figura 1. Inversión realizada para el desarrollo de nuevos fármacos en Estados Unidos. (2)

Con el fin de promover la generación de nuevos medicamentos, las compañías farmacéuticas norteamericanas han incrementado dramáticamente sus inversiones para el desarrollo e investigación (DI). En 1970, las empresas farmacéuticas norteamericanas invirtieron 618.5 millones de dólares en DI; para 1993, esta cifra superó los 1.2 billones de dólares (1); y sorprendentemente, más de la mitad de estos costos de DI se destinaron para



desarrollo de nuevos compuestos (véase figura 2). La Asociación de Industrias Farmacéuticas Manufactureras de los E.U. en 1993, compararon los porcentajes de ventas invertidos en DI por diferentes industrias norteamericanas. Encontraron que la industria farmacéutica reinvierte porcentajes de ventas mucho mayores en DI, que otras industrias manufactureras, como la espacial y la electrónica (véase figura 3) (1). En la actualidad se ha estimado que para el año de 1998 la inversión para DI por la industria farmacéutica se incrementará a un 19.6 % (véase figura 4)(4). A pesar de esta situación las compañías farmacéuticas solo tienen la posibilidad de que únicamente 3 productos de 10 que inicien la fase II del desarrollo, lo terminen y alcancen un lugar en el mercado. (2).

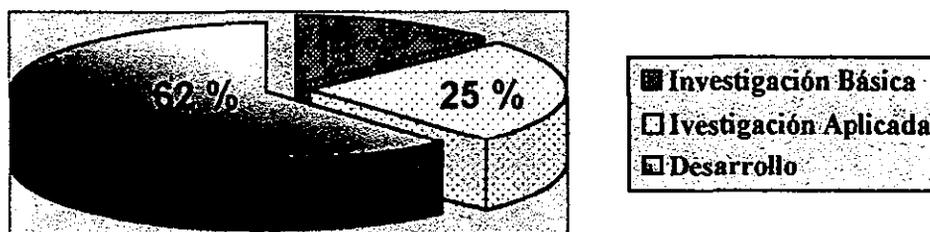
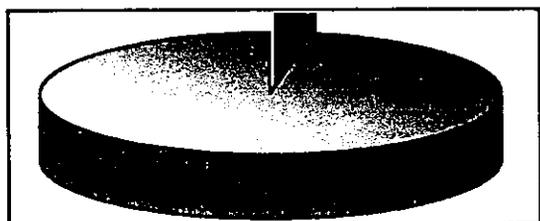
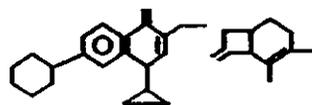
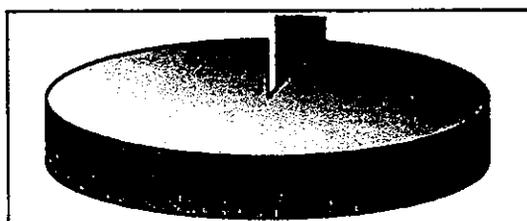


Figura 2. Porcentaje que destina la industria farmacéutica para desarrollo e investigación en Estados Unidos (2).

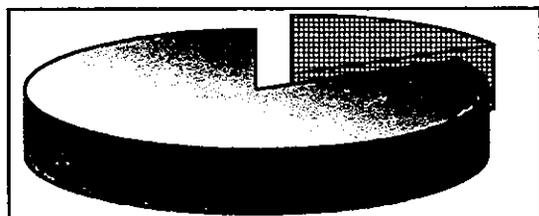
Las inversiones realizadas por las industrias en DI comprenden un rango muy amplio en aspectos químicos, en los que se incluyen: la manufactura del fármaco en forma 99% pura, del medicamento en su presentación farmacéutica. Se tienen costos elevados también en aspectos legales en farmacéuticos, la promoción del producto a miembros de la profesión médica; y en el desarrollo de presentaciones que no requieran prescripción. Otros productos que elaboran las empresas farmacéuticas son los de tipo biológico como las vacunas y los productos resultado de la ingeniería genética, que también requieren de altos costos para su producción. A continuación se describen las etapas que se consideran fundamentales para la aprobación de un nuevo fármaco (2).



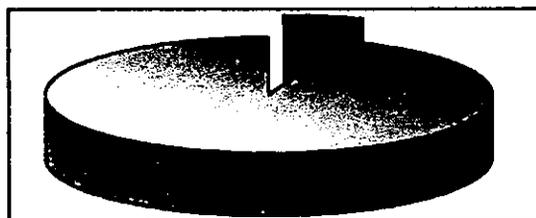
2.9 % Manufacturera



3.5% Espacial

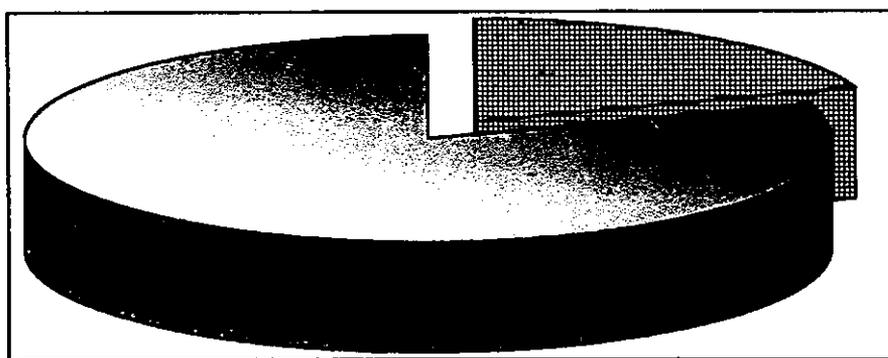
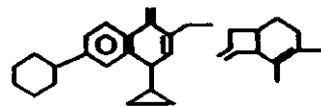


16.9 % Farmacéutica



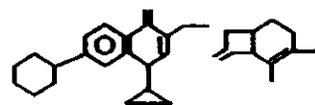
5.8 % Electrónica

Figura 3. Porcentaje de las ventas invertidos en desarrollo e investigación, por algunas industrias en Estados Unidos durante el año de 1993 (2)



19,6 % de inversión en 1988 para D&I

Figura 4 Porcentaje estimado de inversión para desarrollo e investigación por la industria farmacéutica en Estados Unidos durante 1998 (4).

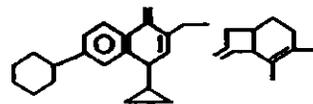


ETAPA PRECLÍNICA

Consiste en el desarrollo del producto antibacteriano. Todas las moléculas nuevas, naturales, sintéticas o recombinantes, se prueban en animales para tener una evidencia preliminar de su actividad farmacológica y su seguridad. A los productos que no presentan toxicidad marcada, se les realiza una serie de evaluaciones para saber si su actividad es antibiótica, antiviral, antiparasitaria, antifungal, o como agente antitumoral, si se encuentra que el producto posee cualquiera de estas actividades, se realizan pruebas adicionales para conocer sus efectos y estimar su posible dosis y ser probada con seguridad en humanos. Esta etapa dura aproximadamente entre 2 y 3 años. Posteriormente se presenta la solicitud de evaluación por la FDA, en la que se invierten entre 3 y 7 años dedicados a pruebas para finalmente lograr su aprobación (2).

ESTUDIOS CLÍNICOS

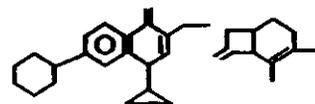
- Etapa I del programa de ensayos clínicos: El tiempo de duración es de aproximadamente de 1 a 2 años, donde se evalúa el fármaco en 100 a 300 individuos. Se realiza en pacientes sanos (humanos) y se realiza con el fin de definir la farmacocinética, la vía adecuada de administración, el rango de dosificación, la tolerancia y el efecto tóxico en diferentes órganos.
- Etapa II del programa de ensayos clínicos: La duración de esta etapa consta de aproximadamente 2 años y se evalúa en 300 y 1000 individuos infectados para el cual el antibiótico haya sido creado. Los ensayos se enfocan principalmente a definir la eficacia terapéutica del compuesto. Si se trata de un antibacteriano, se evalúa la seguridad del producto, se evalúa el impacto en pruebas de laboratorio y su potencial para tratamientos profilácticos, haciendo comparaciones con productos conocidos (“gold standard”). Se realizan pruebas de dosis respuesta, posibles interacciones



medicamentosas, respuesta oftalmológica después de varias semanas de administración, ototoxicidad y se define la correlación de respuesta clínica con la concentración plasmática y tisular (farmacocinética y farmacodinamia). Dentro de las poblaciones tratadas, debe haber animales gestantes y lactantes para que una vez que se hayan descartado problemas de teratogenicidad, se evalúe en humanos bajo estas mismas condiciones.

- Etapa III del programa de ensayos clínicos: Esta es la etapa más larga y comprende el segmento más extenso dentro del programa de pruebas clínicas. Su objetivo principal es comparar todas las investigaciones y los resultados de la eficacia terapéutica del antibacteriano en cuestión, con relación a los existentes en el mercado. Se continúa estimando en seguridad y dosis óptimas. Se estudia sus efectos sobre enfermedades específicas, agudas y crónicas, situaciones especiales con pacientes con cáncer, diabetes, o en la que su sistema inmune se encuentra comprometido, el tipo de población al que debe dirigirse, zona geográfica, y otros aspectos estadísticos y de mercadotecnia. Finalmente, se envía la solicitud con los resultados y sustento científico a la IND¹, para su evaluación. La FDA revisa la documentación a través de personal capacitado y especialistas que conjuntamente determinan la aprobación o rechazo del producto y la autorización para su comercialización. Dentro de esta última revisión, se establecen los lineamientos sobre los cuales debe hacerse la presentación del medicamento, especificaciones de empaque, usos, indicaciones y contraindicaciones para la presentación comercial (2).
- Etapa IV de evaluación: Las compañías farmacéuticas, continúan con las investigaciones aún después de haberse iniciado la comercialización de su producto, con el compromiso de mejorar, eficacia y seguridad, generar más literatura científica al respecto de su compuesto y determinar interacciones con otros productos, y alimentos (2).

¹ Investigational New Drug

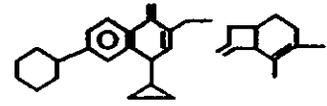


B) ANTECEDENTES DEL DESARROLLO DE LA SERIE CQMEPCA

Las fluoroquinolonas y los β -lactámicos, integran el grupo de antimicrobianos de mayor desarrollo farmacéutico, que mayor espectro han cubierto y que mayor potencia han presentado en ésta última década (5).

A partir de su caracterización en 1945, los β -lactámicos, y en especial las cefalosporinas, experimentaron un enorme desarrollo de compuestos biosintéticos. Sin embargo, no fue sino hasta 1964 que se introdujo la primera cefalosporina dentro de la práctica médica (6, 7). Actualmente se distinguen 3 generaciones de cefalosporinas, e incluso hay quienes consideran la existencia de una cuarta con la cefquinoma y la cefepima (8, 9, 10).

En 1960, Leshner presenta a la comunidad médica la primera quinolona antibacteriana, el ácido nalidíxico (11). Esta molécula resultó ser de gran valor para la quimioterapia de las enfermedades bacterianas, en virtud de haber contribuido como el núcleo básico (véase figura 5) de los compuestos de último desarrollo de importancia mundial, en el área de los medicamentos antibacterianos: las fluoroquinolonas (véase figura 6). En la actualidad, esta molécula y muchos análogos más, han recibido su patente mundial (12). En México se han clasificado en generaciones (5) y las de tercera generación son las más usadas en medicina veterinaria. Se cuenta en la actualidad con más de 340 compuestos con notable actividad antimicrobiana, pero desafortunadamente, se ha abusado de su uso, obedeciendo a presiones comerciales, más que a criterios clínicos farmacológicos y epidemiológicos y debido a que se hacen extrapolaciones de especie a especie. Se han implementado diversas formas de dosificación, incluso la metafiláctica y las premezclas de manera que la fluoroquinolonas se han convertido en el grupo de medicamentos más utilizado en estas dos últimas décadas. Sus significativas ventajas en cuanto a su espectro,



actividad y farmacocinética, son evidentes (5), pero en muchos países, se les ha reservado como última frontera de la resistencia bacteriana *v.gr.*, Estados Unidos de Norteamérica, que después de décadas de presiones ha aceptado el uso de la sarafloxacin en pollos y la enrofloxacin en bovinos.

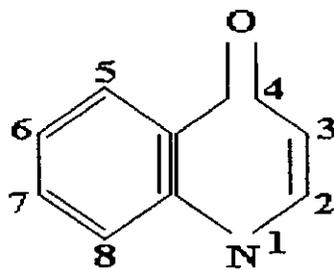


Figura 5. Núcleo básico de las quinolonas.

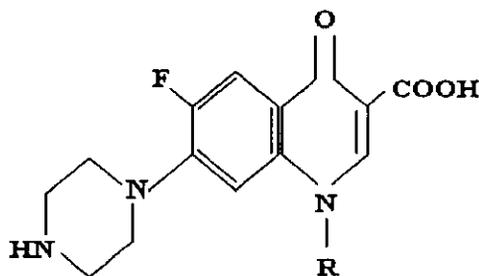
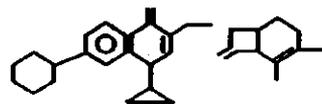


Figura 6. Estructura básica de las fluoroquinolonas



Considerando este marco de referencia, y dados los recursos económicos necesarios para presentar al mercado un nuevo antimicrobiano eficaz, es factible explicarse porque, actualmente, el descubrimiento de nuevos antimicrobianos en medicina humana y medicina veterinaria se encuentra a cargo de proyectos conjuntos entre universidades e institutos de investigación y la industria privada. Esto solo se ha logrado en países desarrollados. Anualmente, las grandes corporaciones farmacéuticas en el mundo, destinan gastos inmensos para el desarrollo de nuevas moléculas. En contraste, en Latinoamérica, incluyendo a México, ningún laboratorio hasta ahora, había destinado recursos para el desarrollo de moléculas originales (13).

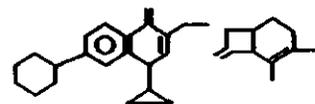
Sin embargo, a mediados de esta década, nuestro país, a través de los laboratorios ARANDA², ha colaborado como pionero en el desarrollo e investigación, de un novedoso grupo de antibacterianos, las cefaquinolonas³, moléculas patentadas internacionalmente por los Laboratorios Aranda

El concepto original para el desarrollo de la cefaquinolonas, fue el de crear un efecto doble, utilizando cefalosporinas y fluoroquinolonas para formar un híbrido. La idea fue atrevida, ya que en la literatura abundan datos acerca de la pérdida de actividad generado por las manipulaciones de dichas moléculas en sitios estratégicos (14, 15). La experiencia con este tipo de compuestos híbridos no había sido del todo favorable en otros laboratorios. La tarea no fue, ni es fácil, pues se deben obtener productos con una actividad antimicrobiana superior a la de sus partes componentes (16, 17), para que el proyecto sea viable.

Los esfuerzos de investigación y desarrollo en este campo, se iniciaron en 1990, a partir de los grupos terapéuticos disponibles, más favorables y estudiando las diferentes

² Laboratorios Aranda, S.A. San Martín de Porres 105 fracc. Industrial Carrillo Puerto, Querétaro, Qro.

³ Premio CANIFARMA a tecnología farmacéutica, 1995



posibilidades de mezclas físicas y sustitución de radicales en las diferentes posiciones de las moléculas individuales (18). Después de múltiples consideraciones y tentativas de hibridación, se concluyó que la mejor expectativa, era la de realizar la unión de un grupo fluoroquinolínico con un derivado del ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), precursor sin actividad antimicrobiana, formando un grupo carboxamido con el 7-amino del núcleo lactámico (véase figura 7).

C) ESTRUCTURA QUÍMICA

La cefalosporina C (véase figura 8), obtenida a partir de la cepa del *Cephalosporium acremonium*, tiene un anillo β -lactámico y un anillo adyacente de dihidrotiazina. El tratamiento ácido de la cefalosporina C, hidroliza al ácido 1-7 aminocefalosporánico (7-ACA) (véase figura 7). En sí el compuesto 7-ACA no tiene actividad biológica y se utiliza como materia prima para aumentar radicales en sitios específicos (19). Este mismo grupo se utilizó en la reacción de la cefaquinolona.

La idea inicial se basó en la sustitución de un anillo cefalosporánico (ácido 7-amino cefalosporánico) en la posición 3 de un anillo 1 ciclopropilo 7-etil-piperazinilo 6-fluoro -quinolínico, mediante la formación de un grupo carboxamido (véase figura 9). El acoplamiento de un grupo β -lactámico en sustitución del carboxilo de la posición 3 del anillo quinolínico, formándose un radical carboxamido y grupo amino del anillo β -lactámico, siendo perfectamente estable, y da lugar a una molécula de potencia considerable. De la reacción básica, se han generado múltiples opciones con mayor o menor actividad dependiendo de los precursores utilizados para su síntesis (20). En la estructura molecular de las cefaquinolonas, hay cuatro grupos sustituyentes; dos en el núcleo fluoroquinolínico y dos en el grupo cefalosporánico, lo que da como resultado la posibilidad de sintetizar más de dos mil compuestos de los cuales, 128 se consideran como compuestos de investigación prioritaria en este campo.

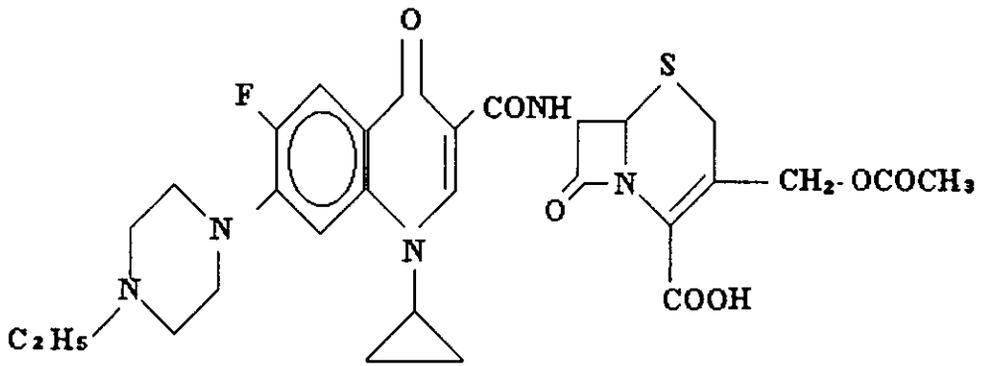
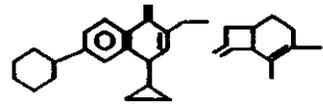


Figura 7. Estructura molecular de la CQMEPCA

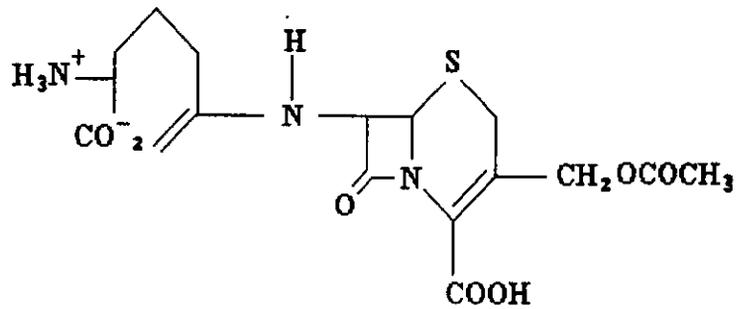


Figura 8. Cefalosporina C.

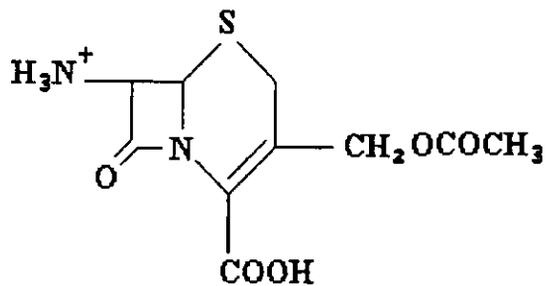
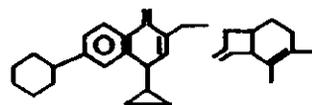


Figura 9. Compuesto denominado 7 ACA (ácido 7-amino cefalosporánico).



Las moléculas que se seleccionaron, se sometieron a determinaciones fisicoquímicas: humedad por Karl Fisher, punto de fusión, cromatografía por capa fina (TLC), espectrofotometría por infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN), espectrofotometría de masas¹. Así se comprueba y con certeza la existencia de la unión de las porciones quinolónica y cefalosporánica mediante el grupo carboxamido, la presencia del anillo β -lactámico sin degradación y el peso molecular de los compuestos formados de acuerdo con la estructura diseñada.

D) ESTABILIDAD

La primera molécula liberada para ese estudio se codificó como CQMEPCA. Es un antimicrobiano que en estado sólido es relativamente estable. La cefaquinolona, en solución tiene un aspecto brillante de color amarillo con un pH de 10.47. Al igual que la mayoría de las cefalosporinas (21), la cefaquinolona no presenta un comportamiento estable, por lo que se indica que, una vez reconstituida, se utilice en la siguiente hora para garantizar su pureza. Después de 96 horas a temperatura ambiente, la solución tiene apariencia turbia y de color amarillo ámbar, esto se debe a la hidrólisis de la carboxamida de la CQMEPCA². Si se requiere utilizar durante periodos prolongados, se recomienda su refrigeración.³

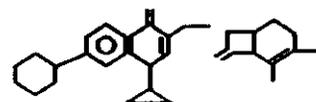
E) MECANISMO DE ACCIÓN

Poco se sabe del modo de acción de la CQMEPCA, y si existe, o no relación con respecto a los componentes por separado. En un ensayo microbiológico, Jones y colaboradores (20) sugirieron que era posible, que dicha molécula tuviera un mecanismo antibacteriano doble, esto es, que actuara tanto en el citoplasma bacteriano inhibiendo el

¹ Dr. Gustavo García de la Mora Departamento de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

² Química Lorena García Torres. Control de Calidad. Laboratorios Aranda, Querétaro Qro.

³ Proporcionado por el Departamento de Control de Calidad de los Laboratorios Aranda.



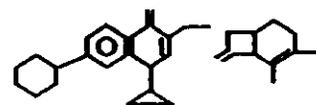
desenrollamiento bacteriano del ADN como en la pared celular, a través de la inhibición de la polimerización de los nucleótidos de Park. Aún se investiga para determinar con exactitud la participación de estas vías del metabolismo bacteriano y quizá otras que pudiesen estar involucradas en el mecanismo de acción de esta novedosa molécula.

Para conocer el mecanismo de acción de la CQMEPCA, se determinó la relación entre la localización electroforética de la CQ y sus precursores en comparación con el valor correspondiente al ADN bacteriano aislado, mediante la técnica reportada por Maniatis y Sambrook (22). No se detectó interacción de la CQ a nivel del ADN, pero este estudio no puede descartar su participación a otros niveles del material nuclear, como la ADN girasa, polimerasas, etc. En otros estudios donde se analizó el papel de plásmidos que codifican resistencia a quinolonas, en la resistencia a la CQMEPCA; no se detectó efecto del plásmido *gyra-A*, por lo que se infirió que el efecto de este antimicrobiano difiere al de las cefalosporinas de primera generación, y que posiblemente, posea un mecanismo de acción diferente a los ahora conocidos, que incluyen a ambos efectos a nivel de la pared (o quizá de membrana) y a nivel citoplasmático, posiblemente en parte, mediado por un efecto sobre precursores de ADN.

Hasta el momento, las evidencias indican que la actividad antibacteriana de la CQMEPCA persiste en bacterias resistentes a cefalosporinas y lo mismo sucede cuando hay resistencia para fluoroquinolonas, pero en contadas cepas de *Pseudomonas spp.*, en las que se ha detectado resistencia tanto a cefalosporinas como a fluoroquinolonas se reduce la actividad de la CQMEPCA⁴

F) POTENCIA Y ESPECTRO MICROBIOLÓGICO DE LA CQMEPCA

⁴ Hospital General de Zona del IMSS de Querétaro, Qro, estudio con más de 200 bacterias hospitalarias y Laboratorio Clínico Especializado en Querétaro Qro.



Se le considera un agente bactericida de amplio espectro que tiene actividad *in vitro* contra bacterias Gram negativas, Gram positivas, presentando una acción muy importante contra bacterias extra-celulares e intra-celulares (18). Con relación a los resultados arrojados por pruebas comparativas de la molécula contra tres fluoroquinolonas y cefalosporinas con base a las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI'S) contra *Staphylococcus aureus*, se dedujo que CQMEPCA es⁵:

- 31.7 veces más potente que la norfloxacin
- 31.7 veces más potente que la cefotaxima
- 15.8 veces más potente que la cefoperazona
- 7.9 veces más potente que la ciprofloxacina
- 1.9 veces más potente que la enrofloxacin

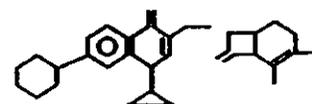
El espectro antimicrobiano, se encuentra reflejado con gran precisión en la patente original, en los que se consideran a los microorganismos que se han estudiado hasta ahora, pero aún faltan algunos trabajos con *Actinobacillus spp*, algunos enterococos y en particular *Staphylococcus spp* y cepas de *E. coli* multiresistentes.

G) TOXICIDAD AGUDA

Se han realizado múltiples ensayos par determinar la LD 1%, LD 50%, y el margen terapéutico en ratas y ratones. Los resultados reflejan una toxicidad baja; de 8.6 g/kg, y 9.56 g/kg respectivamente, por vía intravenosa; y por vía oral fueron, la LD 50% de 7.8 g/kg. y la LD 1% de 2 g/kg, a una dosis efectiva de 99% de 3 mg/kg.⁵

Comparativamente con la toxicidad conocida de otros antimicrobianos utilizados rutinariamente (aminoglicósidos, cloranfenicol, rifampicina, etc.) (23), la CQMEPCA muestra notables ventajas. No obstante, aún resta llevar a cabo otras pruebas de toxicidad

⁵ Dr. E. Lorenzana, Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. UNAM



subaguda o subcrónica, mismas que deben incluir estudios de genotoxicidad⁶. En diversos ensayos se ha detectado una actividad tóxica mínima o nula de estas moléculas por lo que las autoridades de la Secretaría de Salud de la República Mexicana han autorizado y aceptaron los resultados de toxicidad aguda y subcrónica de estos compuestos en cerdos.

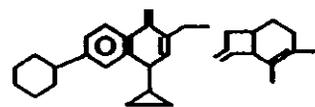
H) EFICACIA CLÍNICA

Se han realizado diversos estudios de carácter clínico, para conocer la eficacia de este nuevo grupo de medicamentos. Inicialmente, al conocer que la CQMEPCA tenía un efecto bactericida notable, confirmado por los abundantes resultados de los CMI realizados (18), se confirmó, que a nivel tisular, se lograban concentraciones bactericidas en tejidos clave (v.g. pulmón), a través de observaciones en los bioensayos realizados en ratón, desafiados con *Pasteurella multocida tipo A*. patógena, donde los animales tratados con la CQMEPCA adquirieron un 100% de protección, confirmada por la ausencia de mortalidad (24).

Asimismo, Santamaría (17)., medicó vacas, a través de un preparado intramamario con CQMEPCA-600 para el tratamiento de la mastitis en vacas de primer parto. Sus resultados indican que la cefquinolona, manifiesta tan buena eficacia clínica para la resolución de procesos mamíticos moderadamente agudos como los otros preparados comerciales semejantes, adicionados con antiinflamatorios. En los cuadros de mastitis severamente aguda, la eficacia clínica de la cefquinolona, arrojó resultados estadísticos más favorables.

En otros ensayos realizados en perros con problemas infecciosos de vías respiratorias, con medicación oral de CQMEPCA, se encontró una eficacia clínica cercana al 100 %, con una mejoría aparente después de la primera dosificación oral. En ensayos realizados en aves, con problemas de enfermedad crónica respiratoria complicada (ECRC),

⁶ Bióloga Isabel Gracia M. Departamento de Química Inorgánica. Facultad de Química. UNAM



causada por *Mycoplasma gallisepticum*, se analizó la eficacia clínica de la CQMEPCA en comparación con la enrofloxacin, considerando, las lesiones y las tasas de mortalidad. Se encontró que no hubo diferencia estadísticamente significativa, efecto que atribuyen al elevado número de aves utilizadas y a la notable eficacia de ambos fármacos (25).

Recientemente, se han realizado ensayos de medicación a becerros, con CQMEPCA, a manera de terapia metafiláctica para la reducción de enfermedades respiratorias del ganado bovino especializado en producción lechera, datos que ofrecieron un mejor resultado que los tratamientos convencionales⁷. Y similar al logrado con ceftiofur (26).

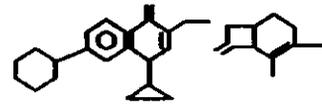
I) FARMACOCINETICA

Para continuar con el proceso de desarrollo e investigación de la CQMEPCA molécula, fue necesario realizar estudios *in vivo*, desafiando a la CQMEPCA, dado que en caso de encontrar efectos *in vitro* que no corresponden a lo observado *in vivo*, no es ajeno a la farmacología. Se medicaron i.v., con cefquinolona a ratones, que posteriormente se inocularon con *Pasteurella multocida*, se realizaron muestreos sanguíneos a diferentes tiempos para determinar la cinética de desaparición plasmática vs. tiempo, mediante el método de Bennet *et al* (27). Dicho ensayo mostró que a las 2 horas de sangrado, la media del halo de inhibición fue de una concentración plasmática equivalente a menos de 0.01 µg/ml.⁸

Dado que la CQMEPCA mostró en los ensayos *in vitro* una eficacia antibacteriana excepcional, y en virtud de los ensayos de desafío en ratones, así como la bioseguridad en ratones, se consideró como procedente llevar a cabo ensayos que definieran la

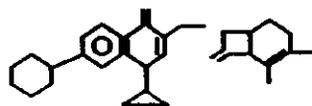
⁷ Información derivada de los archivos internos de los Laboratorios Aranda, 1998

⁸ Premio Canifarma 1995



farmacocinética del compuesto en perros. También mediante el análisis bacteriológico-cuantitativo diseñado por Bennet *et al* (27), Ovalle y Sumano (24), encontraron que la relación entre concentración y tiempo de la CQMEPCA se ajustó mejor a un modelo de dos compartimentos, con un volumen de distribución aparente del compartimento central de 2.5 l/kg, y un volumen de distribución aparente en el estado estable notablemente elevado de 4.03 l/kg y una vida de eliminación de 2 horas. Se lograron concentraciones plasmáticas bactericidas por unas cuantas horas únicamente, pero las concentraciones tisulares se predijeron como muy elevadas durante un mínimo de 6 horas, especulando que un intervalo de dosificación de 8 horas sería eficaz en la mayoría de las infecciones bacterianas que cubren el espectro de este antibacteriano (24). En otro ensayo farmacocinético en perros con afecciones pulmonares bacterianas, medicadas con CQMEPCA, Sumano y colaboradores (25), utilizando el mismo método de análisis bacteriológico-cuantitativo diseñado por Bennet *et al* (27), encontraron que, de acuerdo con el rango de la constante eliminación rápida se sugiere tener un intervalo de dosificación menor de 12 horas en estos casos clínicos. Asimismo se encontró un volumen de distribución muy grande (7.1 l/kg)

Los estudios de farmacocinética en pollos medicados por vía oral, sugieren una biodisponibilidad muy elevada del producto, notable desaparición rápida en sangre y con una vida media de tan solo 0.49 hr. Dada la cinética observada, se sugirió que era poco práctico establecer un solo intervalo de dosificación y al igual que muchas cefalosporinas de tercera generación o fluoroquinolonas modernas, la dosis y el intervalo de dosificación se ajustarán a cada caso clínico (28). Considerando la gran actividad biológica *in vitro* de la CQMEPCA contra múltiples bacterias, y su baja toxicidad en ratones, tanto por vía oral como parenteral, se ha considerado necesario realizar, el desarrollo de la farmacocinética de este compuesto en diferentes especies domésticas, con la finalidad que se consideren estos datos como precedentes para estudios equivalentes en seres humanos (clínico farmacocinético), y el de contar con una opción antimicrobiana, innovadora en medicina veterinaria. (24).



Es importante señalar que los ensayos anteriormente citados, los estudios farmacocinéticos, han sido realizados mediante la técnica microbiológica de Bennet et al (27), que solo detecta la fracción farmacológicamente activa y no está diseñado para contabilizar las fracciones sin actividad biológica, brindando así una visión parcial del destino de los antimicrobianos en el organismo.

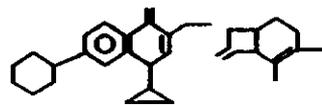
Dentro del desarrollo de un medicamento, se requiere la elaboración de pruebas de farmacocinética en individuos sanos, a fin de conocer con exactitud el destino del medicamento en el organismo problema (29). De tal suerte, es necesario llevar a cabo estudios en este sentido en cada una de las especies a las que se les habrá de aplicar. En el caso del bovino, esto permitirá entre otras cosas establecer los tiempos de retiro de la leche y carne (30), amén de que se obtendrá información de su distribución, intervalos de dosificación, concentración de la molécula en tejidos sanos y lesionados. Una vez establecida la farmacocinética, resulta procedente confirmarla en brotes de campo, mediante pruebas controladas y estudios cinéticos en los animales enfermos.

J) PERSPECTIVA DE TRABAJO

Para que una compañía farmacéutica, pretenda comercializar un compuesto en EU, debe proporcionar a la FDA una técnica analítica, generalmente por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (mejor conocida por HPLC por sus siglas en inglés). Esto se hace con el fin de poder hacer un seguimiento de la incidencia de residuos y verificar otras pruebas cinéticas (31, 32, 33).

K) CROMATOGRAFIA

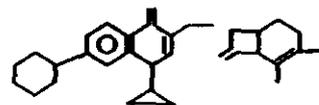
La cromatografía comprende un grupo de métodos de separación variado que permite separar, identificar y determinar compuestos afines en mezclas que no podrían



separarse de otra manera. Es una técnica de separación basada en la diferente velocidad con la que se mueven los componentes de una mezcla a través de una fase estacionaria, mediante el flujo de una fase móvil. El éxito depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: el tipo de columna y su contenido, la fase móvil, la longitud y la presión y condiciones electroquímicas de la columna, y la velocidad de flujo de la fase móvil, etc. (34).

La migración diferencial en HPLC es el resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna, y al salir de ésta, se conducen por la fase móvil hacia un detector, y en el orden que emergen, se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma que resulta, nos muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico, por lo que este tiempo se emplea para identificar el compuesto. El tiempo de retención se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo pico en el cromatograma (34).

En función de lo anterior, se propone en este ensayo llevar a cabo un estudio cinético en animales sanos para definir el valor de la cefquinolonas (molécula) a través del método de determinación de HPLC, en bovinos productores de leche.



HIPOTESIS

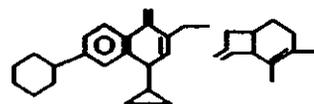
Las variables farmacocinéticas de la CQMEPCA (antimicrobiano de la familia de las cefquinolonas) pueden describirse mediante una farmacocinética compartamental utilizando el método analítico cualitativo/cuantitativo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en vacas sanas productoras de leche.

OBJETIVOS GENERALES

Establecer la farmacocinética sérica de una nueva molécula de la familia de las cefquinolonas (CQMEPCA) en vacas productoras de leche clínicamente sanas, al aplicar el fármaco por vía intravenosa e intramuscular a dosis de 10 y 5 mg por kg de peso.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementación de la técnica adecuada de separación del estándar de la CQMEPCA, así como de sus precursores, a través del método HPLC.
- Determinación de la farmacocinética sérica de la CQMEPCA mediante los métodos de espectrofotometría con arreglo de diodos y HPLC, posterior a la administración IV, a dosis altas (10 mg/kg) en vacas productoras de leche, clínicamente sanas.
- Determinación de la farmacocinética sérica de la CQMEPCA mediante los métodos de espectrofotometría con arreglo de diodos y HPLC, posterior a la administración IM, a dosis altas (10 mg/kg) en vacas productoras de leche, clínicamente sanas.
- Determinación de la farmacocinética sérica de la CQMEPCA mediante los métodos de espectrofotometría con arreglo de diodos y HPLC, posterior a la administración IV e IM, a dosis bajas (5 mg/kg) en vacas sanas.
- Inferencia de la farmacocinética de residuos de la CQMEPCA posterior a la administración IV e IM, así como el tiempo de retiro del ordeño.
- Cálculo de la dosis y del intervalo de dosificación de la CQMEPCA.



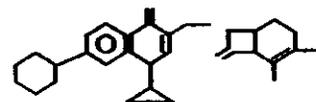
MATERIAL Y MÉTODO

FASE DE CAMPO

La fase experimental de campo se realizó en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (C.E.P.I.E.R) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en el km. 28.5 de la carretera federal México-Cuernavaca, población de Topilejo, Delegación Tlalpan, Distrito Federal; el cual se encuentra a una altitud de 2,760 metros sobre el nivel del mar, a 19° 13' latitud norte y 99° 08' longitud oeste. El clima de la región según Köppen es C(Wz) (W)b (iI), que corresponde al clima semifrío, subhúmedo con lluvias en verano y una precipitación pluvial media anual de 800 a 1,200 mm³. La temperatura media anual es de 19°C con variación de -4.5 a 30°C (37).

Se utilizaron 24 bovinos hembras, de la raza Holstein, con un peso promedio de 400 ± 50 kg, de 2 años de edad, clínicamente sanos, con ordeño cada 12 horas, que se mantuvieron bajo las mismas condiciones de alimentación y estabulación. Se asignaron aleatoriamente en 4 grupos de 6 individuos cada uno para distribuir los tratamientos de la siguiente manera:

GRUPO	No. ANIMALES	VIA ADMON.	DOSIS DE CQMEPCA
1	6	Intravenosa	10 mg/kg.
2	6	Intravenosa	5 mg/kg.
3	6	Intramuscular	10 mg/kg.
4	6	Intramuscular	5 mg/kg.



La cefaquinolona que se utilizó en esta prueba, fue una solución *insitu* de CQMEPCA al 10 %, compuesta por un polvo para reconstituir (CQMEPCA 10 g y procaína HCl) y un diluyente (NaOH, Sulfóxido de Dimetilo y agua destilada c.b.p. 100 ml) con una pureza del 98.66 %. Tanto el diluyente (50 ml) como el polvo para reconstituir se almacenaron en frascos ámbar de 60 ml por comodidad en el empleo de un frasco para cada vaca. La cefaquinolona (CQMEPCA) fue proporcionada por los Laboratorios Aranda, Lote No. 1308. (véase certificado de análisis en el anexo A).

El medicamento se reconstituyó momentos previos a su aplicación, asegurándose que la solución aplicada fuera nueva para cada animal y completamente translúcida.

La medicación intravenosa se realizó a través de punción yugular con agujas del No. 21 y jeringas de 60 ml¹. La medicación intramuscular, se realizó en dos sitios de aplicación en la región de la grupa, con agujas del No 16 y jeringas de 60 ml.

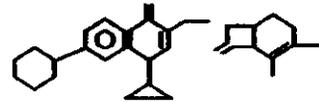
Una vez administrado el medicamento al tiempo 0 (cero), se tomaron las muestras sanguíneas a diferentes tiempos, con relación a la vía de administración. Para los individuos de los grupos 1 y 2 (a quienes se les medicó vía intravenosa) los tiempos de sangrado, en horas, después de la medicación, fueron los siguientes: 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0. Para los individuos de los grupos 3 y 4 (medicados vía intramuscular), los tiempos de sangrado, en horas, después de la medicación fueron los siguientes: 0.25, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 (38).

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular, a través de la colocación de un catéter No. 16² en sentido retrógrado, fijado a la piel por una sutura absorbible³ del No 0 y cinta adhesiva⁴. Se conectó a una extensión de catéter⁵ con un tapón

¹ TERUMO® Syringe 60 ml. TERUMO Medical Corporation.

² Insyte® 16GA 2IN, Becton Dickinson Vascular Access.

³ DEXON® II, T-10, 37 mm DAVIS-GECK



para catéter⁶ en su porción distal. Por medio de la punción del tapón de catéter con jeringas de 10 ml⁷, se colectó la cantidad de 7 ml de sangre, por tiempo, que se vació en tubos vacutainer⁸ sin aditivo. Después de cada muestra que se tomo, se lavó la canalización venosa con solución de lactato de Ringer⁹ heparinizada¹⁰ con 1000 UI/lt para mantener limpio el conducto de muestreo. Los tubos vacutainer, llenos con la muestra de sangre, se centrifugaron a 7,000 rpm. durante 10 minutos. Se extrajo el suero de los tubos y se contuvieron en tubos de eppendorf de 1.5 ml. Los sueros previamente identificados se almacenaron en congelación en hielo seco hasta su análisis.

En los individuos que no terminaron el tiempo de muestreo con el catéter en condiciones viables, por la duración de la prueba, se procedió a sangrarlos por la vena coccígea con jeringas de 10 ml y agujas del No.21.

Para la recolección de la muestra de leche de las vacas, se consideró como día 1, hora cero al tratamiento único de CQMEPCA a dosis de 5 mg/kg y 10 mg/kg vía im. Las muestras se realizaron a la 1, 3 y posteriormente cada 12 horas (vacas de 2 ordeños) durante 6 ordeños (72 horas). Para tomar las muestras, las ubres se lavaron con agua y jabón, y se les secaron con toallas de papel, se despuntaron los pezones y se procedió a recolectar la cantidad de 7 ml de leche dentro de tubos vacutainer sin aditivo. Las muestras se almacenaron en congelación (-4° C) hasta su determinación analítica.

⁴ Sedasiva®, 5 cm x 5 m.

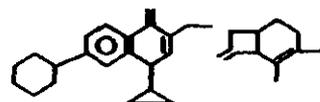
⁵ Discofix®, Tubo de extensión, 75 cm, 5.00 ml, Laboratorios Pisa. S.A. de C.V.

⁶ Ijection Site, Baxter Healthcare Corporation.

⁷ PLASTIPAK 10 ml, con aguja 21X32mm, Becton Dickinson de México.

⁸ Becton Dickinson VACUTAINER® Systems, sin aditivo de 7 ml.

⁹ Ringer con lactato de sodio, envase viaflex 1000 ml, Baxter® S.A. de C.V.



FASE ANALÍTICA

La fase analítica se realizó en los Laboratorios ARANDA, ubicado en San Martín de Porres 105 Fraccionamiento Industrial Carrillo Puerto, Querétaro, Querétaro y se describe a continuación.

Equipo de Cromatografía

Se utilizó un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) 1050 Hewlet Packard, y detector con lámpara de deuterio de arreglo de diodos 991 con 512 diodos de longitud de onda corta marca Hewlet Packard, bomba cuaternaria e inyector automático. Un integrador HP3396 series II. Se utilizó una columna de fase inversa, Columna uBondapak C18 125 A° 10µm de 3.9 X 150mm HPLC Waters¹¹.

Condiciones del HPLC:

Bomba: Gradiente Metanol/Buffer de fosfato de amonio dibásico pH 3.5, 0.04M. (35:65).

Tiempo: 12 minutos.

Inyector: Volumen de inyección de 20 µl.

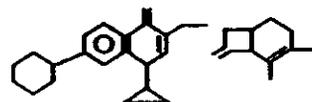
Tiempo: 12 minutos.

Detector: Longitud de onda: 280 nm.

Tiempo: 12 minutos.

Integrador:	ZERO	= 0
	ATT	= 8
	CHT SP	= 0.5
	AR REJ	= 100 000
	THRSH	= 6
	PK	= 0.04
	TIME	= 8

¹⁰ Inhepar®, 5000 UI/ml, Laboratorios la Pisa S. A. de C. V.



La espectrofotometría se realizó en un espectrofotómetro marca Varian, modelo Cary 1e, (scan) U.V. Visible.

Condiciones del espectrofotómetro:

Lámpara ultravioleta (250nm a 350nm).

Umbral: 0.0200

Balanza analítica, marca Sartorius analytic A200S

Potenciómetro marca Beckman 10pHMeter.

Centrifuga clínica.

Material

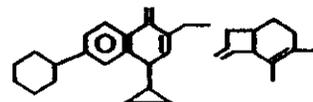
Matraz volumétrico de 10 ml	9
Pipetas volumétricas de 1 ml	9
Tubos de 10 ml para centrifuga	10
Pipetas volumétrica de 2 ml	1
Equipo de filtración	1
Jeringas	4
Filtros de Nylon Acrodisc 0.45 μm	4
Viales	4

El material de cristalería que se utilizó es marca Pyrex® México.

Reactivos

- 1 g CQMEPCA
- 500 ml Agua (HPLC)
- 500 ml Acetonitrilo (HPLC)
- 500 ml Fosfato de amonio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 3.5, 0.04 M (HPLC)
- 10 ml Fosfato de amonio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 10, 0.04 M (HPLC)
- 500 ml Metanol (HPLC)
- 1 g Acido tricloroacético CCl_3COOH al 10%
- 10 ml Acido sulfúrico H_2SO_4

¹¹ El contenido de la columna es de Dimethyloctadecylsilyl bonded amorphous silica, agua.



- 100 ml Trietilamina
- Hidróxido de amonio
- Acido acético glacial

Todos los reactivos que se utilizaron son de elaboración J.T. Baker®, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V. Phillipsburg, USA, ó Xalostoc, México.

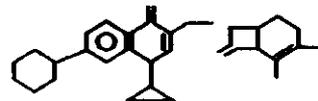
Procedimiento

Estándar:

1. Se pesó aproximadamente 10 mg de CQMEPCA, se disolvió en 0.5 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 10 y se ajustó con hidróxido de amonio a 0.04 M, se agitó hasta conseguir la dilución completa.
2. Se aforó a 10 ml en un matraz volumétrico con una mezcla de agua:acetonitrilo 1:1 grado HPLC. Se agitó.
3. Se tomó una alícuota de 1 ml y se adicionó a un segundo matraz volumétrico de 10 ml y se aforó con una mezcla de metanol: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 3.5, que se ajustó con ácido acético glacial, 0.04 M 1:1 grado HPLC. Se obtuvo una concentración final de 0.1mg/ml.

Para el HPLC:

4. Se tomó 2 ml con una jeringa y se filtró con el acrodisc de nylon directamente a un vial de 2 ml.
5. Se inyectó al HPLC bajo las condiciones anteriormente descritas.
6. Se establecieron las especificaciones en el estándar. Véase cromatograma.
7. Se determinó la media del área y tiempo de retención de CQMEPCA con base al estándar.



Para el Espectrofotómetro:

8. Se tomó una alícuota de 1 ml del segundo matraz (paso c del estándar) y se adicionó a un tercer matraz volumétrico de 10 ml. Se aforó con una mezcla de metanol: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 3.5 que se ajustó con ácido acético glacial, 0.04 M 1:1 grado HPLC. Se obtuvo una concentración final de 0.01 mg/ml. Se realizó una tercera dilución porque a una concentración de 0.1 mg/ml las absorbancias son muy altas.
9. Se tomaron 2 ml y se colocaron en una celda de 1.0 cm.
10. Se leyó la muestra en el espectrofotómetro bajo las condiciones anteriormente descritas.
11. Se establecieron las condiciones del estándar. Véase espectro.
12. Se determinó en la región ultravioleta la absorbancia de la solución analizada. Se exhibió máximos a 280 nm +/- 1nm.

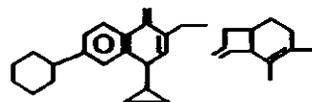
La muestra de CQMEPCA se disolvió en buffer de fosfato de amonio pH = 10.0 y se trató con agua/acetonitrilo y buffer de fosfato de amonio pH = 3.5, 0.04 M/Metanol hasta llegar a una concentración de 0.04 mg/ml.

Muestra de suero sanguíneo:

1. Se descongeló el suero almacenado.

Para Absorbancia

2. Se tomó un volumen de 2 ml y se añadió a una celda de 1.0 cm³.
3. Las condiciones del espectrofotómetro fueron como anteriormente se mencionó.
4. Se determinó en la región ultravioleta la absorbancia de la solución que se utilizó. Exhibió máximos de 280 nm +/- 1 nm.



Preparación previa

5. Se utilizó 0.2 ml de suero y se aforó a un ml con $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.04M, pH 3.5/ CH_3OH 1:1.
6. Se añadió 0.5ml de CCl_3COOH al 10% y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Se dejó reposar 1 minuto. (pH 1-2). (39)
7. Se centrifugó la muestra a 7000 rpm durante 10 minutos.

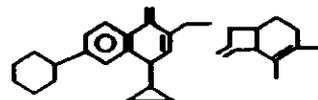
La fracción superior (A) es el filtrado libre de proteínas (pH 2), y la inferior (B) las proteínas plasmáticas.

Fracción A: filtrado libre de proteínas

8. Se separó todo el filtrado libre de proteínas con ayuda de una pipeta pasteur.
9. Se aforó a 1 con una mezcla de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 3.5, 0.04M, 1:1 grado HPLC.

Para HPLC

10. Se tomó 1 ml con una jeringa y se filtró con el filtro acrodis de nylon. Se vertió en un vial de 2 ml.
11. Las condiciones del HPLC fueron como anteriormente se mencionó.
12. Se inyectó 3 veces cada muestra.
13. Se determinó la media del área de retención de CQMEPCA con base al tiempo de retención del estándar.



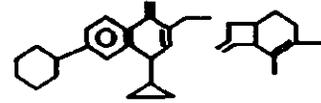
Fracción B: proteínas plasmáticas:

1. A la fracción que se precipitó, se le adicionó 0.5 ml de trietilamina al 6 % en metanol, se agitó y se removi6 constantemente con una esp6tula, para que la trietilamina penetrara en los espacios intermoleculares de las prote6nas.
2. Se centrifug6 a 7000 rpm durante 10 minutos.
3. Separamos la fracci6n superior (I) y se a6nadi6 a un matraz volum6trico de 100 ml, con ayuda de una pipeta pasteur. El precipitado corresponde a las prote6nas.
4. Se a6nadi6 a las prote6nas 0.5 ml de trietilamina al 6% en metanol y se removi6 constantemente con una esp6tula, para que la trietilamina penetrara en los espacios intermoleculares de las prote6nas.
5. Se centrifug6 a 7000 rpm durante 10 minutos.
6. Se separ6 la fracci6n superior (II) y se a6nadi6 a un matraz volum6trico de 100 ml, con ayuda de una pipeta pasteur.
7. Se afor6 a 1 ml con una mezcla de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 3.5, 0.04M, CH_3OH 1:1 grado HPLC.
8. Se a6nadi6 al vial de 2 ml y se filtr6 con un acrodis de nylon.
9. Las condiciones del HPLC fueron como anteriormente se mencion6
10. Se inyect6 3 veces.
11. Se determin6 el 6rea y tiempo de retenci6n de CQMEPCA con base al tiempo de retenci6n del est6ndar.

Muestra de suero de leche:

Para las muestras de leche, una vez descongeladas, el procedimiento que se utiliz6, fue lograr la separaci6n de suero, grasa y prote6nas a trav6s de la adici6n de 100 U de proteasa¹²

¹² SIGMA Cod. No. 2234



por litro de leche para coagular la leche. Posteriormente se centrifugó a 7,000 rpm durante 10 minutos.

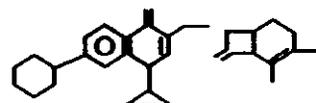
Para Absorbancia

1. Se tomó un volumen de 2 ml de suero de leche y se añadió a una celda de 1.0 cm³.
2. Las condiciones del espectrofotómetro fueron como anteriormente se mencionó.
3. Se determinó en la región ultravioleta la absorbancia de la solución que se utilizó. Exhibió máximos de 280 nm +/- 1 nm.

Para HPLC:

1. Se aforó a 10 ml en un matraz volumétrico con una mezcla de agua:acetonitrilo 1:1 grado HPLC. Se agitó.
2. Se tomó una alícuota de 1 ml y se adicionó a un segundo matraz volumétrico de 10 ml y se aforó con una mezcla de metanol: (NH₄)₂HPO₄ pH 3.5, que se ajustó con ácido acético glacial, 0.04 M 1:1 grado HPLC. Se obtuvo una concentración final de 0.1mg/ml.
3. Se tomó 2 ml con una jeringa y se filtró con el acrodisc de nylon directamente aun vial de 2 ml.
4. Se inyectó al HPLC bajo las condiciones anteriormente descritas.
5. Se determinó el área y tiempo de retención de CQMEPCA con base al tiempo de retención del estándar.

El rendimiento se determinó en suero únicamente, porque en grasa no se puede determinar por HPLC, bajo las condiciones anteriormente descritas, ya que el tipo de columna que hemos utilizado es de C 18, y provocaríamos que se tapara esta última.



Fórmulas

Apéndice 1

Para calcular l % de CQMEPCA en suero:

- Fracción A. % de CQMEPCA en filtrado libre de proteínas.

HPLC

$$\% \text{ de CQMEPCA}_{\text{FLP}} = \left[\frac{\text{A.B.C.}_{\text{MTRA}}}{\text{A.B.C.}_{\text{STD}}} \times \frac{C_{\text{STD}}}{C_{\text{MTRA}}} \right] 100$$

Donde:

$\% \text{ de CQMEPCA}_{\text{FLP}}$	= % de CQMEPCA en filtrado libre de proteínas.
$\text{A.B.C.}_{\text{MTRA}}$	= Area bajo la curva de la muestra.
$\text{A.B.C.}_{\text{STD}}$	= Area bajo la curva del estándar.
C_{STD}	= Concentración del estándar en mg/ml = 0.01 mg/ml
C_{MTRA}	= Concentración de la muestra en mg/ml = 0.01 mg/ml

Espectro:

$$\% \text{ de CQMEPCA}_{\text{FLP}} = \left[\frac{A_{\text{MTRA}}}{A_{\text{STD}}} \times \frac{C_{\text{STD}}}{C_{\text{MTRA}}} \right] 100$$

Donde:

$\% \text{ de CQMEPCA}_{\text{FLP}}$	= % de CQMEPCA en filtrado libre de proteínas.
A_{MTRA}	= Absorbancia de la muestra, exhibe máximo a 280 nm +/- 1 nm.
A_{STD}	= Absorbancia de la muestra, exhibe máximo a 280 nm +/- 1 nm.
C_{STD}	= Concentración del estándar en mg/ml = 0.01 mg/ml
C_{MTRA}	= Concentración de la muestra en mg/ml = 0.01 mg/ml

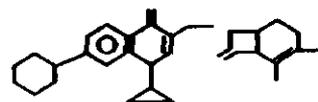
- Fracción B. % de CQMEPCA en proteínas plasmáticas:

HPLC

$$\% \text{ de CQMEPCA}_{\text{PROT}} = \left[\frac{\text{A.B.C.}_{\text{MTRA}}}{\text{A.B.C.}_{\text{STD}}} \times \frac{C_{\text{STD}}}{C_{\text{MTRA}}} \right] 100$$

Donde:

$\% \text{ de CQMEPCA}_{\text{PROT}}$	= % de CQMEPCA en proteínas.
---------------------------------------	------------------------------



A.B.C. MTRA	= Area bajo la curva de la muestra.
A.B.C.STD	= Area bajo la curva del estándar.
C _{STD}	= Concentración del estándar en mg/ml = 0.01 mg/ml
C _{MTRA}	= Concentración de la muestra en mg/ml = 0.01 mg/ml

Espectro

$$\% \text{ de CQMEPCA}_{\text{PROT}} = [A_{\text{MTRA}}/A_{\text{STD}} \times C_{\text{STD}}/C_{\text{MTRA}}]100$$

Donde:

% de CQMEPCA _{PROT}	= % de CQMEPCA en proteínas.
A _{MTRA}	= Absorbancia de la muestra, exhibe máximo a 280 nm +/- 1 nm.
A _{STD}	= Absorbancia de la muestra, exhibe máximo a 280 nm +/- 1 nm.
C _{STD}	= Concentración del estándar en mg/ml = 0.01 mg/ml
C _{MTRA}	= Concentración de la muestra en mg/ml = 0.01 mg/ml

Porcentaje de CQMEPCA en proteínas plasmáticas

Calculado por diferencia:

$$\% \text{ CQMEPCA}_{\text{PROTEÍNAS PLASMÁTICAS}} = 100\% - \% \text{ CQMEPCA}_{\text{FLP}}$$

Cuantificación de proteínas totales:

$$PT = W_f - W_i$$

Donde:

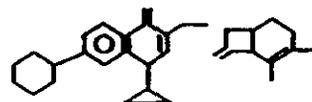
PT = Proteínas totales (g)

W_f = Peso final (peso del papel-proteínas).

W_i = Peso inicial (eso del papel)

Especificación: Niveles normales de proteínas plasmáticas = 0.12 a 0.16 g/2 ml de suero.

El enfoque analítico para determinar las concentraciones séricas y tisulares de la CQMEPCA fue a través de la estimación del porcentaje de recuperación logrado para la parte quinolinica y para la parte β-lactámica. Cuando se obtiene un 91% de recuperación o más, se considera el método de elección. En casos contrarios, se suman los porcentajes de recuperación para llegar a la citada cifra.



Los datos obtenidos se analizaron con Estadística descriptiva, con media, mediana y variación de los datos.

Las variables farmacocinéticas se calcularon mediante análisis compartamental¹³. Se utilizó el modelo 7 para el análisis de los datos correspondientes a la administración endovenosa de la CQMEPCA, y el modelo 11 para el análisis de los datos correspondientes a la administración intramuscular.

Variables farmacocinéticas que se determinaron para la CQMEPCA en vacas.

AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	α (hr^{-1})	Cl_s ($\text{ml}/\text{min}/\text{kg.}$)	$T_{1/2} \beta$ (hr)
AUMC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	β (hr^{-1})	Cp_0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
Vdc (L/kg.)	A ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	K_{12} (hr^{-1})	
Vd_{Area} (L/kg)	B ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	K_{21} (hr^{-1})	
Vd_{ss} (L/kg.)	$T_{1/2}$ (hr)	K_{10} (hr^{-1})	

AUC = area bajo la curva por integral trapezoidal

AUMC = area bajo la curva-momento

Vdc = volumen de distribución aparente del compartimiento central

Vd_{Area} = volumen de distribución aparente de la fase posdistribución

Vd_{ss} = volumen de distribución aparente en la fase estable

α y β = constantes de distribución y posdistribución, respectivamente

A = extrapolación a tiempo cero de la fase de distribución

B = extrapolación a cero de la fase de posdistribución

$T_{1/2} \alpha$ = vida media de distribución

$T_{1/2} \beta$ = vida media de la fase de posdistribución

Cl_s = depuración sérica

Cp_0 = Concentración máxima plasmática extrapolada al momento cero

K_{12} = constante de difusión del compartimiento central al periférico

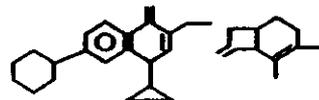
K_{21} = constante de redistribución del compartimiento periférico al central

K_{10} = constante de eliminación

Biodisponibilidad = $\text{AUC i.m.}/\text{AUC i.v.} \times 100$

(40)

¹³ MicroMath Scientific Software. Salt Lake City, Utah 1993.



Apéndice 2

Fórmulas Generales

Volumen de distribución aparente del compartimento central:

$$V_{dc} = \frac{\text{Dosis IV}}{C_{p0}}$$

Volumen de distribución área:

$$V_{d_{\text{Area}}} = \text{Dosis IV} / \text{AUC} \cdot \beta$$

Volumen de distribución en el estado estable:

$$V_{d_{ss}} = \text{Dosis IV} / \text{AUC}^2 / \text{AUMC}$$

Depuración sistémica:

$$Cl_s = \text{Dosis IV} / \text{AUC}$$

Concentración de la CQMEPCA en plasma al momento cero $C_o = A + B$

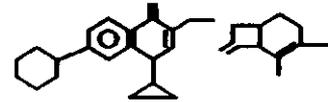
donde A = concentración de la CQMEPCA al momento cero, extrapolado por linearización de residuales y B = concentración de la fase terminal.

$$K_{21} = A\beta + B / A + B$$

$$K_{10} = \alpha \cdot \beta / K_{21}$$

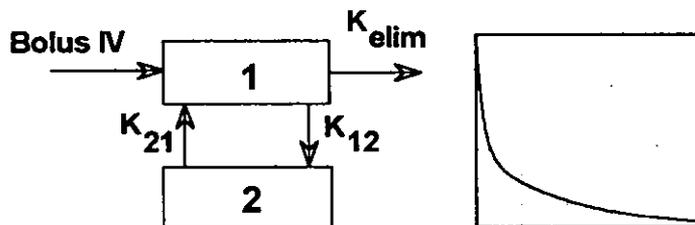
$$K_{12} = \alpha + \beta - K_{21} - K_{10}$$

(40)



PK Analyst Modelo #7 para la cinética IV¹⁴

Modelo de dos compartimentos



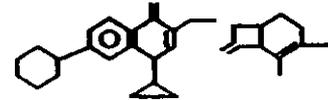
(14)

Variable Independiente:	Tiempo
Variable Dependiente:	Concentración
Parámetros:	Volumen, Dosis, Kelim, K ₁₂ , K ₂₁
Cantidades Calculadas:	AUC, Kelim_half, alpha, beta, alpha_half, beta_half, A, B, AUMC, Residence_time, AUC_to_last_T, AUMC_to_last_T, Residence_time_to_last_T

Ecuación general:

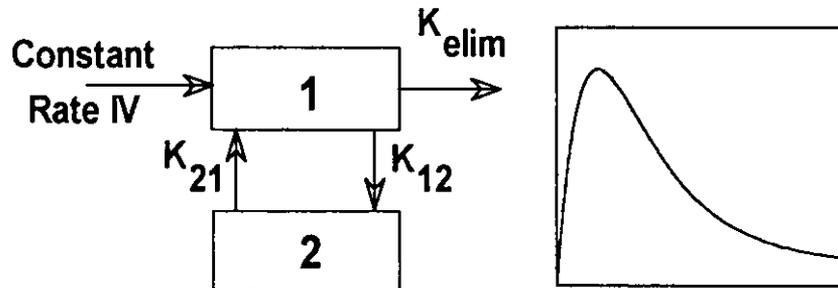
$$\text{Concentración (Tiempo)} = Ae^{-\alpha \cdot \text{Tiempo}} + Be^{-\beta \cdot \text{Tiempo}}$$

¹⁴ MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, Utah 1993



PK Analyst Modelo#14 para la cinética IM¹⁴

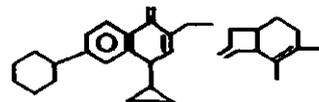
Modelo de dos compartimentos



Variable Independiente:	Tiempo
Variable Dependiente:	Concentración
Parámetros:	Volumen, Dosis, Kelim, K ₁₂ , K ₂₁ , K _{AB}
Cantidades Calculadas:	AUC, Kelim_half, alpha, beta, alpha_half, beta_half, A, B, C, AUMC, Residence_time, AUC_to_last_T, AUMC_to_last_T, Residence_time_to_last_T

Ecuación general:

$$\text{Concentración (Tiempo)} = Ae^{-\alpha \cdot \text{Tiempo}} + Be^{-\beta \cdot \text{Tiempo}} + Ce^{-K_{AB} \cdot \text{Tiempo}}$$



RESULTADOS

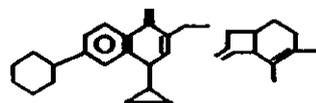
Análisis de Pureza del Estándar de la CQMEPCA

En el análisis por absorbancia de la sustancia de interés se encontró en el corte espectral un absorbancia máxima de 278.33 nm (véase anexo B). En el análisis de los precursores se encontró una absorbancia máxima de 278.33 nm para la enrofloxacin (véase anexo C) y para el precursor 7-ACA una absorbancia de 263.0 nm (véase anexo D).

El análisis del cromatograma se realizó al pico que se retuvo a los 4.4 minutos aproximadamente y al pico que se presenta al tiempo de retención de 5.2 minutos (véase anexo E). Se comparó con los precursores de la molécula: enrofloxacin y 7-ACA, con un tiempo de retención de 4.2 minutos y 2.4 minutos respectivamente (véase anexo F y G). El tiempo utilizado para la elución completa de la CQ-M-EPCA y sus precursores fue de 8 minutos. El primer pico tuvo un tiempo de retención de 4.4 minutos y corresponde a impurezas de la reacción, principalmente enrofloxacin, (véase anexo E). El pico de interés, que corresponde a la CQMEPCA, se presentó a los 5.2 minutos. Así, la sustancia no reaccionante que corresponde a la enrofloxacin equivale al 2.19%. De esta manera, la pureza del compuesto de interés CQMEPCA es aproximadamente del 97.81%.

Determinación de la CQMEPCA en suero por absorbancia (U.V.visible) en un estándar mezclado *in vitro*.

La distribución *in vitro* de CQMEPCA en suero determinada por absorbancia nos mostró que en filtrado libre de proteínas encontramos hasta un 7 %, en proteínas hasta un 84 %, y hasta un 9 % de CQMEPCA que no se pudo extraer y se calculó por diferencia porcentual, ya que se retuvo en moléculas proteicas. El análisis de las muestras de suero



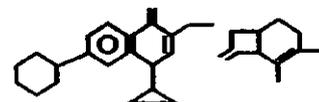
total por absorbancia es semicualitativo y cuantitativo, ya que los resultados que presenta la absorbancia, corresponden a todo lo que se absorbe del suero a 278.00 nm y no específicamente CQMEPCA. Con relación a esto, se explica que *in vitro*, estos valores difieren de los encontrados por HPLC, presentándose ligeramente más elevados. Por lo tanto, la recuperación de la CQMEPCA se calcula en aproximación $91\% \pm 0.5$.

Determinación de la CQMEPCA en proteínas plasmáticas por HPLC en un estándar mezclado *in vitro*.

La distribución *in vitro* de CQMEPCA en suero, determinada por HPLC nos mostró que el filtrado libre de proteínas resultó contener hasta 7 % y en proteínas plasmáticas mayor al 93 %, que se cuantificó de la siguiente forma: más del 70 % se determinó por extracción de CQMEPCA de las proteínas y menos del 23 % no se pudo extraer y se consideró que se retuvo en otras moléculas proteicas por lo que el cálculo se realizó por diferencia.

Determinación de la CQMEPCA por absorbancia (U.V. visible) en suero problema.

La determinación de CQMEPCA en suero total por absorbancia/U.V. visible es de 100 %. En filtrado libre de proteínas es del 7 % y en proteínas plasmáticas es del 93 %. El análisis de las muestras de suero total por absorbancia es semicualitativo y cuantitativo, ya que, los resultados que presenta la absorbancia, corresponden a todo lo que se absorbe del suero a 278.00 nm y no específicamente CQMEPCA (véase cuadro 1 y cuadro 2). El error intraensayo se estimó en < del 2% y el error interensayo del 5% aproximadamente.



Determinación de la CQMEPCA por HPLC en proteínas plasmáticas de las muestras problema.

En la determinación de CQMEPCA en proteínas plasmáticas por HPLC, se identificaron dos compuestos que corresponden a la enrofloxacin, que aparece con un tiempo de retención de 3 minutos y la CQMEPCA que aparece con un tiempo de retención de 6 minutos.

El valor teórico de la distribución de CQMEPCA en proteínas plasmáticas por HPLC es mayor al 93 % determinado por HPLC y absorbancia.

En el análisis de las proteínas plasmáticas de las muestras, por HPLC se identificaron 3 metabolitos, los cuales se retuvieron a los siguientes tiempos, y que corresponden con los determinados en el estándar:

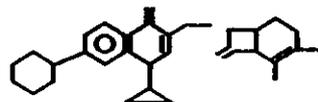
- Metabolito 1 = CQMEPCA con un tiempo de retención de 6 minutos
- Metabolito 2 = enrofloxacin con a un tiempo de retención de 3 minutos.
- Metabolito 3 = fracción no identificada con un tiempo de retención de 4 minutos.

En resumen:

El metabolito₁ + metabolito₂ + metabolito₃ = 93%. Por lo que se considera que el error intraensayo fue de no < 2% y el error inter-ensayo del 5%.

Determinación de CQMEPCA en leche de vacas sanas tratadas.

La determinación de la CQMEPCA en leche por el método de HPLC y espectrofotometría, mostró resultados en los que la presencia de la molécula en cuestión, después de haber sido administrada parenteralmente a la hora cero, aparece en leche a la hora 12 (coincidiendo con el primer ordeño), permaneciendo en las lecturas de las horas 24,



36, y 48 (cuarto ordeño). Después del cuarto ordeño, tanto las lecturas del corte espectral como del HPLC que correspondieron a las horas 60 y 72 resultaron negativos (véase cuadro 3)

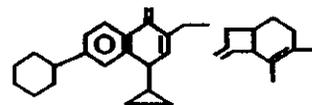
En las cuadros 1 y 2 se presentan los datos individuales de las concentraciones séricas obtenidas en cada uno de los tiempos de sangrado, tanto para los animales que recibieron la dosis de 5 mg/kg de cómo los que recibieron 10 mg/kg por las vías IM e IV en ambos casos. En las cuadros 4, 5, 6, y 7, se presentan los valores medios, desviación estándar (DE), error estándar (EE) y medianas de las concentraciones séricas referidas. En las figuras de la 10.1 a la 17.2, se ilustran las tendencias en el tiempo de las concentraciones séricas de CQMEPCA bajo los esquemas de dosificación ya referidos.

Todos los datos farmacocinéticos y promedio se presentan en los cuadros 8, 9, 10 y 11. A manera de comparación, se presenta en las figuras 18 y 19 las tendencias en el tiempo de las concentraciones séricas de la CQMEPCA a las dosis evaluadas IV, y con los dos métodos analíticos utilizados; HPLC y absorbancia UV-visible. Así mismo, en las figuras 20 y 21 se presentan el equivalente a lo anterior pero por vía IM. Considerando que las tendencias gráficas de los resultados obtenidos con los dos métodos analíticos utilizados, son similares, como se puede apreciar en todas las figuras anteriormente citadas, los datos que se expresan en las siguientes figuras, son relativos a la información que arrojó la evaluación a través del HPLC debido a su mayor sensibilidad. En la figura 22 se presenta la relación entre las concentraciones séricas después de la aplicación IV e IM a fin de ilustrar la biodisponibilidad del fármaco. Finalmente, en las figuras 24, 25, 26 y 27 se presentan las concentraciones séricas medias de la CQMEPCA y su rango poblacional.

Variables farmacocinéticas.

Véase cuadros de variables farmacocinéticas: cuadros 8, 9, 10 y 11.

F= 84 % a dosis de 10 mg/kg



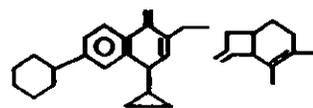
DISCUSION

La industria farmacéutica invierte continuamente gran cantidad de recursos humanos y económicos para presentar un nuevo fármaco al mercado. Los investigadores en conjunto con la industria realizan un esfuerzo muy grande para este tipo de empresas, porque están convencidos que un nuevo medicamento puede erradicar enfermedades infecciosas que incapacitan, y matan, de tal manera que aunque este producto ya se encuentre comercialmente disponible, los esfuerzos e investigaciones continúan para mejorar los beneficios que éste ofrece, evalúan la calidad de vida y los resultados económicos. El costo de mantenerlo a la venta (2).

En el ámbito de la quimioterapia de enfermedades bacterianas en medicina veterinaria, en México se ha seguido el modelo de adquirir tecnología de países del primer mundo. Una vez que ésta se adopta, se procede a su comercialización. En contraste, la CQMEPCA, es una idea original mexicana, cuyo desarrollo ha sido implementado por investigadores e instituciones nacionales. Ahora se le pretende proyectar par el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias resistentes o multiresistentes, por desgracia cada día más abundantes en nuestra industria pecuaria.

En el rubro de la investigación sobre esta molécula, se proyecta lo siguiente:

- Efectos sobre micoplasmosis en diferentes especies
- Penetración a tejidos de baja perfusión, como abscesos, grasa, sitios con fibrosis.
- Capacidad de penetración intracelular para entidades como la mastitis por *Staphylococcus aureus* forma "L".
- Evaluación de formas farmacéuticas que favorezcan su penetración, como por ejemplo con el uso de liposomas y ciclodextrinas.

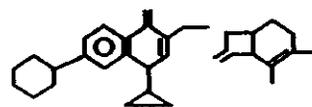


Es importante hacer énfasis en que la cefepime CQMEPCA es un fármaco del cual no se tienen citas internacionales en la literatura a excepción de las que se presentan en la introducción de este trabajo. Además, existe una patente internacional que protege a la molécula y a la serie CQ. De tal suerte, no se ha intentado desarrollar un método analítico particular a este antimicrobiano por otros investigadores. Por esta razón, se puso especial atención a constatar la pureza del fármaco a utilizar, y se considera que los errores intra e interensayo ofrecen seguridad suficiente para hacer de lo obtenido, una investigación confiable y repetible.

Los estándares internacionales de pureza de un principio activo permiten una desviación hasta de un 5% (42). En el caso de un antimicrobiano una pureza del 98% es comparable a la observada en muchos antimicrobianos como la tetraciclina, florfenicol, muchos aminoglicósidos (43). De cualquier manera la sustancia utilizada, garantizó la repetibilidad de los bioensayos que se llevaron a cabo, lo que se refleja en el tamaño de las desviaciones estándar (DE) y en la similitud entre la media y la mediana para las concentraciones séricas de la CQMEPCA, que se ilustran en las figuras 8, 9, 10 y 11,

Un dato interesante encontrado en la fase analítica de este ensayo, es la elevada confiabilidad para detectar a la CQMEPCA a través de la absorbancia por UV-visible. Esto pudo haber sido el resultado de una extracción eficiente a partir de sangre, así como debido al elevado peso molecular de la sustancia por analizar que alcanza los 630 daltones, y que permite que este espectro de luz incida sobre la molécula.

El método inicial de donde se derivó la secuencia analítica que se utilizó en este ensayo, contemplaba la extracción de cefalosporinas de tercera generación (por ejemplo ceftiofur y ceftriaxona), lo que tuvo el éxito que se detalla en resultados de una eficiencia de recuperación del 97%. Comparado con lo observado por el cuerpo técnico de Laboratorios Aranda¹. Se consideró más viable utilizar un método de extracción y analítico general derivado de cefalosporinas y no de fluoroquinolonas, debido a que el



comportamiento farmacológico y químico de la CQMEPCA la relaciona con el primer grupo y no con el segundo. Al respecto destacan algunos rasgos como el espectro antibacteriano y la unión carbamido en el grupo β -lactámico utilizado por las cefalosporinas de tercera generación y ausente en las fluoroquinolonas.

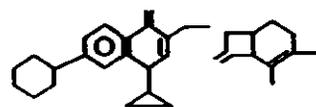
Es importante señalar que en el procedimiento que se empleó para cuantificar CQMEPCA en el filtrado libre de proteínas, se establecieron los niveles de distribución *in vitro* de la CQMEPCA. En el filtrado libre de proteínas se determinó que el valor de la CQMEPCA es menor al 7% y en proteínas plasmáticas se calculó por diferencia porcentual que resultó ser mayor a 93% del peso total de CQMEPCA en sangre. Con relación a lo anterior, se establece que *in vitro* y seguramente *in vivo*, la molécula en sangre tiene gran afinidad a unirse a proteínas plasmáticas en una proporción de 95%.

La cinética observada se ajustó a un modelo de 2 compartimentos, que pudiese incluso obedecer a un modelo de 3 compartimentos, si en estudios subsecuentes se toman muestras sanguíneas a tiempos posteriores a las 12 y 24 horas.

Las constantes híbridas K_{12} , K_{21} y K_{10} indican que la molécula tiene una elevada penetración tisular y una depuración en dos fases, una rápida y otra más lenta. Tomados en conjunto estos datos arrojan una depuración del organismo entre 0.24 y 1.55 ml/min/kg, lo que significa una permanencia promedio en el cuerpo de 35 horas, de acuerdo con el siguiente razonamiento:

Si la depuración corporal es igual a 0.34 ml/min/kg, se ajustan los ml/hora y será igual a 20.40 ml/hora/kg, que en un animal de 450 kg con 70% de su peso vivo en agua, equivaldría a 9.18 litros/hora, lo que dividido entre 315 litros de agua corporal, para eliminarlo todo, equivale a 34.31 horas de depuración completa. Esto coincide con el

¹ Dr. Juan Azuara . Jefe de la Sección Química de ID.

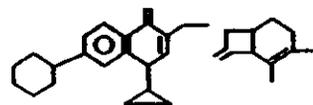


concepto de multiplicar por 10 la $T_{1/2\beta}$ para obtener el 99.99% (30, 31) de eliminación del fármaco y que arroja un valor de 30 horas para la misma dosis.

Las bajas concentraciones plasmáticas al tiempo cero muy inferiores al factor de dilución simple de dosis en volumen plasmático, revelan que el medicamento sale del compartimento central (plasma) desde su misma aplicación. Esto se refleja en elevados volúmenes aparentes de distribución en particular del V_{dc} ($X \pm DE$); $V_{d_{ss}}$ ($X \pm DE$); $V_{d_{AUC}}$ ($X \pm DE$). Esto a pesar de que el fármaco se une en gran proporción a las proteínas plasmáticas, limitando su difusión.

La biodisponibilidad que se calculó para la molécula después de su aplicación IM fue en promedio de 84%. (véase figura 22 y 23). Es posible, que este dato, no resulte definitivo para la presentación comercial final, ya que seguramente se verá modificada al mejorar las características del vehículo. Muchas cefalosporinas de tercera generación muestran una elevada unión a proteínas plasmáticas, por ejemplo el ceftiofur en un 97% (44, 45) y la ceftriaxona en un 96% (7). La CQMEPCA muestra un comportamiento similar a las cefalosporinas de tercera generación en este sentido, por lo tanto, se sugiere realizar estudios dirigidos a evaluar, si la presencia de otros fármacos como la fenilbutazona u otros antiinflamatorios no esteroideos pueden desplazar a la CQMEPCA en sus sitios de unión a las proteínas plasmáticas y aumentar la proporción del fármaco libre, con la consecuente mejoría de su biodisponibilidad y por ende, el efecto antimicrobiano. Esto ya se ha demostrado para el ceftiofur (44, 45).

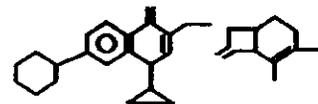
Desde el punto de vista de la relación que existe entre los CMI reportados y los valores plasmáticos absolutos de la CQMEPCA, tanto para la unida a proteínas plasmáticas como para la libre, se puede inferir que el medicamento ofrece concentraciones plasmáticas útiles, por lo menos equivalentes al doble de la CMI promedio. Si se toman en cuenta, que los valores documentados de la CQMEPCA, durante un intervalo considerable, para *Staphylococcus aureus* es de 0.06 $\mu\text{g/ml}$, y de 0.017 $\mu\text{g/ml}$ para *E. Coli* (18, 20)



Se puede también especular, que el intervalo de dosificación es aproximadamente de 8 a 18 horas a una dosis de 10 mg/kg IV, cuando se toma en cuenta el valor de la CMI para *Staphylococcus aureus* (0.01 μ g/ml) y para *E. Coli* (0.17 μ g/ml), según Johnson D. y colaboradores (20), y estableciendo arbitrariamente 1 μ g/ml como la concentración límite para bacterias poco sensibles. Esta relación se aprecia en la figura 24. Sin embargo, por referencia a la figura 25, los mismos valores fluctúan entre 4 y 13 horas cuando se utilizan tan solo 5mg/kg IV.

En la figura 26 se extienden al eje de la X, regresiones polinomiales a la dosis de 10mg/kg IM y se detecta que el intervalo de dosificación medio puede ser hasta de 16 horas, recorriéndose desde las 12 horas para los animales que depuran más rápido la CQMEPCA. En casos de tratamientos contra microorganismos resistentes a concentraciones inferiores a 1 μ g/ml, el intervalo de dosificación será de 4 a 6 horas, o bien, se recomendaría que la medicación se realizara por vía intravenosa.

En este trabajo no se exploró la posibilidad de que existiera una fase de eliminación lenta (γ) posterior a la fase β . En la farmacología existen diversos ejemplos de medicamentos, como los aminoglicósidos, que después de una fase de distribución, eliminación, se manifiesta una fase de eliminación lenta de fijación a tejidos, que en el caso de éstos, penetran a las células tubulares del riñón, de donde son eliminados lentamente después de la fase β de 16 a 30 horas (46). Esto mismo sucede con la polimixina B e incluso con la cefalotina pero solo en riñones que presentan una deficiente capacidad de depuración (23, 46). Estas consideraciones pueden aplicarse a la cefquinolona en estudio y son necesarias para determinar la residualidad del producto si llegara a utilizarse en medicina veterinaria. Al respecto, se realizaron estudios de determinación de la CQMEPCA en leche, con resultados que sugieren que si existe una fase γ en la eliminación de estos productos, pues se le detectó en leche, aún a las 60 horas de haber sido administrado el medicamento, lo que representa el doble del tiempo promedio de la depuración calculado, además cabe mencionar, que la eliminación de residuos en leche, por lo general, es más corta para la mayoría de los fármacos en el cuerpo (20, 26, 47, 48).



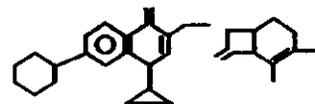
Otro indicio de que puede existir dicha fase γ , es el hallazgo de un tercer metabolito detectado a través del HPLC con un tiempo de retención de 4 minutos, que sugiere ser un producto de la biotransformación de la CQMEPCA y que posiblemente se encuentre conjugado con otras moléculas, ya que su tiempo de retención fue superior al del residuo de enrofloxacin (3 minutos) e inferior al tiempo de retención del compuesto progenitor (6 minutos) (véase anexo H).

Aunque en este ensayo no se realizaron ensayos clínicos controlados, por ser posteriores a la determinación de la farmacocinética, se les tiene contemplados a futuro. Por lo pronto se ha observado que la eficacia clínica en el tratamiento de la neumonía en becerros² aumenta cuando se les aplica cada 12 horas, lo que coincide con los datos cinéticos ya descritos.

Es difícil citar desarrollos farmacéuticos de moléculas diseñadas en el país. Esto se debe entre otras cosas, a que esta tarea requiere una inversión millonaria y de 6 a 10 años de investigación. Una vez lograda la síntesis y caracterización de la sustancia en cuestión, se deberán realizar estudios de farmacocinética en todas las especies en la que se pretenda usar el antimicrobiano (2). En Estados Unidos de América, para entrar al mercado veterinario, a fin de llenar los requisitos básicos de: eficacia, calidad farmacéutica, inocuidad para los animales, inocuidad medio-ambiental e inocuidad para el hombre (residuos). El apego a estos requisitos, puede explicar la diferencia que existe entre el número y la variedad de fármacos registrados en el país y los disponibles en los otros dos países miembros del Tratado de Libre Comercio (47).

Con los datos farmacocinéticos obtenidos y en virtud de la potencia antibacteriana de esta molécula, es factible asegurar que, previo a un diseño de farmacia, para encontrar el mejor vehículo, se puede contar ya con el primer antibiótico de diseño y desarrollo

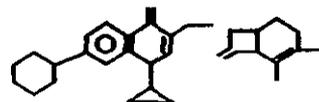
² Boletín Técnico de Laboratorios Aranda 1998. Sumano. Ocampo, Páez. Ensayo clínico realizado en Tizayuca Hgo. Departamento de Farmacología. FMVZ. UNAM.



completamente mexicano. En este sentido, cabe destacar, que a la fecha del presente escrito, no se ha generado en México ningún antimicrobiano (tanto para medicina humana como medicina veterinaria) que haya alcanzado este nivel de desarrollo. Es entonces, ésta, una oportunidad para que diversas instituciones coparticipen para la realización de la fase clínica en las especies veterinarias y mejor aún en la medicina humana.

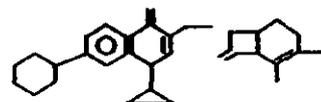
De no contar con un sistema de evaluación de registro de medicamentos de igual rigor que el de los países mencionados, se corre el peligro de ser “invadido” por productos del extranjero, convirtiendo al país en un campo de pruebas preclínicas, con las evidentes consecuencias para la salud pública y animal. Por otro lado la industria farmacéutica misma, puede enfrentarse a crisis severas como se ha comentado en diversos foros. Por ello resulta impostergable, crear un Centro Independiente de Constatación de Residuos y Eficacia Farmacológica (CICREF), preferentemente a nivel universitario, que, en coordinación con las dependencias reguladoras de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, y Desarrollo Rural , la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica, y otras dependencias interesadas, presten asistencia técnica para la regulación del uso de los fármacos en la línea veterinaria, así como para generar la información técnica que se le da al médico veterinario sobre cada preparado. (41, 49).

Dados los avances tecnológicos de la medicina y la química moderna, los productos que parecían inimaginables hace un par de décadas, pueden ser producidos sintéticamente en la actualidad. Pero aún, gozando de este privilegio, el uso y abuso indiscriminado de medicamentos, que en su momento, han revolucionado la terapéutica, podrían llegar a un no muy lejano término, debido al desarrollo de infecciones producidas por microorganismos altamente resistentes, y por la lentitud en el avance de nuevas opciones, además del costo económico y tiempo que implica el desarrollo de un fármaco innovador y efectivo.

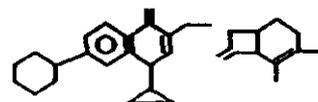


BIBLIOGRAFIA

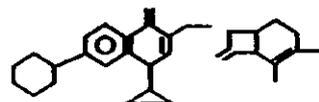
1. Pharmaceutical Manufacturers Association. Pocket facts. Pharmaceutical Manufacturers Association, Washington, D.C. 1993
2. Billstein S.A. How the pharmaceutical Industry Brings an Antibiotic Drug to Market in the United States. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 1994. vol. 38 No 12. 2679-2682.
3. Alper, J. Drug Discovery on the assembly line. *Science* 1993. 264:1399-1400.
4. Más de 20 millardos de dólares en I+D. *Horizontes Salud* No 34. 1988.
5. Sumano, H. Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Vet. Mex.* 1993. 24: 83-92
6. Capril, K.A.: The cephalosporin antimicrobial agents: a comprehensive review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics II*: 1988.1-32
7. Thomson, T.D., Quay, J.F.; Webber, J.A.: Cephalosporin group of antimicrobial drugs. *JAVMA*, 1984. vol 185: No 10. November 15,
8. Jones, R.N. Impact of changing pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in the treatment of serious infections in hospitalized patients. *American Journal of Medicine*. 1996. 110:3S-12S
9. Botter, A., Schmid, P., and Humke, R.: In viro efficacy of cefquinome (INN) and other anti-infective drugs against bovine bacterial isolates from Belgium, France, Germany, The Netherlands, and United Kingdom. *Zentralbl Veterinarmed Berlin*. 1995. 42: 377-383
10. Elkhaili, H.; Linger, L.; Monteil, H.; Jehl, F. High-performance liquid chromatographic assay for cefepime in serum. *Journal of Chromatography B*. 1997. 690 181-188.
11. Albercht, R.: Development of antibacterial agents of the nalidixic acid type. *Prog. Drug Res.* 1977. 21: 99-104.
12. Prescott, J.f.; Baggott, J.D.: *Terapéutica antimicrobiana Veterinaria*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1991.



13. Memorias. Problemática del uso de Antimicrobianos en farmacología Veterinaria. FMVZ. UNAM. 3-6 abril de 1995. Asociación Mexicana de farmacología Veterinaria. Departamento de Fisiología y Farmacología. 1995
14. Ito, A.; Hirai, K.; Inove, M.; koga, H.; Suzue, S.; Irikure, T; Misahushi, S.: The in vitro antibacterial activity of AM-715 a new nalidixic acid analogue. *Antimic Agents Chem.* 1980. 17: 103-108.
15. Bergan, t.: Quinolones In: *Antimicrobial Annual 2.* 1987. Elsevier. Amsterdam, Holland,
16. Chu, D.T.W and Fernández, P.B.: Structure activity relationship of the fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chomother.* 1989. 33: 131-135.
17. Santamaria, J.A.: Eficacia clínica de un preparado intramamario a base de una cefaquinolona experimental (CQEPCA-600M), para el tratamiento de la mastitis bovina. (Tesis de licenciatura). México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 1997.
18. Méndez, L.A.: Evaluación de la potencia y determinación del espectro antibacteriano de una cefaquinolona de desarrollo nacional. (Tesis de licenciatura). México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM 1996.
19. Smith,C.M.; Reynard, A.M.: *Farmacología.* Ed. Médica Panamericana. España. 1993.
20. Johnson, D.; Erwin, M. And Jones, R.N.: Antimicrobial activity and spectrum of novel cephalosporin-fluoroquinolone dual action compounds (DAC), CQEPCTM-397 and CQEPTM (414). September 15-18 1996. In American society for Microbiology. Proceeding of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. New Orleans, Louisiana. 1996: 128
21. United States Pharmacopeia Drug Information for the Health Care Professional. Vol 1 15TH edition 1995.
22. Maniatis, E.K. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, "2nd ed. Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor Press, N.Y.) 1989.
23. Sumano, L.H., Ocampo, C.L.: *Farmacología Veterinaria.* Mc Graw Hill. México. Segunda Edición. 1997.
24. Ovalle, A.I.: Farmacocinética de la Cefaquinolona (CQEPCA) en perros). (Tesis de licenciatura). México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 1996.



25. Sumano, H., Mateos, G., Hevia del Puerto C., Ocampo, L.: Pharmacokinetics, Tolerance and clinical efficacy of the cephaquinolone, CQEPCA-663, in dogs affected with various respiratory bacterial infections. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 1998. vol 53 (2),
26. Ocampo, C.L., Sumano, L.H. Uso de un nuevo antibacteriano, la CQMEPCA, para el tratamiento sistémico de la mastitis clínica. *Memorias del Congreso Panamericano de control de mastitis y calidad de la leche*. Mérida, Yucatán, México. 23 al 27 marzo de 1998
27. Bennet, J.B., Brodie, J.L, Benner, E.J. and Kirby, W.M.: Simplified accurate method for antibiotic assay. *Clinical specimens*. *Amer. Soc. Of Microb.* 1966.14: 170-177.
28. Sumano, H., Ocampo, L. And Corpi, M.A.: Antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in poultry of a new cephalosporin-fluoroquinolone (CQ) molecule. *Journal of Applied Animal Research* 13/1-2 1998. 169-178.
29. Adams, R.: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Iowa State University Press. U.S.A., 1995.
30. Sumano, H., Ocampo, L.: Bases Farmacológicas de la vigilancia de residuos en productos de origen animal. *Vet. Mex.* 1995. 26 (3)
31. Craigmill, A.L. Sundlof, S.F. and Riviere, J.E.: *Handbook of Comparative Pharmacokinetics and Residues of Veterinary Therapeutics Drugs*. CRC press, Boca Raton. Florida. 1994.
32. Crawford, L.M. and Franco, D.A.: *Animal Drug and Human Health*. Technomic. Lancaster, Pennsylvania, 1994.
33. Sundolf, S.F., Craigmill, A.L. and Riviere, J.E.: Food Animal Residue avoidance databank (FARAD): A pharmacokinetic-based information resource. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1986. 9:237-245.
34. DiCesare, J.L., Dong, M.W., Etre, L.S.: *Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Velocidad*. Perkin-Elmer. Primera Edición. Impreso en España.
35. Burgos, L., A. Review of the veterinary drug approval process. *Pharmaceutical Engineering*. 1996. July/august. 48-49.
36. Sudip K. Das, Bijan K., Gupta. *Drug Regulatory Affairs. Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1988.14 (12), 1673-1697.

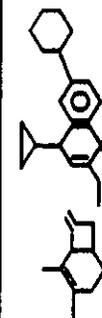


37. García, M.E: Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía UNAM, 3ª edición, México, D.F.1981.
- 38 Rule, R., Quiroga, G.H., Rubio, M., Buschiazzo, H.O. and Buschiazzo, P.M.: The pharmacokinetics of ceftazidime in lactating and non-lactating cows. *Veterinary Research Communication*, 1996. 20 543-550.
- 39 Harper. *Bioquímica. Editorial Manual Moderno*. pp 609-613
- 40 Rowland, M., Tozer, T.N. Variability. In *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications* 2nd Ed. Lea & Febiger, Philadelphia. pp. 197-211. 1989.
- 41 Sumano, H., Ocampo, L.: Bases Farmacológicas de la vigilancia de residuos en productos de origen animal. *Vet. Mex.* 1995. 26 (3).
- 42 The application of chapte 1 of part two of the annex to directive 81/852/EEC with a view of demonstration of the safty of veterinary medicinal product. Commission of the European Communities, 111/3897/88 EN. 42pp.
- 43 The Merk Index. Eleventh Edition. Centennial Edition. Merk & Co., Inc. Rahway, N.J. U.S.A. 1990.
- 44 Brown S.A., Chester S.T. and Robb E.J. Effect of age on the pharmacokinetics of single dose ceftiofur sodium administered intramuscularly or intravenously to cattle. *J. Vet. Pharm and Ther.* 1997. 20 (5).
- 45 Courtin F., Craigmill S.E.,Wetzlich S.E., Gustafson R.C., and Arndt T.S. Pharmacokinetics of ceftiofur and metabolites after single intravenous and intramuscular administration and multiple intramuscular administrations of ceftiofur sodium to dairy goats. *J. Vet. Pharm and Ther.* 1996. 19 (1).
- 46 Sumano H., Brumbaugh G. W. *Farmacología clínica de los aminoglicósidos y los aminociclitoles en medicina veterinaria.* *Vet. Mex.* 1995. 26 1-15.
- 47 Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud. *Codex Alimentarius* vols 1-7, Secretaría del Programa Conjunto Fao/OMS, Roma 1994.
- 48 Sumano, H., Brumbaugh,G., Mateos, G. Bases Farmacológicas del tratamiento de la mastitis bovina. *Vet. Mex.*1996 27 (1).
- 49 Soberón, G., Martuscelli, J., Quintero, R., *Salud y Tratado de Libre Comercio. Ciencia y Tecnología.* 1994.20. 14-21.

VACAS MEDICADAS POR VIA IV A DOSIS DE 10 mg/kg DE CQMEPCA												
TIEMPO	VACA 1		VACA 2		VACA 3		VACA 4		VACA 5		VACA 6	
Horas	Microgramos de CQMEPCA por mililitro de suero											
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
0.08	45	13.8	20.64	6.2	35.17	10.55	17.1	5.18	26.57	7.9	21.23	6.36
0.16	41	12.3	18.42	5.52	30.86	9.25	16.18	4.25	20.22	6.03	18.54	5.56
0.25	40.11	12.03	15.93	4.77	28.85	8.65	10.92	3.25	19.42	5.89	17.32	5.19
0.5	32.47	9.74	10.6	3.18	14.69	4.4	8.22	2.46	17.13	5.36	15.36	4.6
1	21.99	6.59	8.14	2.44	10.62	3.18	5.5	1.65	15.04	4.58	10.48	3.14
2	18.79	5.63	6.34	1.91	7.55	2.25	2.64	0.79	10.56	3.16	6.25	1.87
4	8.47	2.56	4.59	1.37	5.58	1.67	1.99	0.59	5.95	1.77	4.12	1.23
8	6.22	1.86	2.88	0.89	2.15	0.65	0.5	0.15	2.17	0.65	1.98	0.59

VACAS MEDICADAS POR VIA IV A DOSIS DE 5 mg/kg DE CQMEPCA												
TIEMPO	VACA 7		VACA 8		VACA 9		VACA 10		VACA 11		VACA 12	
Horas	Microgramos de CQMEPCA por mililitro de suero											
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
0.08	32.56	9.88	28.41	8.52	22.57	6.43	23.56	7.06	28.41	8.41	25.67	7.78
0.16	32.95	9.51	23.59	7	20.32	6.03	22.14	6.52	25.59	7.53	23.59	6.9
0.25	27.38	8.21	19.12	6	17.24	5.13	17.12	5.06	16.48	5.1	19.74	5.78
0.5	11.87	3.56	13.08	3.2	14.16	4.25	11.87	3.41	13.08	3.91	14.16	4.21
1	10.67	3.2	8.45	2.35	10.29	2.74	9.15	2.13	9.01	2.71	11.2	3.35
2	7.12	2.13	6.12	1.83	9.58	2.21	7.12	1.95	6.12	1.95	8.12	2.45
4	2.08	0.62	4.97	1.49	4.12	1.23	2.08	0.65	3.2	0.96	3.67	1.11
8	1.84	0.55	2.35	0.78	1.06	0.31	1.05	0.31	1.01	0.33	1.06	0.63

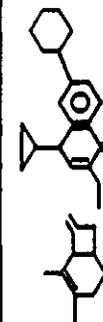
CUADRO 1: Concentraciones séricas de CQMEPCA en vacas que recibieron una dosis del fármaco al 10% por vía IV.



VACAS MEDICADAS POR VIA IM A DOSIS DE 10 mg/kg DE CQMEPCA												
TIEMPO	VACA 13		VACA 14		VACA 15		VACA 16		VACA 17		VACA 18	
Horas	Microgramos de CQMEPCA por mililitro de suero											
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
0.25	2.7	0.81	1.56	0.91	0.8	0.24	3.12	0.93	1.09	0.32	2.56	0.76
0.75	8.64	2.59	6.66	1.99	7.86	2.35	5.27	1.58	5.42	1.62	6.45	1.93
1.5	10.56	3.168	8.65	3.26	9.87	2.96	12.14	3.64	11.48	3.44	10.23	3.06
3	7.17	2.15	5.53	1.65	4.8	1.44	7.23	2.16	5.84	1.76	8	2.4
6	5.2	1.56	2.38	0.714	2.5	0.75	4.1	1.23	3.97	1.11	2	0.6

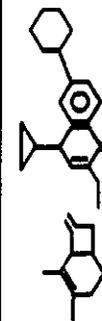
VACAS MEDICADAS POR VIA IM A DOSIS DE 5 mg/kg DE CQMEPCA												
TIEMPO	VACA 19		VACA 20		VACA 21		VACA 22		VACA 23		VACA 24	
Horas	Microgramos de CQMEPCA por mililitro de suero											
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
0.25	0.9	1.27	1.7	0.51	1.01	0.3	1.78	0.53	1.7	0.51	0.95	0.23
0.75	3.14	0.94	2.98	0.88	3.94	1.18	3.14	0.942	3.2	0.96	2.2	0.66
1.5	9.22	2.76	8.63	2.55	8.12	2.43	10.59	3.17	7.45	2.23	9.47	2.81
3	4.39	1.31	7.29	2.27	4.84	1.45	5.37	1.61	6.14	1.92	5.1	1.53
6	2.2	0.66	1.1	0.33	0.59	0.15	2.9	0.87	1.1	0.33	1	0.3

CUADRO 2: Concentraciones séricas de CQMEPCA en vacas que recibieron una dosis fármaco al 10% por vía IM.



PRESENCIA DE CQMEPCA EN SUERO DE LECHE				
Tiempo Horas	UV-visible		HPLC	
	CQMEPCA	Enrofloxacin	CQMEPCA	Enrofloxacin
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
24	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
36	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
48	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
60	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
72	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

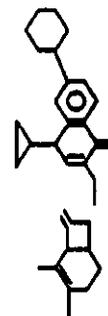
CUADRO 3: Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de enrofloxacin en suero de leche de vacas dosificadas con 10 y 5 mg/kg vía IM.



VACAS MEDICADAS POR VIA IV A DOSIS DE 10 mg/kg DE CQMEPCA				
TIEMPO (horas)	MEDIA	MEDIANA	DE [Er ±]	EE [Er ±]
0.08	8.33167	7.13	3.26725	1.33385
0.16	7.15167	5.64	3.02595	1.23534
0.25	6.63	5.54	3.18577	1.30058
0.5	4.95667	4.5	2.56398	1.04674
1	3.59667	3.16	1.75707	0.71732
2	2.60167	2.08	1.66746	0.68074
4	1.53167	1.52	0.6538	0.26691
8	0.79833	0.65	0.57329	0.23404

VACAS MEDICADAS POR VIA IV A DOSIS DE 5 mg/kg DE CQMEPCA				
TIEMPO (horas)	MEDIA	MEDIANA	DE [Er ±]	EE [Er ±]
0.08	8.11833	8.019	1.217	0.49684
0.16	7.35333	6.95	1.20699	0.49275
0.25	5.76667	4.45	1.25043	0.51049
0.5	3.70667	3.48	0.38578	0.15749
1	2.64	2.72	0.36813	0.15029
2	2.00333	4.08	0.13952	0.05696
4	0.985	1.03	0.33519	0.13684
8	0.435	0.44	0.19264	0.07864

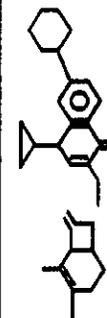
CUADRO 4: Valores estadísticos de la determinación por HPLC de las vacas dosificadas por vía IV.



VACAS MEDICADAS POR VIA IV A DOSIS DE 10 mg/kg DE CQMEPCA				
TIEMPO (horas)	MEDIA	MEDIANA	DE [Er ±]	EE [Er ±]
0.08	27.61833	23.9	10.58671	4.32201
0.16	24.20333	19.38	9.71803	3.96737
0.25	22.09167	18.37	10.61145	4.33211
0.5	16.41167	15.02	8.5245	3.48011
1	11.96167	10.55	5.83776	2.38326
2	8.68833	13.89	5.5657	2.27219
4	5.11667	5.08	2.1541	0.87941
8	2.65	2.16	1.9157	0.78208

VACAS MEDICADAS POR VIA IV A DOSIS DE 5 mg/kg DE CQMEPCA				
TIEMPO (horas)	MEDIA	MEDIANA	DE [Er ±]	EE [Er ±]
0.08	26.86333	27.04	3.68796	1.5056
0.16	24.69667	23.59	4.40583	1.79867
0.25	19.51333	18.18	4.05432	1.65517
0.5	13.03667	13.62	1.02467	0.41832
1	9.795	9.72	1.07944	0.44068
2	7.36333	7.12	1.31881	0.5384
4	3.35333	3.43	1.14612	0.4679
8	1.395	1.06	0.56599	0.23107

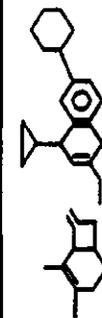
CUADRO 5: Valores estadísticos de la determinación por HPLC de las vacas dosificadas por vía IV.



VACAS MEDICADAS POR VIA IM A DOSIS DE 10 mg/kg DE CQMEPCA				
TIEMPO (horas)	MEDIA	MEDIANA	DE [Er ±]	EE [Er ±]
0.25	0.66167	0.78	0.30328	0.12381
0.75	2.01	1.96	0.39895	0.16287
1.5	3.25467	3.21	0.25104	0.10248
3	1.92667	1.95	0.36593	0.14939
6	0.994	0.92	0.36951	0.15085

VACAS MEDICADAS POR VIA IM A DOSIS DE 5 mg/kg DE CQMEPCA				
TIEMPO (horas)	MEDIA	MEDIANA	DE [Er ±]	EE [Er ±]
0.25	0.55833	0.51	0.37054	0.15127
0.75	0.927	0.941	0.16673	0.06807
1.5	2.65833	2.65	0.32939	0.13447
3	1.68167	1.57	0.35295	0.14409
6	0.44	0.33	0.26877	0.10973

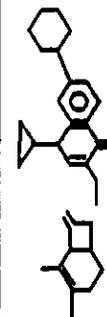
CUADRO 6: Valores estadísticos de la determinación por HPLC de las vacas dosificadas por vía IM.



VACAS MEDICADAS POR VIA IM A DOSIS DE 10 mg/kg DE CQMEPCA				
TIEMPO (horas)	MEDIA	MEDIANA	DE [Er ±]	EE [Er ±]
0.25	1.97167	2.06	0.95025	0.38794
0.75	6.71667	6.55	1.33078	0.54329
1.5	10.48833	10.39	1.22842	0.5015
3	6.42833	6.50	1.22209	0.49891
6	3.35833	3.23	1.25339	0.51169

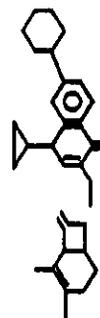
VACAS MEDICADAS POR VIA IM A DOSIS DE 5 mg/kg DE CQMEPCA				
TIEMPO (horas)	MEDIA	MEDIANA	DE [Er ±]	EE [Er ±]
0.25	1.34	1.05	0.426	0.17392
0.75	3.1	3.14	0.55555	0.2268
1.5	8.91333	8.92	1.10147	0.44967
3	5.52167	5.23	1.04456	0.42644
6	1.48167	1.1	0.87705	0.35805

CUADRO 7: Valores estadísticos de la determinación por espectrofotometría (absorbancia UV-VIS) de las vacas dosificadas por vía IM.



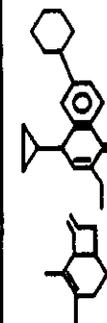
ADMINISTRACION INTRAVENOSA									
10 mg/kg de peso									
VARIABLES	VACA 1	VACA 2	VACA 3	VACA 4	VACA 5	VACA 6	X	DE	MED
AUCM $\mu\text{g/hr/ml}$	192.4	144.06	114.19	12.79	60.78	92.04	102.71	62.99	103.11
AUC $\mu\text{g/hr/ml}$	40.71	20.26	21.71	6.41	20.85	17.38	21.22	11.09	20.55
T. Residenc.	4.71	7.10	5.29	1.99	2.91	5.29	4.54	1.83	5.15
Vdc (l/kg)	0.674	1.35	0.77	1.5	0.16	1.51	0.99	0.54	1.06
Vd _{area} (l/kg)	1.3	4.11	2.88	3.54	1.5	3.83	2.86	1.20	3.21
Vd _{ss} (l/kg)	1.16	3.52	2.42	3.1	1.39	3.04	2.43	0.96	2.73
α (hr ⁻¹)	1.76	3.03	2.78	4.98	43.09	1.20	9.47	16.51	2.9
β (hr ⁻¹)	0.19	0.12	0.16	0.44	0.32	0.15	0.23	0.12	0.17
A ($\mu\text{g/ml}$)	7.93	4.96	9.99	4.17	55.16	4.50	14.45	20.07	6.44
B ($\mu\text{g/ml}$)	6.91	2.41	2.90	2.46	6.30	2.09	3.84	2.16	1.34
T _{1/2} α (hr)	0.39	0.22	0.24	0.139	0.016	0.57	0.26	0.19	0.23
T _{1/2} β (hr)	3.62	5.33	4.31	1.569	2.15	4.51	3.58	1.45	3.96
Cl _s (ml/min/kg)	0.247	0.493	0.46	1.55	0.48	0.57	0.63	0.46	0.48
Cp ₀ ($\mu\text{g/ml}$)	14.85	7.37	12.89	6.63	61.46	6.59	18.29	21.43	10.13
K ₁₂ (hr ⁻¹)	0.66	1.71	1.59	2.26	35.76	0.49	7.07	14.06	1.65
K ₂₁ (hr ⁻¹)	0.92	1.08	0.75	2.12	4.70	0.48	1.67	1.58	1
K ₁₀ (hr ⁻¹)	0.36	0.36	5.94	1.03	2.94	0.37	1.83	2.24	0.7

Cuadro 8: Relación de la media, desviación estándar y mediana de las variables farmacocinéticas de la CQMEPCA inyectada por vía IV a dosis de 10 mg/kg en vacas sanas.



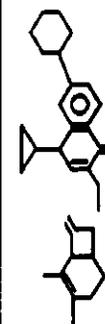
ADMINISTRACION INTRAVENOSA									
5 mg/kg de peso									
VARIABLES	VACA 7	VACA 8	VACA 9	VACA 10	VACA 11	VACA 12	X	DE	MED
AUCM $\mu\text{g/hr/ml}$	41.45	151.44	49.52	33.68	36.02	50.54	60.44	45.10	45.48
AUC $\mu\text{g/hr/ml}$	14.37	20.97	14.54	11.41	12.96	15.87	15.02	3.28	14.45
Tiempo. Residenc.	2.88	7.21	3.40	2.95	2.77	3.18	3.69	1.63	3.06
Vdc (1/kg)	0.78	3.63	1.37	1.14	0.90	1.06	1.48	1.07	1.1
Vd _{area} (1/kg)	1.3	2	1.32	1.51	1.24	1.08	1.4	0.32	1.31
Vd _{ss} (1/kg)	1	1.72	1.17	1.29	1.07	1	1.2	0.27	1.12
α (hr^{-1})	3.02	3.60	2.56	3.44	4.73	4.10	3.57	0.77	3.52
β (hr^{-1})	0.27	0.12	0.26	0.29	0.31	0.29	0.25	0.06	0.28
A ($\mu\text{g/ml}$)	9.56	8.45	3.80	5.94	7.38	5.15	6.71	2.14	6.66
B ($\mu\text{g/ml}$)	3.11	2.30	3.48	2.82	3.64	4.25	3.26	0.67	3.29
T $\frac{1}{2}$ α (hr)	0.22	0.19	0.27	0.20	0.14	0.16	0.19	0.04	0.19
T $\frac{1}{2}$ β (hr)	2.49	5.61	2.59	2.37	2.17	2.38	2.93	1.31	2.43
Cl _s (ml/min/kg)	0.35	0.24	0.34	0.43	0.38	0.31	0.34	0.06	0.34
Cp ₀ ($\mu\text{g/ml}$)	12.67	10.75	7.28	8.76	11.02	9.4	9.98	1.89	20.15
K ₁₂ (hr^{-1})	1.47	2.34	0.96	1.65	2.42	1.78	1.77	0.54	1.71
K ₂₁ (hr^{-1})	0.95	0.86	1.36	1.30	1.77	2.01	1.37	0.44	1.33
K ₁₀ (hr^{-1})	0.88	0.51	0.50	0.76	0.85	0.59	0.68	0.17	0.67

Cuadro 9: Relación de la media, desviación estándar y mediana de las variables farmacocinéticas de la CQMEPCA inyectada por vía IV a dosis de 5 mg/kg en vacas sanas.



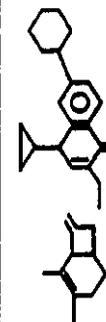
ADMINISTRACION INTRAMUSCULAR									
10 mg/kg de peso									
VARIABLES	VACA 13	VACA 14	VACA 15	VACA 16	VACA 17	VACA 18	X	DE	MED
AUCM µg/hr/ml	94.21	117.42	105.39	121.46	145.03	98.13	113.60	18.69	111.40
AUC µg/hr/ml	18.01	18.05	17.97	18.08	17.43	18.56	18.01	0.35	18.04
Tiempo Residenc. horas	5.23	7.21	6.58	6.71	8.31	7.19	6.87	1	6.95
T ½ α (hr)	0.46	0.61	0.99	1.07	0.85	0.87	0.80	0.23	0.86
T ½ β (hr)	3.24	5.22	7.24	7.43	8.01	6.91	6.34	1.78	7.075
Cpmax (µg/ml)	3	2.9	1.1	1.5	1.4	1.5	1.9	0.82	1.5
Tmax (hs)	1.2	1.52	2.9	3	2.9	3	2.42	0.82	2.9
K ₁₂ (hr ⁻¹)	0.33	0.76	0.35	0.17	0.30	0.22	0.35	0.20	0.31
K ₂₁ (hr ⁻¹)	1.08	0.02	0.11	0.14	0.16	0.16	0.27	0.39	0.15
K ₁₀ (hr ⁻¹)	0.29	3.71	0.53	0.42	0.43	0.41	0.96	1.34	0.42

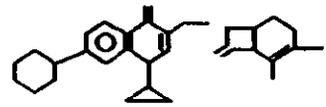
Cuadro 10: Relación de la media, desviación estándar y mediana de las variables farmacocinéticas de la CQMEPCA inyectada por vía IM a dosis de 10 mg/kg en vacas sanas.



ADMINISTRACION INTRAMUSCULAR									
5 mg/kg de peso									
VARIABLES	VACA 19	VACA 20	VACA 21	VACA 22	VACA 23	VACA 24	X	DE	MED
AUCM $\mu\text{g/hr/ml}$	22.36	27.14	17.37	21.38	24.53	19.15	21.98	3.54	21.87
AUC $\mu\text{g/hr/ml}$	8.64	9.40	6.93	8.22	8.39	7.59	8.19	0.85	8.3
Tiempo Residenc.	2.58	2.88	2.50	2.73	2.92	2.26	2.64	0.24	2.65
$T_{1/2\alpha}$ (hr)	1.61	0.48	0.35	0.39	0.55	0.74	0.68	0.47	0.51
$T_{1/2\beta}$ (hr)	1.62	0.49	0.35	0.38	0.92	0.78	0.75	0.47	0.63
Cpmax ($\mu\text{g/ml}$)	1.5	1.8	1.5	1.5	1.7	1.45	1.57	0.14	1.5
Tmax (hs)	2	2.95	2.5	3	2.5	3	2.65	0.40	2.75
K_{12} (hr^{-1})	8.25	9.07	19.47	11.43	9.28	10.61	11.35	4.13	9.94
K_{21} (hr^{-1})	0.24	0.56	0.38	0.71	0.51	0.42	0.47	0.16	0.47
K_{10} (hr^{-1})	0.74	1.03	0.98	0.83	0.78	0.85	0.86	0.11	0.79

Cuadro 11: Relación de la media, desviación estándar y mediana de las variables farmacocinéticas de la CQMEPCA inyectada por vía IM a dosis de 5 mg/kg en vacas sanas.





DETERMINACION POR ABSORBANCIA UV-VIS DE CQMEPCA
A 10 mg/kg IV.

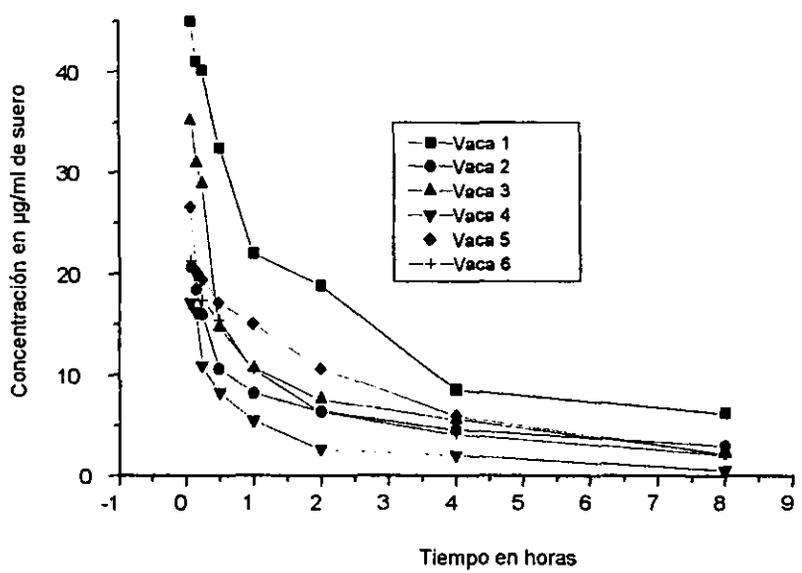


Figura 10.1. Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis bolo de 10 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.

DETERMINACION POR ABSORBANCIA UV-VIS DE
CQMEPCA A 10 mg/kg IV

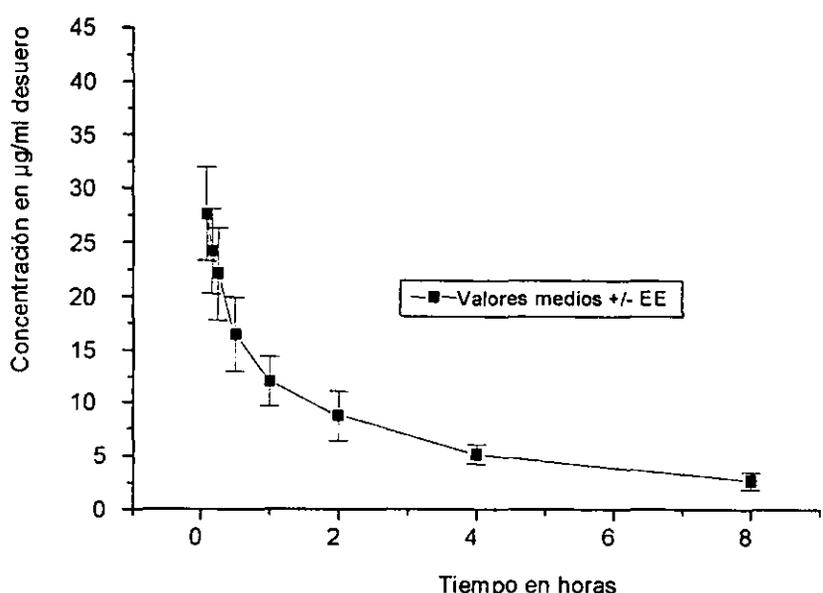
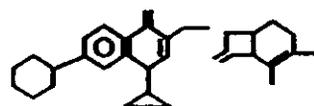


Figura 10.2. Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis bolo de 10 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.



DETERMINACION POR ABASORBANCIA UV-VIS DE CQMEPCA A 5 mg/kg IV

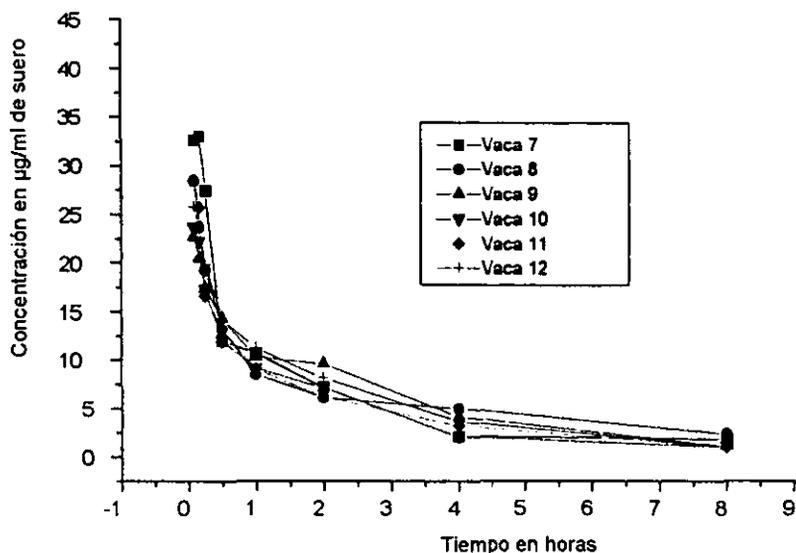


Figura 11.1. Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis bolo de 5 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por absorbanca UV-visible.

DETERMINACION POR ABASORBANCIA UV-VIS DE CQMEPCA A 5 mg/kg IV

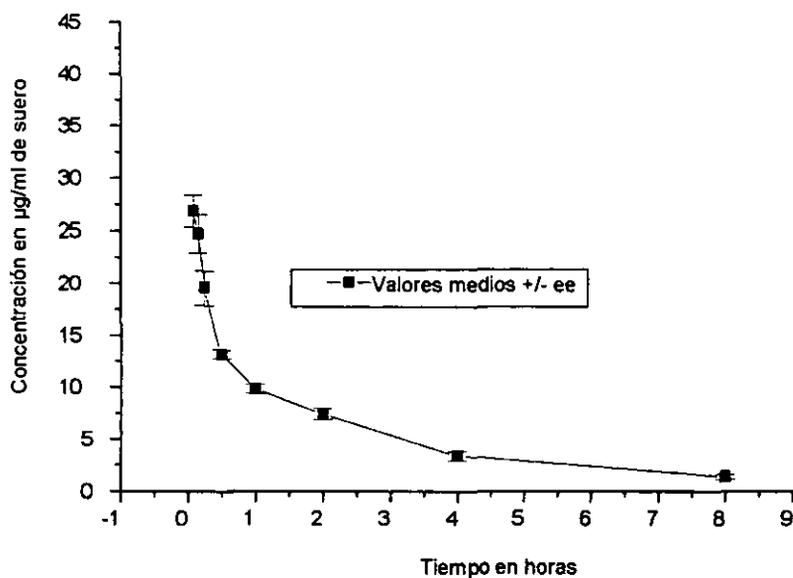


Figura 11.2. Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis bolo de 5 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por absorbanca UV-visible.

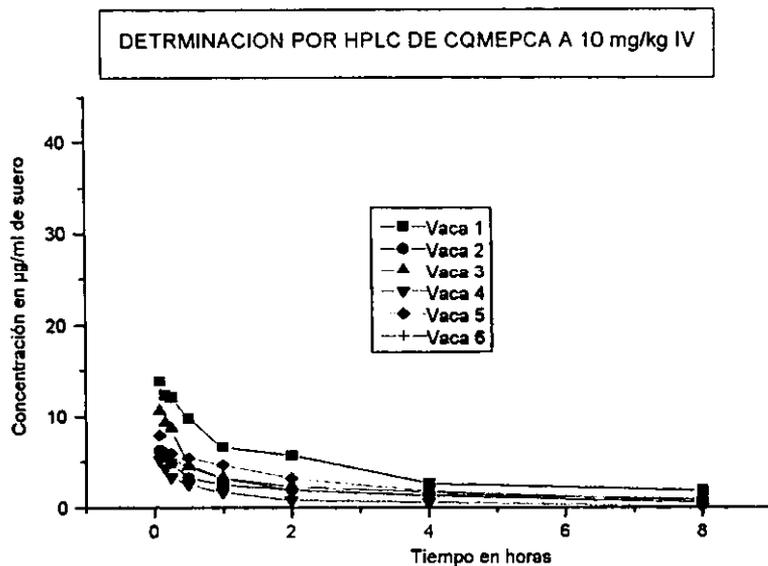
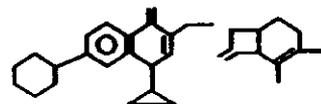


Figura 12.1. Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis bolo de 10 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por HPLC.

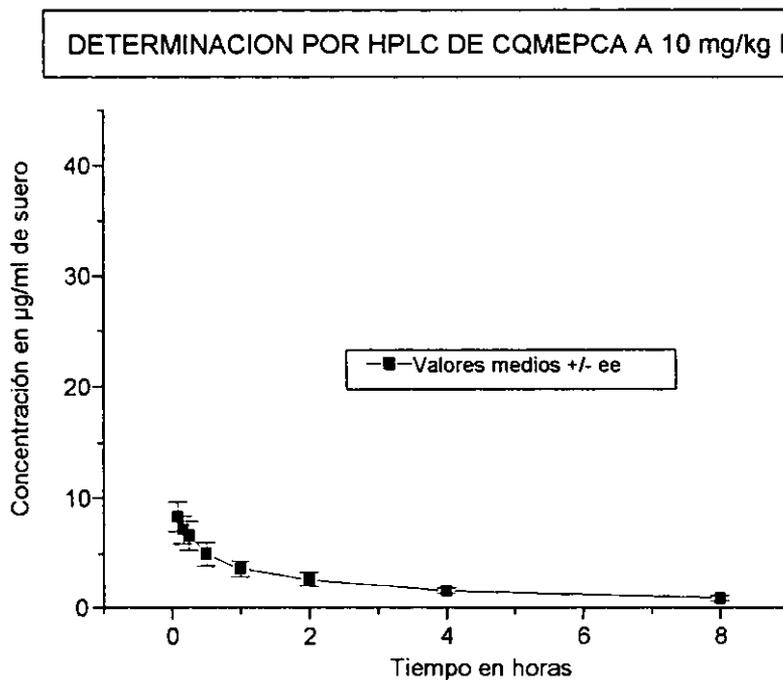


Figura 12.2. Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis bolo de 10 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por HPLC.

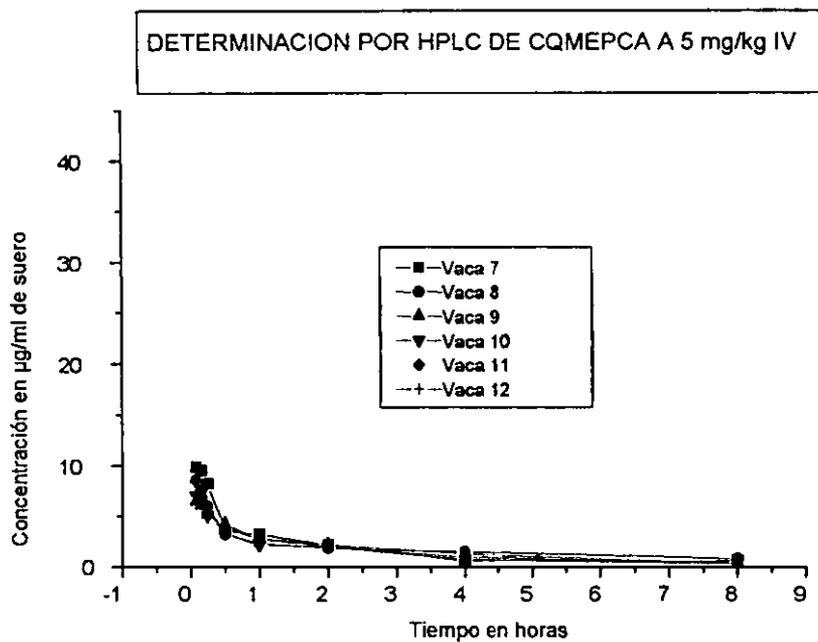
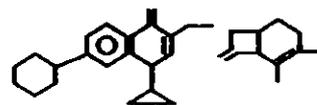


Figura 13.1. Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis bolo de 5 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por HPLC.

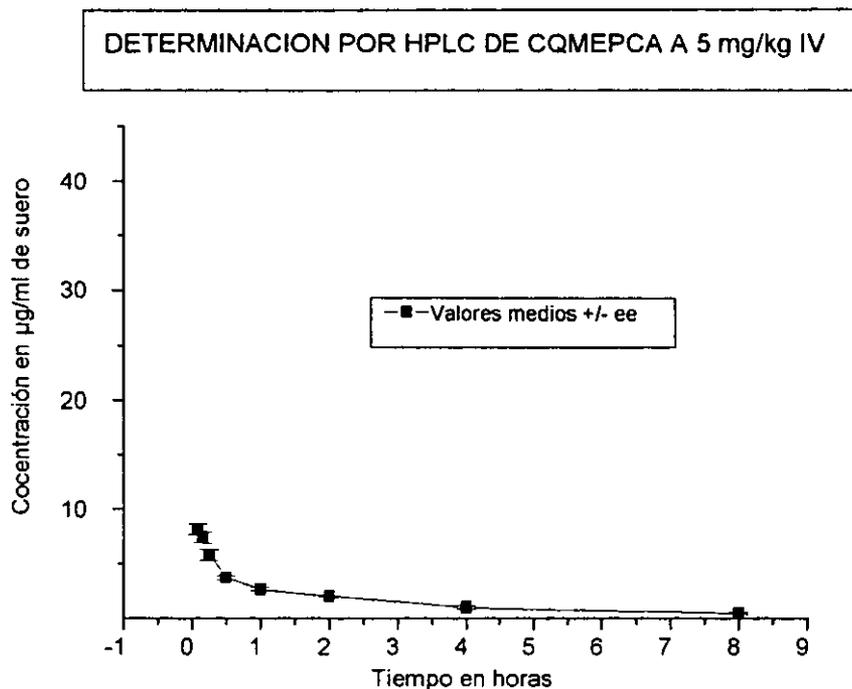
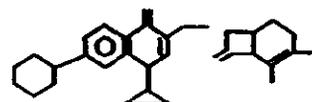


Figura 13.2. Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis bolo de 5 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por HPLC.



DETERMINACION POR ABSORBANCIA UV-VIS DE CQMEPCA
A 10 mg/kg IM

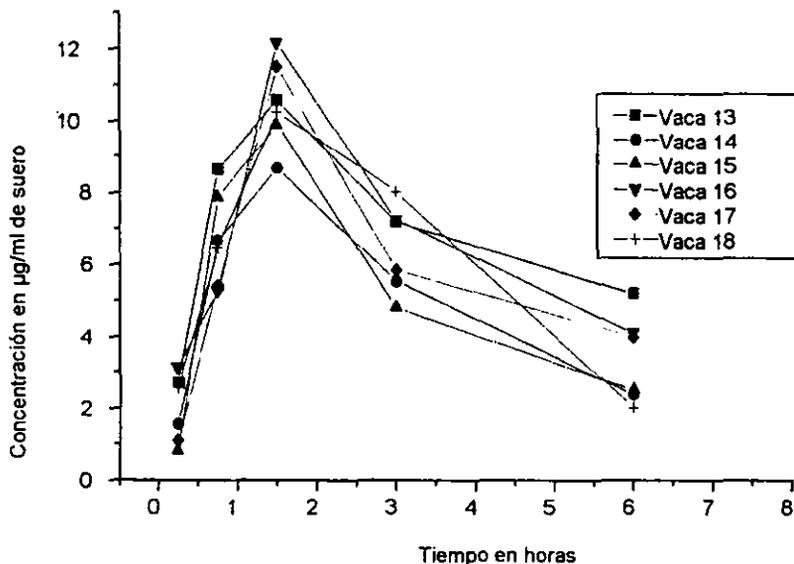


Figura 14.1. Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis de 10 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.

DETERMINACION POR ABSORBANCIA UV-VIS DE CQMEPCA
A 10 mg/kg IM

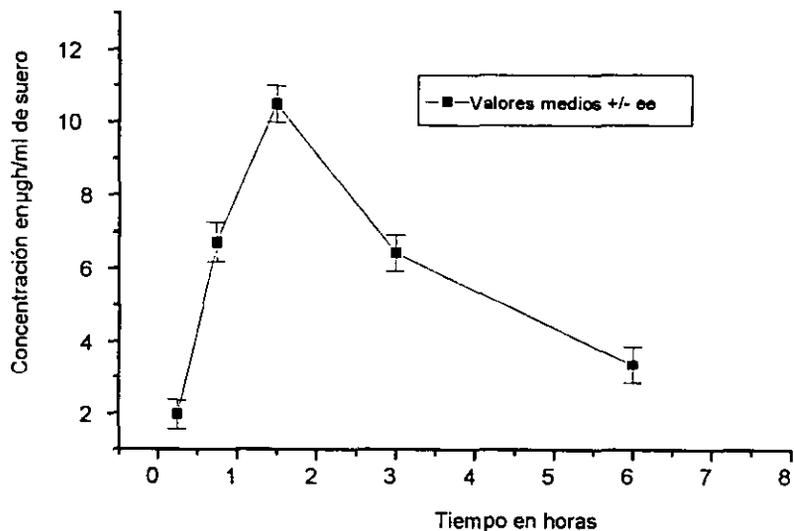


Figura 14.2. Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis de 10 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.

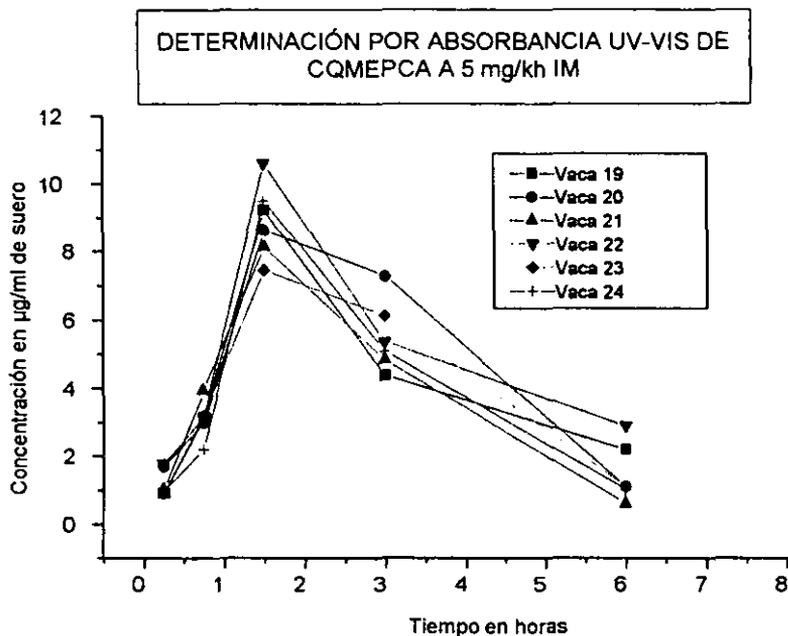
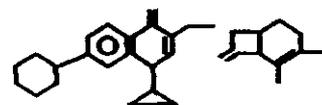


Figura 15.1. Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis de 5 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por UV-visible.

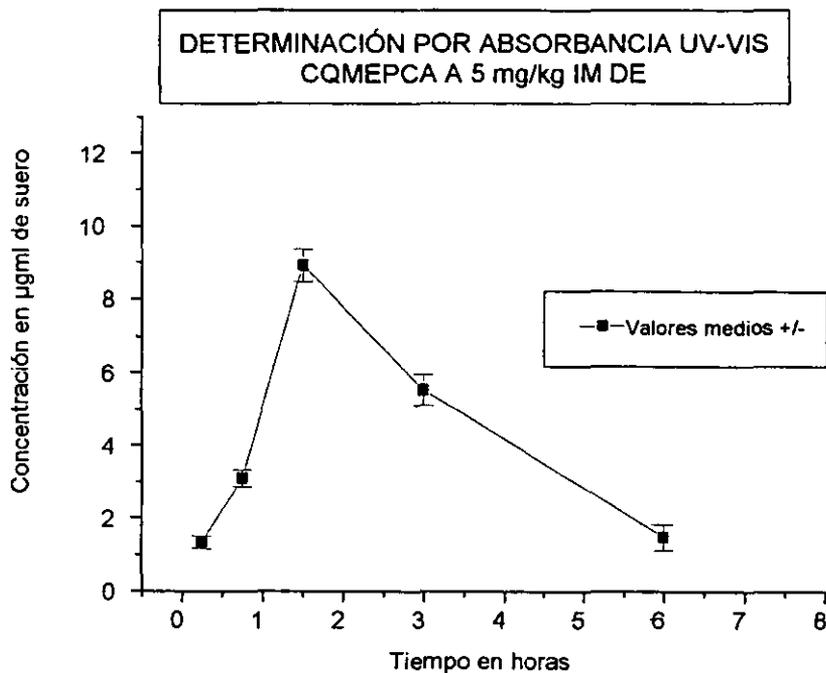
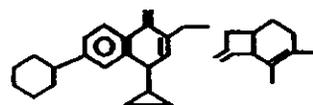


Figura 15.2. Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis de 5 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por absorbanza UV-visible.



DETERMINACION POR HPLC DE CQMEPCA A 10 mg/kg IM

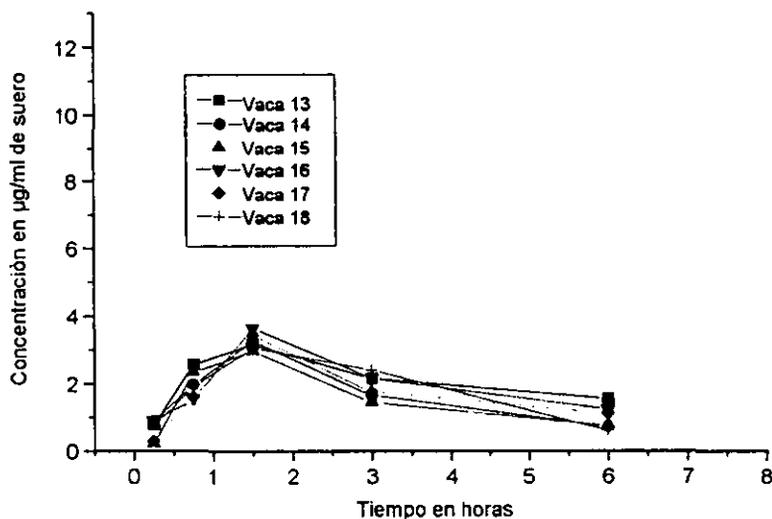


Figura 16.1. Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis de 10 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por HPLC.

DETERMINACION POR HPLC DE CQMEPCA A 10 mg/kg IM

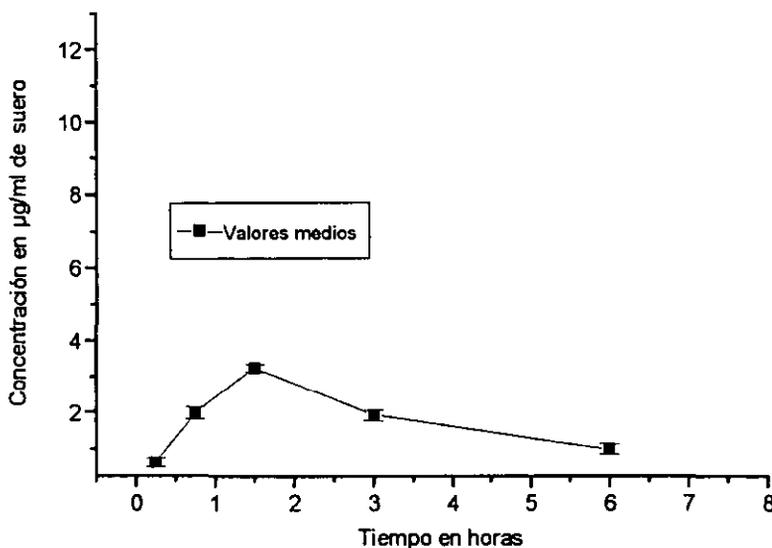


Figura 16.2. Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis de 10 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por HPLC

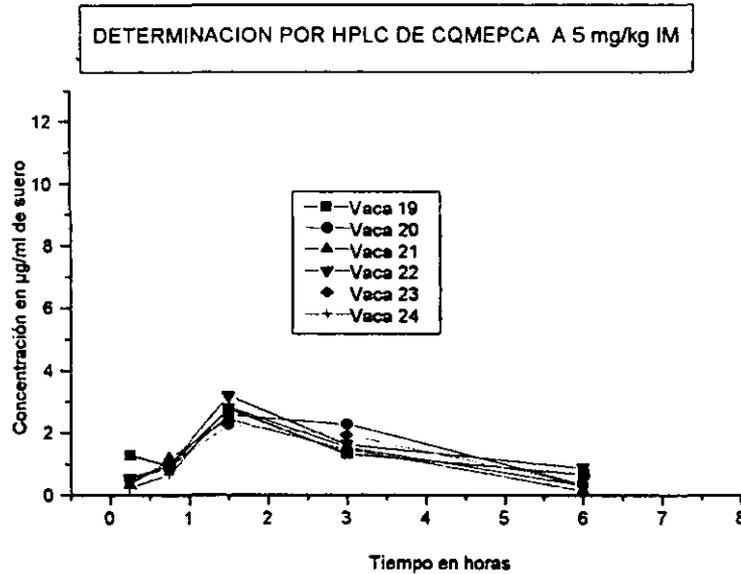
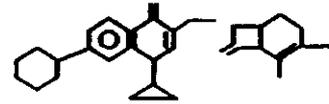


Figura 17.1. Concentraciones séricas de CQMEPCA en 6 vacas a las que se les administró una dosis de 5 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por HPLC.

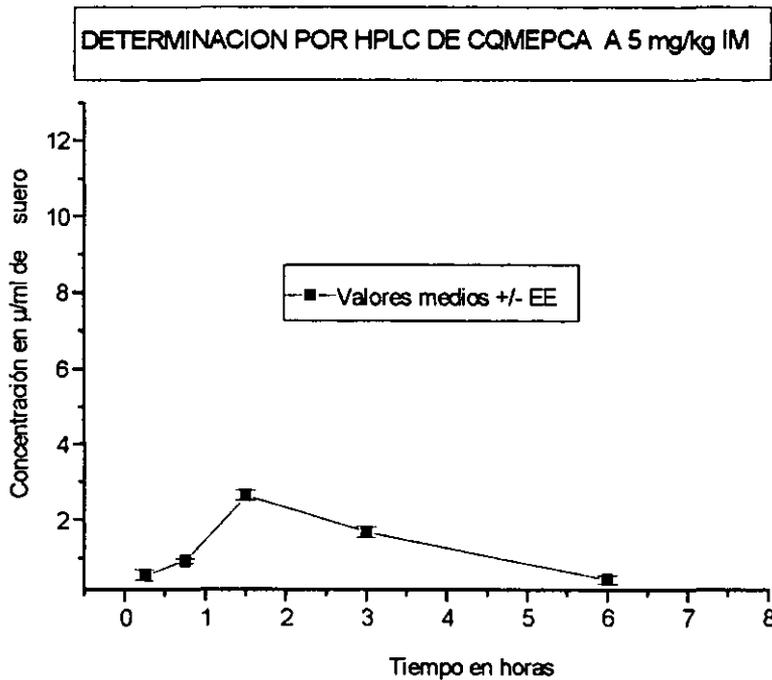


Figura 17.2. Valores medios y error estándar (EE) de las concentraciones séricas de CQMEPCA de 6 vacas que se les administró una dosis de 5 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por HPLC.

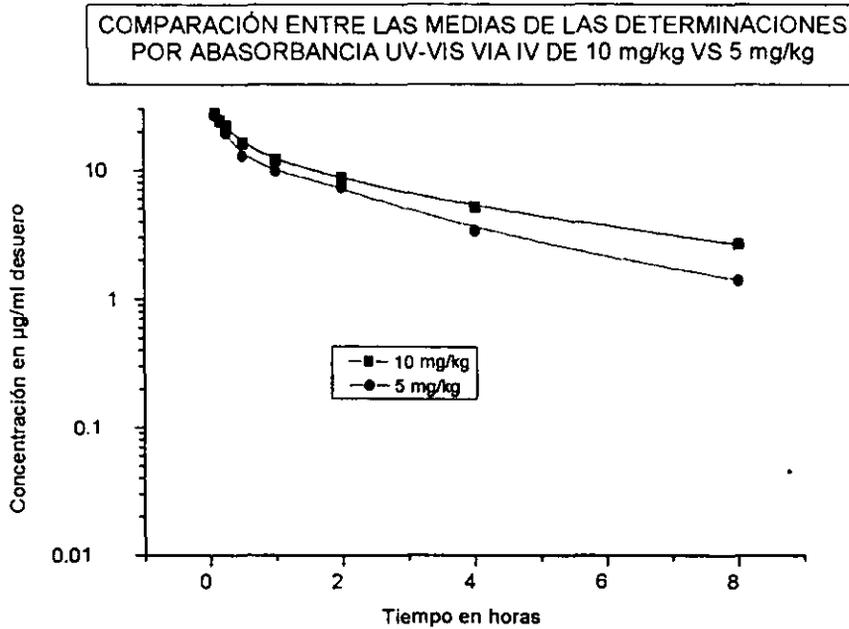
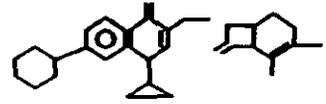


Figura 18. Comparación de los valores medios de las concentraciones séricas de CQMEPCA de las vacas a las que se les administró la dosis de 10 mg/kg y 5 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por absorbancia UV-visible.

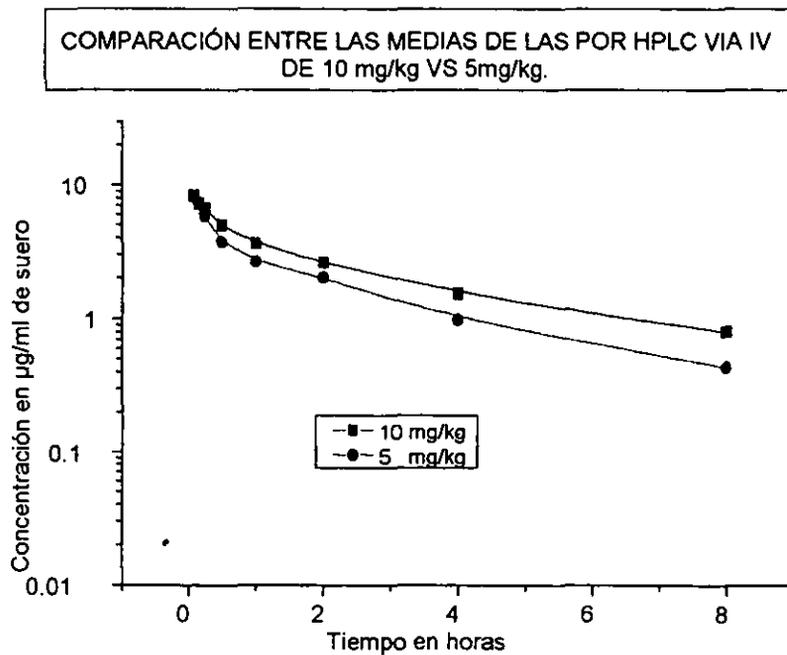


Figura 19. Comparación de los valores medios de las concentraciones séricas de CQMEPCA de las vacas a las que se les administró la dosis de 10 mg/kg y 5 mg/kg vía IV del fármaco. Determinación por HPLC.

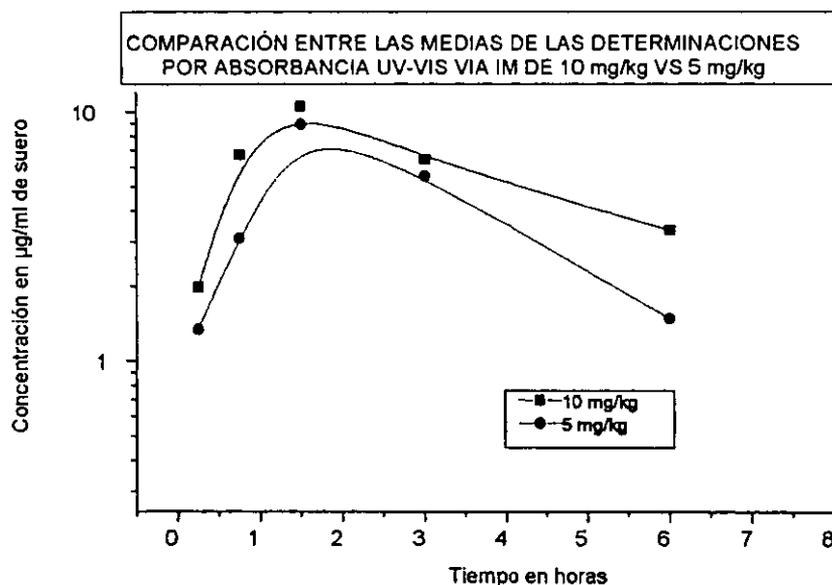
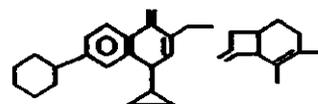


Figura 20. Comparación de los valores medios de las concentraciones séricas de CQMEPCA de las vacas a las que se les administró la dosis de 10 mg/kg y 5 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por absorbanca UV-visible.

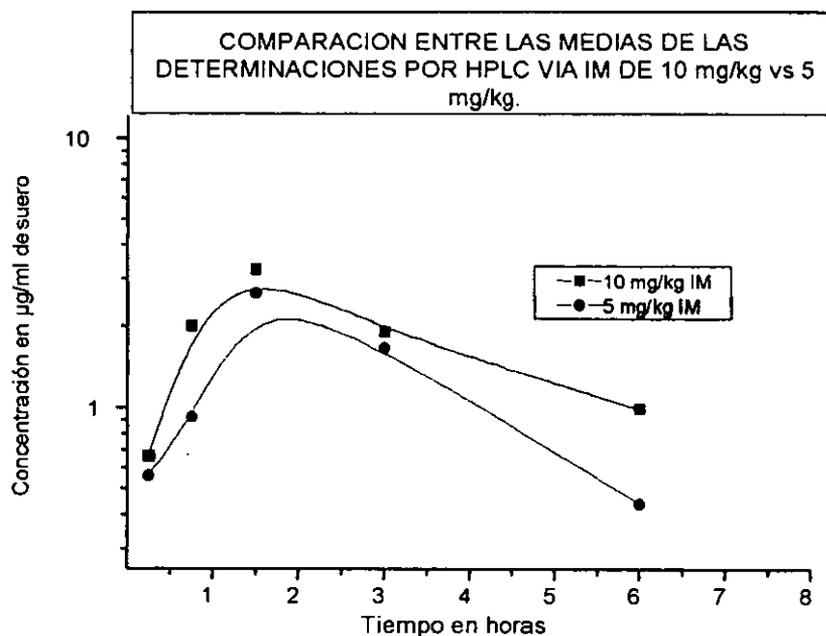
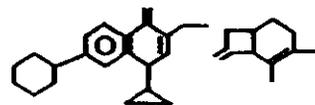


Figura 21. Comparación de los valores medios de las concentraciones séricas de CQMEPCA de las vacas a las que se les administró la dosis de 10 mg/kg y 5 mg/kg vía IM del fármaco. Determinación por HPLC.



COMPARACION DE LA DETERMINACION DE HPLC ENTRE RESULTADOS IV VS IM A DOSIS DE 10 mg/kg.

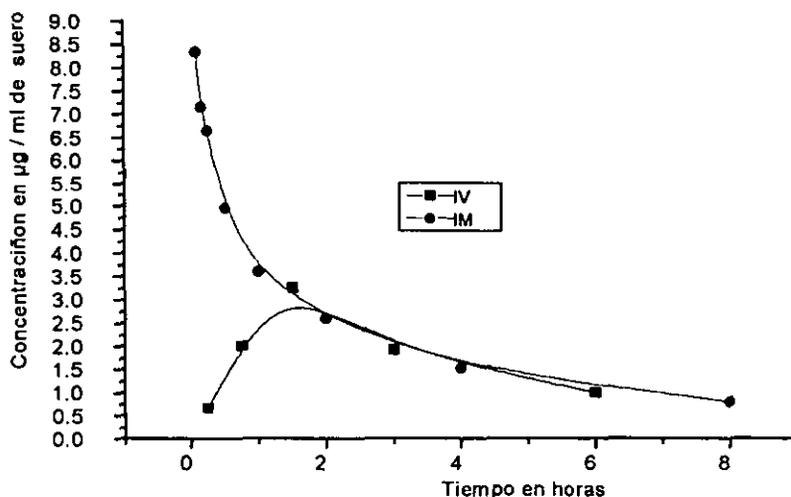


Figura 22. Comparación de los valores medios de las concentraciones séricas de CQMEPCA de las vacas a las que se les administró el fármaco a dosis de 10 mg/kg por vía IV contra la vía IM. Determinación por HPLC.

COMPARACION DE LA DETERMINACION POR HPLC ENTRE LOS RESULTADOS IV VS IM A DOSIS DE 5 mg/kg

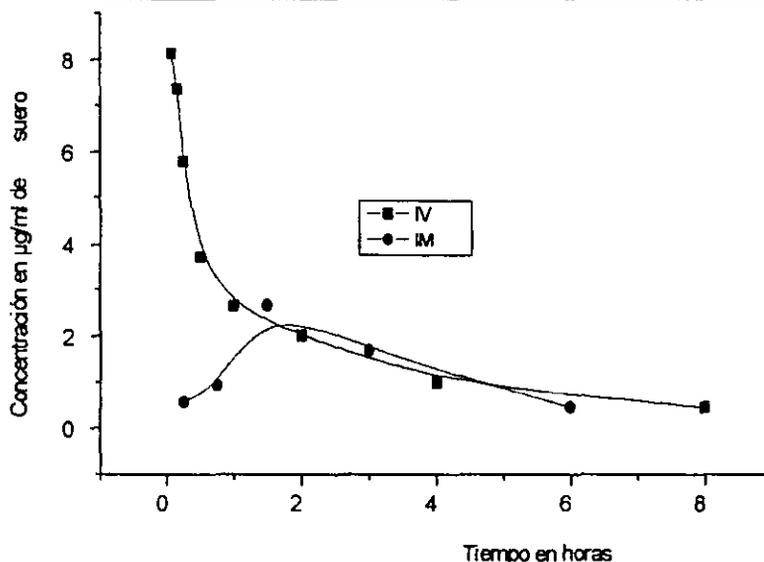


Figura 22. Comparación de los valores medios de las concentraciones séricas de CQMEPCA de las vacas a las que se les administró el fármaco a dosis de 5 mg/kg por vía IV contra la vía IM. Determinación por HPLC.

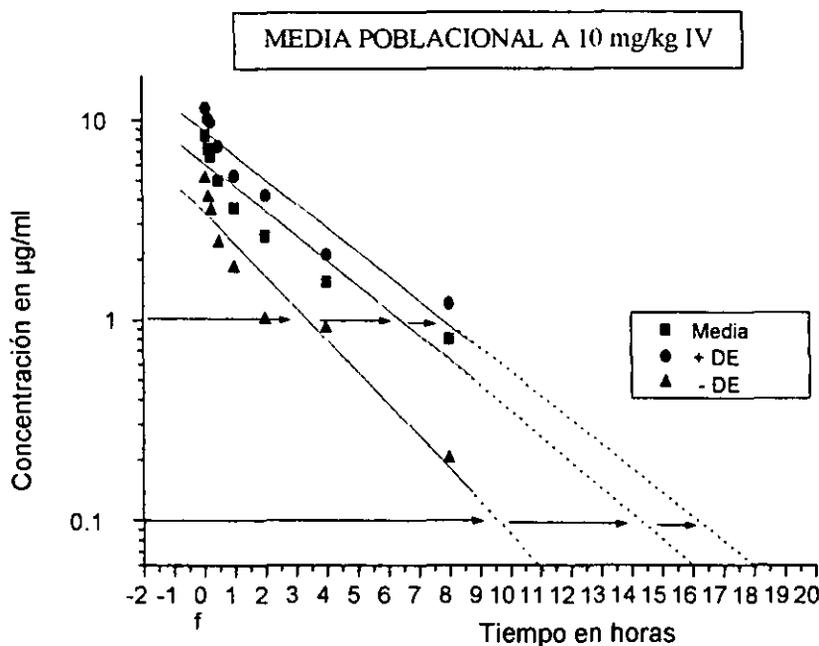
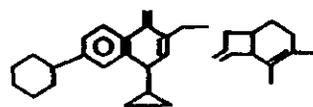


Figura 24: Valores de la media poblacional de la CQMEPCA a dosis de 10mg/kg IV, ± 1 desviación estándar y los probables intervalos de dosificación según las CMI para bacterias sensibles.

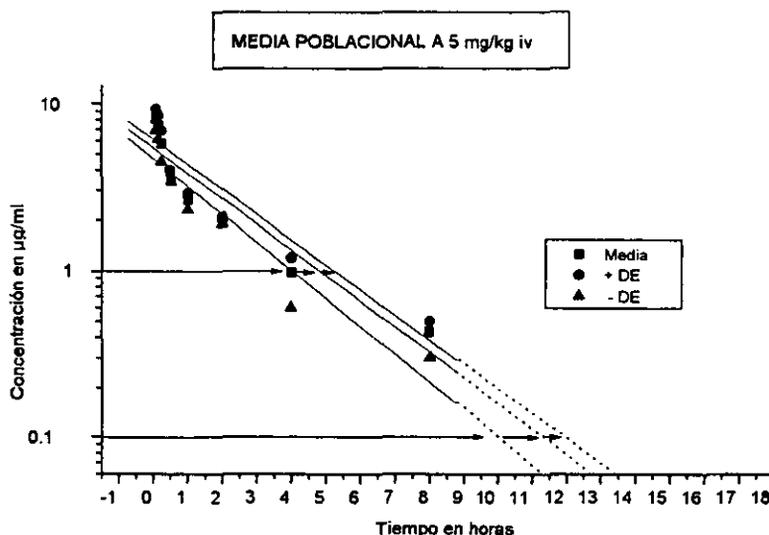


Figura 25: Valores de la media poblacional de la CQMEPCA a dosis de 5 mg/kg IV, ± 1 desviación estándar y los probables intervalos de dosificación según las CMI para bacterias sensibles.

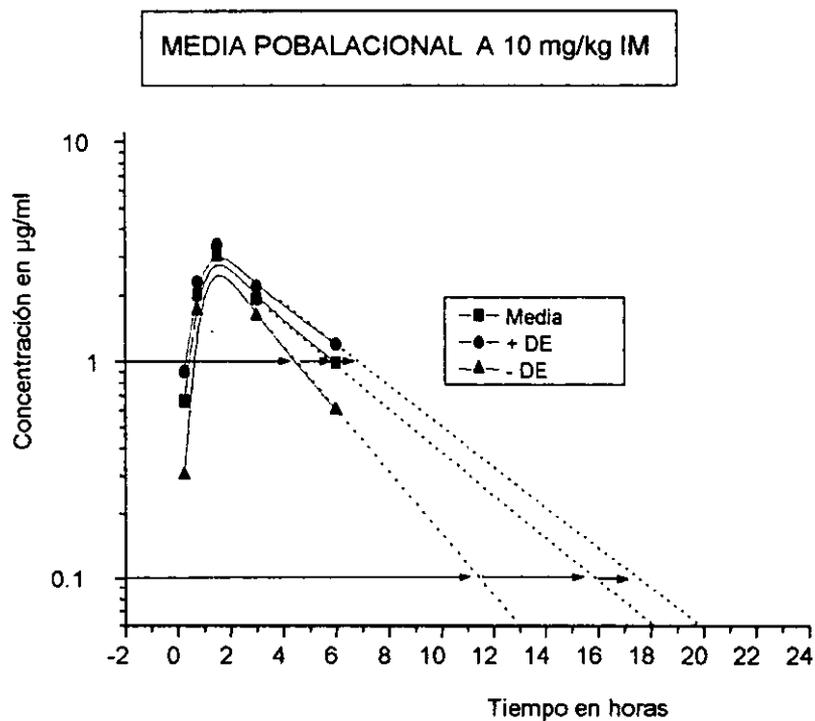
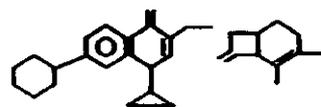


Figura 26. Valores de la media poblacional de la CQMEPCA a dosis de 10 mg/kg IM, ± 1 desviación estándar y los probables intervalos de dosificación según las CMI's para bacterias sensibles.



CERTIFICADO DE ANÁLISIS

DÍA 23 de enero de 1998

MATERIAL: CQ-M-EPCA

NO. LOTE:1308

DETERMINACION	RESULTADOS
Nombre químico:	Acido 7- ((1-ciclopropil-6-fluor-7-(4-etilpiperazin-1-il-1,4-dihidro-4-oxoquinolin-3-il) carboxamido) cefalosporánico.
Descripción:	Polvo fino de color amarillo homogéneo sin partículas extrañas.
Solubilidad:	Soluble en soluciones alcalinas a pH 10.0, de trietilamina, NaOH, NH ₄ OH. Insoluble en agua y cloroformo.
Punto de fusión:	189.0 °C - 192.9 °C
Humedad K.F.	4.64 %
Ensayo (HPLC)	98.66 %
Identificación (U:V)	Positiva

ATENTAMENTE

CONTROL DE CALIDAD

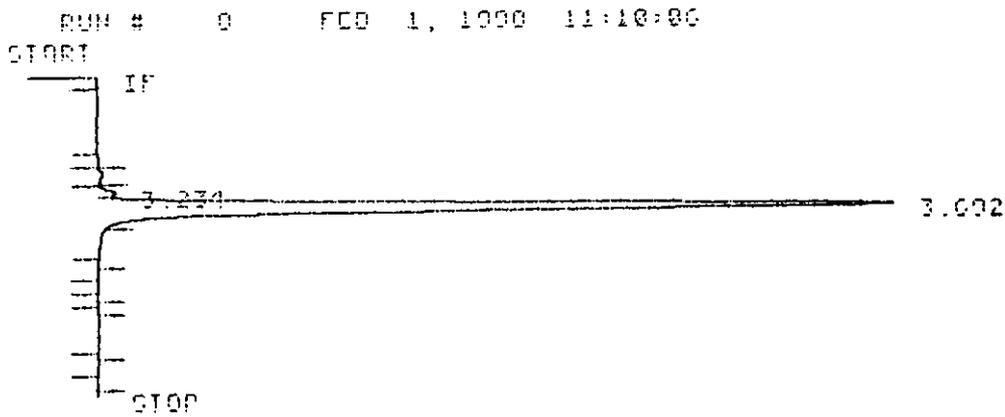
(VER ANEXO I)

*CO M EPOR BREAK

*NO. LOIC 1300 BREAK

LIST: LIST
PEAK CAPACITY: 1244

ZERO = 0, 50.110
ATT 20 = 0
CHT SP = 0.5
AQ REJ = 100000
THRESH = ?
PK WD = 0.04



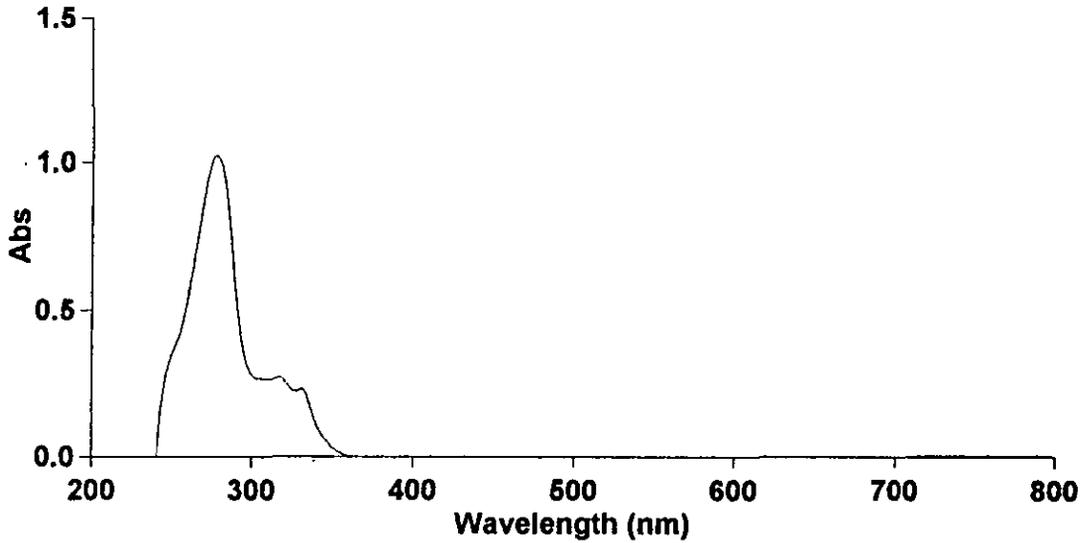
RUN# 0 FEB 1, 1990 11:10:00

AREA%

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
3.231	321370	00	.104	1.33020
3.032	23674650	00	.203	98.66974

TOTAL AREA=2.30000E+07
MUL FACTOR=1.00000E+00

Laboratorios Aranda S.A. de C.V.
Instrument Serial Number EL 9704 3194



Scan Report Vie 23 Ene 01:29:41 PM 1998

Batch: C:\Varian\Cary WinUV\CQ-M-EPCA.1308
Software version: 01.00(6)
Operator: LORENA GARCIA TORRES

Sample Name: CQ-M-EPCA 1308

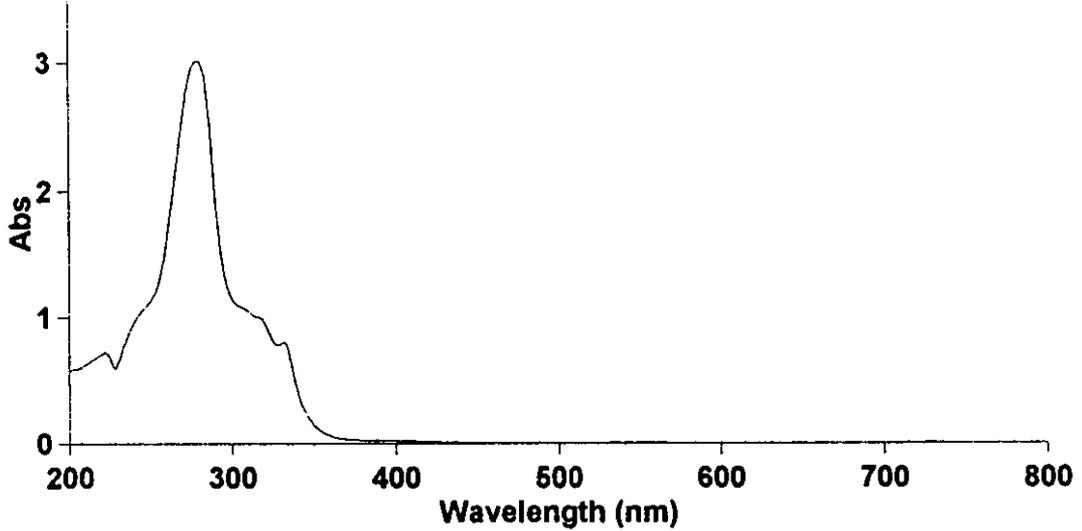
Collection Time 23/01/98 1:22:56 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0020
Range	800.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
331.67	1.7527
318.33	1.9708
268.33	3.6426

Laboratorios Aranda S.A. de C.V.
Instrument Serial Number EL 9704 3194



Scan Report Mié 28 Ene 10:13:59 AM 1998

Batch:
Software version: 01.00(6)
Operator: LORENA GARCIA TORRES

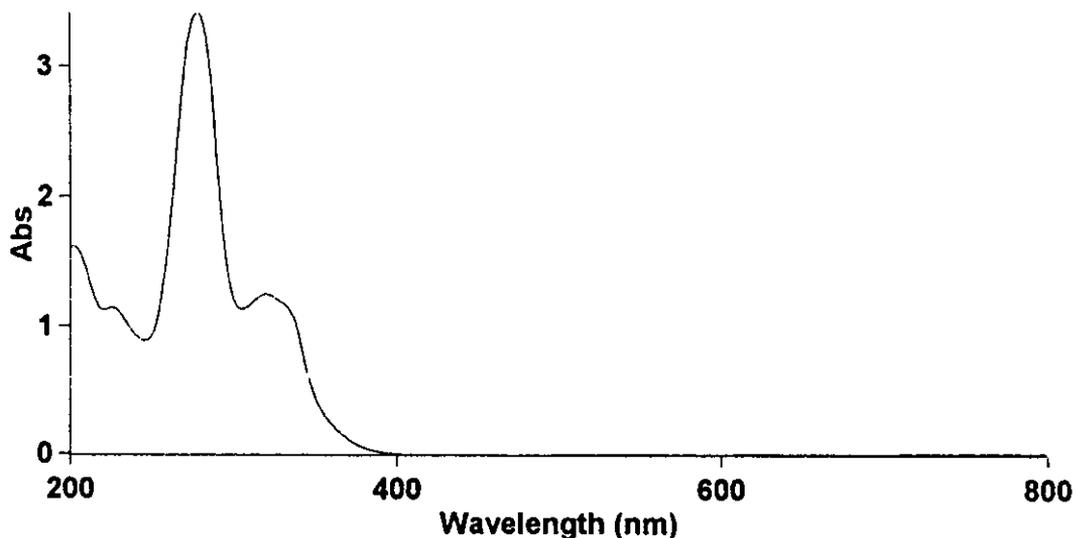
Sample Name: CQ-M-EPCA NO. LOTE 1292
Collection Time 28/01/98 10:13:13 AM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	800.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
331.67	0.8094
280.00	3.0158
221.67	0.7289

Laboratorios Aranda S.A. de C.V.
Instrument Serial Number EL 9704 3194



Report changed 2/02/98 9:41:52 AM

Scan Report Lun 02 Feb 09:40:34 AM 1998

Batch: C:\Varian\Cary WinUV\ENROFLOXACINA.BSW
Software version: 01.00(6)
Operator: LORENA GARCIA TORRES

Sample Name: ENROFLOXACINA

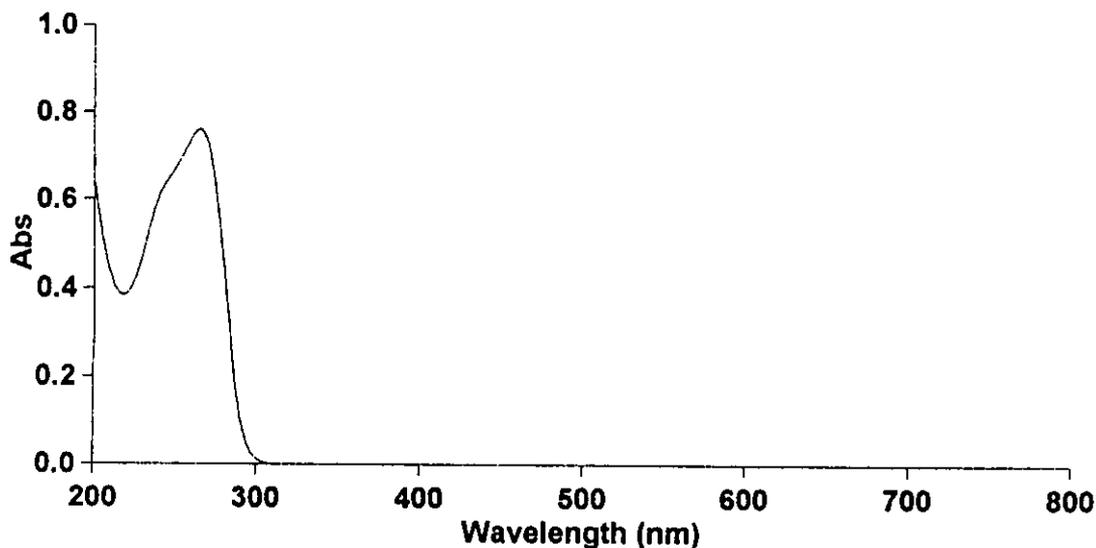
Collection Time 2/12/97 2:59:40 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	800.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
320.00	1.2462
278.33	3.4178
225.00	1.1437

Laboratorios Aranda S.A. de C.V.
Instrument Serial Number EL 9704 3194



Scan Report Mié 18 Feb 09:39:17 AM 1998

Batch:
Software version: 01.00(6)
Operator: lorena garcia torres

Sample Name: 7 ACA

Collection Time 18/02/98 9:38:07 AM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	800.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
265.00	0.7613

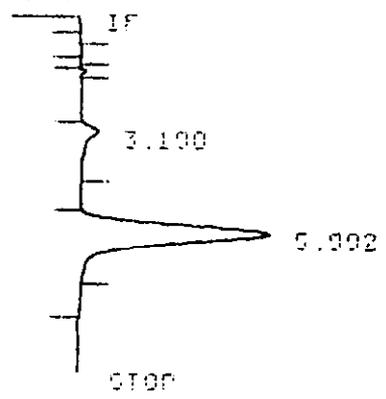
*CO M EPOG BREAK

*NO. LOYE 1202 BREAK

* LIST: LIST
PEAK CAPACITY: 1211

ZERO = 0. 10.007
ATT 20 = 0
LHT SP = 0.0
GC PCI = 100000
THRESH = 7
PR HD = 0.01

* RUN # 10 JAN 20, 1990 12:12:30
START



RUNS 10 JAN 20, 1990 12:12:30

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
3.100	720077	00	.300	5.51330
5.002	12103810	00	.501	94.48660

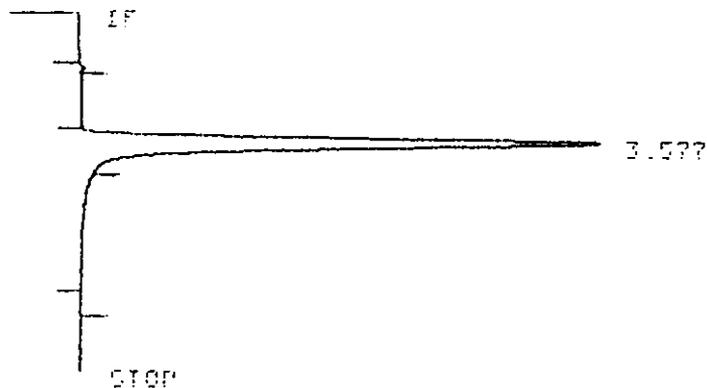
TOTAL AREA=1.32220E+07
MUL FACTOR=1.00000E+00

CEPROFLOXACINA BRENK

* LIST: LIST
 OPER CAPACITY: 1214

DEFO = 0.00210
 RT1 21 = 0
 CH1 CP = 0.5
 RP REJ = 100000
 THRESH = 7
 CR NO = 0.01

* RUN # 21 JAN 20, 1990 11:51:37
 START



RUN# 21 JAN 20, 1990 11:51:37

AREAX

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREAX
3.577	20203000	00	.310	100.00000

TOTAL AREA=2.02030E+07

MUL FACTOR=1.00000E+00

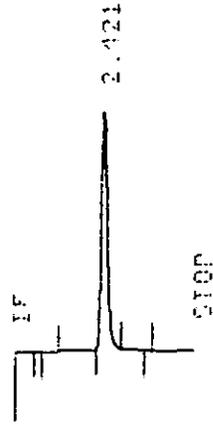
ANEXO. I-CI

Anexo G

LIST: LIST
 PEAK CAPACITY: 1244

ZERO = 9.49791
 RTT 2^o = 0
 CUT OFF = 9.5
 OR RES = 1000000
 TURCH = ?
 OR WD = 9.94

RUN # 10 SEP 22, 1997 11:56:57
 START

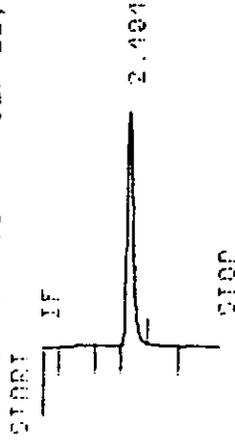


RUN# 10 SEP 22, 1997 11:56:57

AREAX
 RT AREA TYPE WIDTH AREA%
 2.421 1000565 DD .102 100.00000

TOTAL AREA=1000565
 MUL FACTOR=1.00000E+00

RUN # 11 SEP 22, 1997 12:07:07



RUN# 11 SEP 22, 1997 12:07:07

AREAX
 RT AREA TYPE WIDTH AREA%
 2.404 513001 DD .103 100.00000

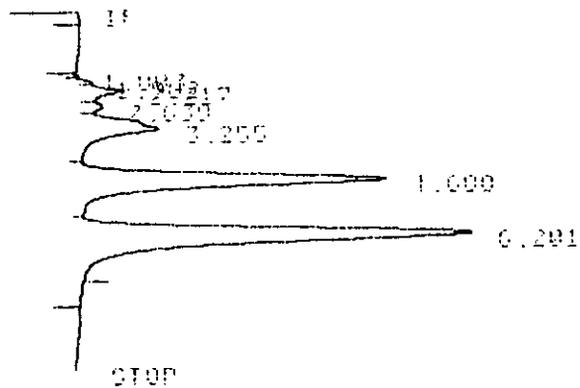
TOTAL AREA=513001
 MUL FACTOR=1.00000E+00

CLAVE I.7

ANALISTA: LORENA GARCIA TORRES
 PROYECTO: 6
 EQUIPO: HP 1050 ICI
 PAPER CAPACITY: 1211

ZERO = 0, 10.000
 G11 2" = 7
 G11 50 = 0.5
 NO PEI = 10000
 INDI = 5
 NO HD = 0.01

RUN # 17 AUG 21, 1990 11:51:00
 START



RUN# 17 AUG 21, 1990 11:51:00

AREA	RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
	1.003	10025	UV	.005	.00520
	1.002	130110	UV	.130	.01065
	2.217	773047	UV	.274	3.59572
	2.030	467070	UV	.202	2.11500
	3.255	2415557	UV	.504	10.04307
	1.000	7305123	UV	.413	33.50170
	6.201	10067206	UV	.470	49.23155

TOTAL AREA=2.2074E+07
 MUL FACTOR=1.0000E+00