

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE RIFAXIMINA EN LECHE DE VACAS

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

JOSÉ LUIS ANGELES MANJARREZ

ASESORES:

MVZ, MSc SALVADOR AVILA TÉLLEZ

MVZ, MSc RENÉ ROSILES MARTÍNEZ

México, D.F.2008



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.

DEDICATORIA

A mis padres que me han dado lo mejor posible, a mis asesores el doctor Avila y el doctor Rosiles por guiarme en el camino de la sabiduría, y a mis amigos que me acompañaron durante mi largo camino a la titulación.

AGRADECIMIENTOS

Les agradezco a mis asesores por ayudarme a concluir esta etapa de mi vida y mostrarme nuevos caminos, a Rabindranath por ayudarme siempre en mi trabajo y ser un verdadero amigo, al Doctor Janitzio por apoyarme en el desarrollo del experimento en el laboratorio, así como darme su apoyo moral, a mis amigos que siempre están atentos a lo que me ocurre y sobre todo a mi familia, porque sin ellos no hubiera sido posible todo lo que he vivido.

CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. JUSTIFICACIÓN	12
IV. OBJETIVOS	12
V. HIPÓTESIS	12
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	13
VII. RESULTADOS	17
VIII. DISCUSIÓN.....	21
IX. CONCLUSIONES.....	24
X. CUADROS Y FIGURAS	25
XI. REFERENCIAS	36

RESUMEN

Angeles Manjarrez José Luis. Desarrollo y validación del método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la identificación de Rifaximina en leche de vacas (bajo la dirección de: Salvador Avila Téllez y René Rosiles Martínez).

El objetivo fue desarrollar y validar un método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la detección de Rifaximina en leche de vacas. Para la aplicación del método se utilizó metanol grado HPLC y acetato de amonio como fases móviles, columna C18, y detector ultravioleta. La validación del método se realizó mediante estándares de sal pura de Rifaximina disuelta en metanol. Con respecto a la validación del método, se observó una linealidad superior al 0.99 de r^2 ; en la precisión se observaron desviaciones relativas menores al 5%. El porcentaje de recuperación promedio fue superior al 54%; se obtuvo una alta especificidad al evitar sustancias que interfirieran con los resultados. El límite mínimo de detección resultó de 30 ng/ml y su límite de cuantificación de 150 ng/ml. Para el estudio de la cinética de la Rifaximina, se aplicó el antimicrobiano por infusión intramamaria (100 mg) en dos vacas en lactación. En este estudio, en una primera vaca, se identificó un coeficiente de depuración de 0.0122, una vida media de 24.6 horas, y un área bajo la curva (AUC) de 8.65 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$. Para la segunda vaca el coeficiente de depuración fue de 0.00749 con una vida media de 23.9 horas, y un AUC de 7.75 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$. En campo, en dos hatos lecheros con 800 vacas Holstein, se aplicó el antimicrobiano por meato del pezón (100 y 200mg) en

vacas que finalizaron lactación; obteniéndose muestras de calostro y leche de 20 vacas después del parto. Estas muestras resultaron negativas a Rifaximina al ser analizadas por el método de HPLC. La aplicación de este método por HPLC es válida para la detección de Rifaximina en leche.

INTRODUCCIÓN

Como parte de un programa exitoso en el ordeño, es importante considerar el buen funcionamiento de las maquinas ordeñadoras, higiene del ordeño, control de las vacas con mastitis, una terapia efectiva para las vacas en lactación y las que se encuentran en descanso lactacional, además muestreos de las vacas después del parto en aquellos animales que han recibido tratamientos con antimicrobianos al comienzo de este periodo.¹

Con relación a este último punto, es menester conocer el proceso y tiempo de eliminación de dichos antimicrobianos por leche y otras acciones que permitan conocer su cinética para evitar que existan residuos que afecten la calidad de la leche en la lactación que se inicia .²

Un residuo de antimicrobiano se define como el compuesto original o metabolito del mismo, que se puede acumular, depositar o almacenar dentro de las células, tejidos, órganos o productos de consumo de origen animal, después de su uso como terapéutico .²

Los problemas resultantes por el uso de los antimicrobianos conllevan a tres aspectos: toxicidad, resistencia bacteriana e impacto económico. Como ejemplos de toxicidad se señalan hipersensibilidad, sobre todo en individuos con susceptibilidad a medicamentos como β -lactámicos y patologías causadas por medicamentos carcinogénicos o mutagénicos como la nitrofurazona. Se da resistencia bacteriana por la producción de cepas resistentes. El impacto

económico se debe a la inhibición de microorganismos utilizados para la producción de subproductos lácteos.^{3,4}

Existen diversas instituciones que regulan los residuos para vigilar la inocuidad de productos alimenticios y el cuidado de la salud del consumidor. Entre estos se citan: Food and Agriculture Organization (FAO), la Unión Europea (EU), y la World Health Organization (WHO). En la legislación mexicana se menciona en el reglamento de la Ley General de Salud (1998) en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, en el Título IV, Capítulo I, que la leche se considera adulterada cuando se le haya agregado cualquier otra sustancia, aunque sea componente normal, a excepción de las vitaminas A y D en la leche semidescremada y cuando por acción de causas naturales haya sufrido modificación en su composición intrínseca que reduzca su poder nutritivo, la convierta en nociva para la salud, o modifique sus características físicas y químicas u organolépticas fuera de los límites previstos en el reglamento mencionado anteriormente. Con respecto al uso de los antimicrobianos, en la Ley General de Salud, solo se hace mención que la leche procedente de animales tratados con bacteriostáticos, bactericidas, hormonas o cualquier otra sustancia, no podrá destinarse para el consumo humano dentro de los períodos de eliminación que señalen las normas correspondientes.^{5,6}

ESTRUCTURA QUÍMICA

La Rifaximina es un miembro de la familia de las Ansamicinas, derivado de la rifamisina S. Su fórmula química es (2S, 16Z, 18E, 20S, 21S, 22R, 23R, 24R, 25S,

26S, 27S, 28E)-5, 6, 21, 23, 25-pentahidroxi-27-metoxi-2, 4, 11, 16, 20, 22, 24, 26-octametil-2, 7-(epoxipentadeca-[1, 11, 13] trienimino) benzofuro [4, 5-e] pyrido [1, 2- α]-benzimidazol-1, 15 (2H)-dion, 25 acetato. La formula química condensada es $C_{43}H_{51}N_3O_{11}$, con un peso molecular de 785.9 mmol (Fig. 1).⁷

MECANISMO DE ACCIÓN

Este medicamento es un antimicrobiano semisintético cuyas moléculas actúan uniéndose a la sub unidad B de la holoenzima ARN-polimerasa dependiente de ADN de las bacterias, en el lugar del híbrido, ADN-ARN compitiendo con ella, inhibiendo la unión fosfodiéster con bloqueo de ARNr y ARNt. No es para uso sistémico debido a su pobre absorción. Tiene un grado menor de riesgo de causar resistencia bacteriana por dosis repetidas.⁸

FARMACOCINÉTICA

La farmacocinética se define como la circulación de un fármaco en el organismo. Los resultados obtenidos en los estudios farmacocinéticos, con los procedentes de los ensayos clínicos de eficacia y seguridad, son los que configuran el perfil farmacológico de un nuevo medicamento, permitiendo establecer las directrices para su correcta utilización en la práctica clínica. Su estudio tiene los siguientes objetivos: desarrollar nuevos medicamentos, seleccionar la vía de administración adecuada, diseñar la formulación farmacéutica, conocer la capacidad de acceso a órganos y tejidos, establecer las vías metabólicas, caracterizar los procesos de

eliminación, diseñar los regímenes de dosificación, establecer relaciones con la respuesta, y mejorar el resultado de los tratamientos farmacológicos.^{9,10}

Propiedades farmacocinéticas como baja biodisponibilidad, escasa distribución tisular, intensa inactivación metabólica, entre otras, pueden reducir el potencial terapéutico de un fármaco. Se considera que una farmacocinética desfavorable es la causa más frecuente de interrupción de ensayos clínicos en las fases iniciales de desarrollo.^{9,10}

La legislación sanitaria de los países pertenecientes a la Unión Europea establece los estudios farmacocinéticos que deben incluirse en los protocolos de los ensayos clínicos. La Legislación Mexicana establece las buenas prácticas de fabricación para fármacos en la NOM-164-SSA1-1998.^{9,11}

La investigación de nuevos medicamentos se ha orientado a mejorar las características farmacocinéticas, especialmente en cuanto a la absorción gastrointestinal, la distribución tisular y la velocidad de eliminación. El desarrollo de formulaciones de liberación modificada y el uso de vectores para conseguir una distribución tisular selectiva, pretende modificar el perfil farmacocinético de algunos medicamentos para mejorar su rendimiento terapéutico.^{9,10}

El éxito de un tratamiento farmacológico depende en gran medida del régimen posológico utilizado, pero la selección del mismo se ve dificultada por las variaciones o diferencias interindividuales en el perfil, tanto farmacocinética como farmacodinámico del medicamento.^{9,10}

La eliminación de un antimicrobiano engloba los procesos que contribuyen a la desaparición del mismo (biotransformación y excreción). Algunos fármacos se

pueden inactivar, y otros se convierten en metabolitos activos. Los procesos de eliminación se pueden expresar mediante el aclaramiento, que es la relación existente entre la velocidad de eliminación y la concentración en plasma.^{9,10}

Al estudiar las características farmacocinéticas de la Rifaximina, se realizaron diferentes investigaciones para demostrar que este antimicrobiano tiene una pobre absorción vía sistémica:

En un estudio realizado en ratas, la distribución revela que la Rifaximina se encuentra en bajas proporciones en hígado (6.5 µg/g y 9.6 µg/g, 4 y 6 horas después de un tratamiento vía oral). (Francesca Asta et al., 2005).^{12,13}

Su distribución en animales tratados oralmente resultaron en una concentración menor a 0.2% en el hígado y el riñón y menor de 0.01% en otros tejidos.¹²

En un estudio realizado con tubos de 5 ml conteniendo 100 mg de Rifaximina aplicados por infusión intramamaria, se demostró que este antimicrobiano era indetectable en suero sanguíneo. En otro estudio en el que se utilizó cromatografía líquida para la detección de la concentración de Rifaximina, se encontraron 4 µg/g en epitelio del seno lactífero de la glándula mamaria y del pezón; 1.6 µg/g en el parénquima superficial y 0.8 µg/g en el parénquima profundo; lo que demuestra cierta penetración en el parénquima mamario.¹⁴

En una prueba en la que se administró Rifaximina vía intramamaria a 10 vacas en descanso lactacional, se muestreó la secreción de la glándula mamaria cada semana, detectándose 0.25 µg/ml al día 28, y 0.14 µg/ml al día 42, cantidades detectadas en la mitad de las glándulas tratadas.¹⁵

DOSIS RECOMENDADA Y NIVELES RESIDUALES MAXIMOS PERMITIDOS

La Rifaximina se recomienda en dosis de 100 mg por glándula mamaria para el tratamiento de mastitis y de 50 a 200mg para el tratamiento de metritis vía intrauterina .¹⁶

El nivel máximo permitido de Rifaximina en leche por el “Committe For Veterinary Products” (organismo perteneciente a la Unión Europea) en el 2001, es de 60µg/Kg en leche de vaca para consumo humano.¹⁷

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

La cromatografía de líquidos (HPLC) es un método accesible de alta especificidad, que se ha utilizado en diversos estudios para la detección de Rifaximina y otros antimicrobianos en líquidos corporales como: sangre, leche, heces, entre otros
18,19,20

Este método requiere de una fase móvil que se refiere al solvente que fluye continuamente a través de la columna (fase estacionaria) al ser inyectada por una bomba. Esta fase actúa como un acarreador de la muestra, misma que es inyectada ya sea en forma manual o mediante un automuestreador.²¹

La fase sólida está adherida al soporte sólido de la columna, y es un líquido de mayor densidad que la fase móvil.^{22,23,24}

La separación de los componentes de la muestra inyectada, se debe a la afinidad que tiene cada uno de estos por la fase móvil y la fase estacionaria. Esta separación se mide por el tiempo de retención, es decir, el tiempo que tarda cada compuesto desde que se inyecta hasta ser detectado.^{22,23,24}

Después de la separación de los compuestos, estos son identificados por un detector que puede ser: ultravioleta, de masas, rayos catiónicos, fluorescencia, entre otros; la selección del detector será de acuerdo con la sensibilidad y selectividad requerida, así como las propiedades del compuesto a analizar. Los elementos detectados son enviados a una interfase que permite la graficación de la información en una computadora, ya sea por el área o la altura de la señal, y así poderla interpretar. (Figura 2).^{21,22,23}

La validación del método cromatográfico es con el fin de obtener los mejores resultados analíticos posibles. Se debe considerar el procesamiento de la muestra, columna, fase móvil y método de detección. Existen especificaciones básicas que se requieren para dicha validación, y que incluyen: linealidad, repetitividad, especificidad, precisión, exactitud (porcentaje de recuperación), límite de detección, límite de cuantificación, y estabilidad.^{24,25,26,27}

La *linealidad* es determinada por una serie de inyecciones de solución estándar en tres concentraciones diferentes. La respuesta o tamaño de la señal debe ser proporcional a la concentración del antimicrobiano inyectado. La linealidad se

mide por el tamaño de la r^2 de una regresión lineal; entre más cercana este a 1, esta será mayor.^{26,27,28,29}

Repetitividad es el resultado de inyecciones sucesivas de mismas concentraciones del estándar, con el objetivo de medir su variabilidad. Esta se identifica por la desviación relativa.^{26,27,28,29}

La *especificidad* es la habilidad de medir con precisión un compuesto en presencia de sustancias que interfieran la respuesta de la muestra a analizar y que pueden tener un tiempo de retención similar o igual al antimicrobiano estudiado.^{26,27,28,29}

Precisión corresponde a la variabilidad que se presenta al medir el tamaño de la señal y el tiempo de retención que presenta un compuesto en una concentración determinada del estándar, cuando el estudio es realizado por un mismo operador y con el mismo equipo en diferentes tiempos de inyección.^{26,27,28,29}

Para la *exactitud* se prepara una muestra con una cantidad conocida del antimicrobiano. El cálculo de la concentración final se compara con la concentración añadida a la muestra. Esta diferencia se mide por el porcentaje de recuperación del antimicrobiano; dependiendo este, de la cantidad obtenida y la cantidad añadida a la muestra.^{26,27,28,29}

El *límite mínimo de detección* es la cantidad mínima detectable de un antimicrobiano cuando el tamaño de la señal es el doble del nivel umbral de la señal del detector.^{26,27,28,29}

El *límite mínimo de cuantificación* es la concentración del antimicrobiano que se obtiene al multiplicar la cantidad encontrada en el ensayo por el volumen de aforo de la muestra entre el tamaño de esta.^{26,27,28,29}

La *estabilidad* se identifica al inyectar una misma concentración del estándar en tiempos diferentes. Si el compuesto es estable, no se encontrarán diferencias significativas en la señal en un tiempo determinado.^{26,27,28,29}

JUSTIFICACIÓN

La calidad de la leche puede verse afectada por residuos de fármacos, por lo que es necesario el desarrollo de un método de alta sensibilidad para su detección, como es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). La validación de esta metodología para la identificación de la Rifaximina es un requisito para la confiabilidad del método en la identificación de contaminantes por malas prácticas médicas.

OBJETIVOS

- a) Implementar y validar el método por HPLC para la detección de Rifaximina e identificación de su cinética en leche de vacas.
- b) Aplicación del método desarrollado para identificar la Rifaximina en calostro y leche de vacas después del parto.

HIPOTESIS

- a) La Rifaximina persiste durante el período del descanso lactacional, pero no así 24 horas después del parto.
- b) El método por HPLC es adecuado y válido para identificar los residuos de Rifaximina en leche de vacas después de la aplicación como parte de una terapia para el descanso lactacional.

MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo experimental consistió de dos fases:

Como primera actividad se identificó la longitud de onda de mayor absorbancia de la Rifaximina pura mediante espectrofotometría.

Posteriormente, se validó el método de cromatografía de líquidos con detector de luz ultravioleta para la identificación de la Rifaximina pura mediante el estudio de la linealidad, repetitividad, especificidad, precisión, exactitud, límite mínimo de detección, límite de cuantificación, y estabilidad.

Se utilizaron los siguientes elementos para dicho método:

1. Bomba binaria
2. Fase móvil A. Solución molar de acetato de amonio.
3. Fase móvil B. Metanol grado HPLC.
4. Columna C₁₈ de 150 mm por 2.5 mm y tamaño de partícula de 4 μ .
5. Auto muestreador Perkin Elmer 200
6. Detector de rayo ultravioleta Perkin Elmer 785A.
7. Paquete de computación Total Chrome como integrador del análisis.

Se preparó un estándar de Rifaximina, mediante una dilución de la sal pura en metanol (0.0513g en 50 ml de metanol), la cuál se mantuvo en refrigeración

durante la realización del estudio. Se realizaron tres diluciones de estándar en metanol (1/100, 1/200, 1/400), para obtener una concentración final de 513, 256, 128ng/50µl (50 µl=volumen de inyección).

La duración del análisis por muestra fue de 7 minutos (4 min del 50%A al 100%, y 3 min para regresar a la condición inicial).

Para identificar parte de la cinética de la Rifaximina en la leche de la glándula mamaria se partió del conocimiento de la cantidad de leche producida por cada glándula tratada, se procedió al estudio del coeficiente de depuración de la Rifaximina en dos vacas Holstein multíparas sanas en lactación y próximas al secado. Este estudio se llevó a cabo en CEPIPSA, Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.

La cantidad de Rifaximina aplicada por glándula fue de acuerdo al siguiente criterio:

- a) Infusión intramamaria de 100mg de Rifaximina por glándula.
- b) Dos de las 4 glándulas mamarias de la ubre recibirán 100m y 200mg del antimicrobiano, quedando las glándulas restantes como controles.
- c) Las muestras de leche fueron obtenidas con la frecuencia siguiente:
 - i- Primer muestra antes de la aplicación del antimicrobiano.

- ii- Muestras posteriores, antes del ordeño de la vaca durante siete días consecutivos.
- d) Las muestras de leche obtenidas de las dos vacas, fueron transportadas en refrigeración (4°C) después de cada toma al laboratorio de toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), UNAM, para el análisis de la Rifaximina por el método de HPLC.
- e) El análisis de las muestras de leche para la identificación de Rifaximina fue con el sistema de cromatografía líquida desarrollado, con las siguientes características:
- i-Extracción de la muestra con 5ml de la misma en 5ml de metanol, y centrifugado a 8000 r.p.m. durante 15 min.
 - ii- Aplicación del Método por HPLC previamente validado.
 - iii- Con la cantidad mínima detectable obtenida y las concentraciones máximas, se implementó una curva de regresión, para posteriormente hacer el estimado de la concentración en las muestras problema con el tamaño de la señal identificada en el detector en el mismo tiempo de retención.
 - iiii- Los resultados fueron evaluados con el sistema estadístico PKa Analyst para conocer los parámetros de la cinética (área bajo la curva constante de eliminación y vida media).

La siguiente fase de la investigación se realizó en dos diferentes unidades de producción de leche de vacas Holstein; la primera localizada en las coordenadas 99°48'39" longitud oeste y 19°37'34" latitud norte así como la segunda en las coordenadas 99°41'11" longitud oeste y 19°36'40" latitud norte respectivamente; ambas unidades de producción a 2460 metros de altitud, con clima templado sub húmedo, precipitación media anual de 828.4mm y temperatura media anual de 14.8°C.

La dosificación del antimicrobiano al término de la lactación, como terapia efectiva durante el descanso lactacional, fue la siguiente:

Se aplicó una infusión con 100 mg de Rifaximina en glándulas calificadas por CMT a: negativas, trazas, uno y dos. Cuando la calificación fue CMT 3 se administraron 200mg de Rifaximina.

La duración del descanso lactacional tuvo una variación entre 60 a 95 días.

Se obtuvieron las muestras de leche y calostro de 20 vacas en los días 1, 2, 3, 4 y 5 del inicio de la lactación. Las muestras se almacenaron en congelación y fueron examinadas posteriormente con el método cromatográfico descrito en la primera fase de la investigación.

RESULTADOS

VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Como primer paso para identificar las características fisicoquímicas de la Rifaximina, se identificó la longitud de onda de máxima absorción por el escaneo en un espectro de luz ultravioleta visible (455 nm).

Para *validar* el método de la identificación de la Rifaximina por HPLC, se consideraron: *linealidad, repetitividad, precisión, exactitud, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación y estabilidad del estándar.*

La *linealidad* se identificó al establecer el índice de regresión con la inyección de tres estándares, el primero de 128 ng, el segundo de 256 ng, y el tercero de 513 ng. El valor de la r^2 del área de la señal de las tres concentraciones fue de 0.992 (cuadro 1; figuras 3, 4 y 5).

La *repetitividad* de estas tres concentraciones (128, 256, 513ng/50µg), en 5 ocasiones cada una, resultó con una desviación relativa para la concentración de 126ng fue de 3.303%; para la concentración de 256ng de 1.19%; para la concentración de 513ng de 3.32%. El promedio de la desviación estándar de las tres concentraciones fue de 2.603% (cuadro 2).

La *precisión del método* se evaluó al identificar el promedio y la desviación relativa del área y del tiempo de retención en 5 repeticiones de las tres concentraciones (128, 256, 513 ng/50ul). En la concentración de 128ng se identificó un promedio

en el área obtenida de 527605 $\mu\text{V}\cdot\text{s}$; tiempos de retención en promedio de 0.52 minutos; resultando una desviación relativa para el área de 3.97% y para el tiempo de retención de 1.71%. Con la concentración de 256 ng, se obtuvo un área promedio de 1316516 $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ con un tiempo de retención promedio de 0.519 minutos; resultando en una desviación relativa para el área de 4.43% y para el tiempo de retención de 1.92%. El área promedio obtenida para la concentración de 513 ng fue de 2358419 $\mu\text{V}\cdot\text{s}$, con un tiempo promedio de retención de 0.527 minutos; las desviaciones relativas resultantes fueron de 4.25% para el área y 2.07% para el tiempo de retención (cuadro 3, 4, 5).

Para evaluar la *exactitud* del método, se obtuvo el porcentaje de recuperación de Rifaximina añadida a una muestra de leche (1ml de estándar 1/10, 4ml de leche y 5ml de metanol) en 4 repeticiones; en los cuales resultó un promedio de recuperación de 54.17%, con una desviación relativa de 4.5% (cuadro 6).

En el estudio de la *especificidad*, al realizar las inyecciones del estándar y de la leche con Rifaximina añadida, no se encontró ninguna señal con tiempo de retención similar o igual al de la Rifaximina que interfiriera en su identificación; es decir, no existieron elementos que presenten una longitud de onda igual a la Rifaximina.

El *límite mínimo de detección*, se calculó al identificar el tamaño de la respuesta del área en doble de la respuesta del nivel umbral de la señal del detector}; en el caso de la Rifaximina resultó de 30 ng/ml. El límite mínimo de cuantificación se estimó al multiplicar el límite mínimo de detección por el volumen de inyección y

dividido entre el volumen de la muestra. En este caso resulto ser de 150ng de Rifaximina en la muestra.

El estándar de Rifaximina fue estable al mantenerse en refrigeración a 4°C; las muestras se mantuvieron en congelación hasta su estudio. La *estabilidad* se comprobó mediante la inyección de los estándares por tres ocasiones a intervalos de 30 días. La desviación relativa obtenida para la concentración de 128ng fue de 3.22%, para la concentración de 256ng fue de 1.24% y en la concentración de 513ng de 1.75% (cuadro 7).

CINÉTICA DE LA RIFAXIMINA EN LECHE

En una de las dos vacas en producción de leche a la que se le aplicó Rifaximina por infusión intramamaria, se identificó la presencia del antimicrobiano, el cual persistió por 5 días después de la administración, obteniéndose concentraciones que variaron de 1684.2ng/ml a 1112.2 ng/ml. En las muestras de la segunda vaca, se encontró concentraciones que variaron de 3373.927 ng/ml a 697.17 ng/ml en el cuarto día. Las muestras de leche examinadas resultaron negativas a partir del sexto día. (cuadro 8).

Se aplicó la fórmula $C_R = C_i * e^{-at}$, que describe los parámetros de cinética de primer orden; donde: C_R , es la concentración residual (716 ng/ml); C_i , la concentración inicial (3370 ng/ml); e , es el logaritmo neperiano; a , es el coeficiente de depuración; t , es el tiempo en horas. En este análisis se encontró que para la primer vaca el coeficiente de depuración fue de 0.0122 y la vida media fue de 24.6

horas; con un área bajo la curva (AUC) de 8.65 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$ obtenido mediante el PK analyst. Aplicando la misma fórmula para la segunda vaca, se obtuvo un coeficiente de depuración de 0.00749 con una vida media de 23.9 horas; con un AUC de 7.75 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$.

ESTUDIO DE CAMPO

En el análisis de las muestras de calostro de 20 vacas, que al inicio del descanso lactacional recibieron un tratamiento de Rifaximina por vía intramamaria (100 y 200mg), el estudio por HPLC resultó negativo a la presencia del antimicrobiano (figuras 6, 7, 8, 9, 10).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la validación del método por HPLC fueron satisfactorios. En el estudio de linealidad, se presenta un correlación mayor de 0.992, cuando se requiere que está sea mayor a 0.99, lo cual es lo ideal establecido por la Unión Europea²⁶. Para la repetitividad se obtuvo una correlación de 0.997, lo que supera el parámetro establecido por Smedley²⁴, quien menciona que el ideal es mayor a 0.98. En realidad, esta cifra depende de la experiencia del operador y de las facilidades de trabajo en el laboratorio.

Respecto a la desviación relativa obtenida al estudiar la precisión del método con resultados de 4.25 y 4.43% en las áreas, y 2.07 y 1.92% para los tiempos, según lo mencionado para la validación del método²³, los porcentajes obtenidos están fuera de lo esperado (1.5%). Sin embargo en diferentes investigaciones en las que se utilizó el HPLC, los resultados de coeficiente de variación al validar el método fueron de 3, 10.8 y 9.1%.^{18,19,20}; lo que demuestra la oscilación que podemos obtener al desarrollar un método con respecto al ideal establecido. Esto se asocia a la habilidad del operador así como las exigencias que se presentan en el laboratorio.

El promedio del porcentaje de recuperación obtenido (54%) es bajo con respecto a lo que se menciona en diversos estudios^{18,19}, así como lo establecido por los manuales, el cual es de 90%^{23,24}. Se requiere realizar dos extracciones de la misma muestra con el disolvente para tener una extracción completa, los dos

extractos para que la recuperación del fármaco sea cercana al 90%, que es la cantidad aceptable durante la validación del método.

La especificidad resultante permite hacer mediciones exactas del área y altura del pico que corresponde a la Rifaximina en el cromatograma. EL pico producido por el frente disolvente es anterior al de Rifaximina y se puede descartar fácilmente mediante el tiempo de retención que presenta el estándar o la adición de una concentración conocida, y que pueda referirse al incremento de la señal en el cromatograma.

Con el método establecido es posible hacer las mediciones correspondientes a las cantidades mínimas requeridas por la Unión Europea (60ng/ml), cuando el límite mínimo de detección obtenido es de 30ng/ml; se debe reconocer que la Unión Europea presenta las más estrictas exigencias en el control de la calidad de sus productos. Una alternativa es el uso de otros detectores más sensibles como lo es el de masas y el detector por fluorescencia.^{17,20,26}

Este método de HPLC desarrollado y validado, es una propuesta para el uso de tecnología existente en el país y su aplicación para el beneficio del ser humano al mejorar la calidad de los productos agroalimentarios y evitar residuos de fármacos en alimentos de origen animal.

No se encuentra en la literatura estudios de cinética de la Rifaximina en vacas lactando, debido al que el producto comercial esta hecho para su aplicación durante el descanso lactacional.

La ausencia de la Rifaximina en calostro después de haberse aplicada por infusión intramamaria al finalizar la lactación, corrobora los resultados señalados en un informe descrito por la Unión Europea y otras investigaciones^{14,17}. En una investigación de su distribución en la glándula mamaria de vacas, se encontraron residuos de 4µg/g en tejido glandular y seno lactífero, no encontrándose en plasma sanguíneo¹⁴. Se pueden derivar dos hipótesis de esta información: la primera es que, la Rifaximina se biotransforma y al tratar de identificarla no se detecta por ser una molécula distinta a la original. En la segunda hipótesis, se puede inferir que la molécula original se desintegra, por lo tanto no se detecta cuando se busca la molécula original, tal como sucedió en los ensayos de la presente investigación.

CONCLUSIONES

- a) El método por cromatografía líquida desarrollado e implementado cumple con los estándares propuestos para la validación de un método cromatográfico; es eficaz para la identificación de la Rifaximina en leche y calostro.
- b) La Rifaximina no persiste en calostro y leche al finalizar el descanso lactacional, cuando fue aplicada como parte de un programa para el control de mastitis al iniciar el descanso lactacional.
- c) En la cinética de la Rifaximina, aplicada en vacas lactando, se encontró un tiempo de persistencia de 5 días, con concentraciones que variaron de 697.17 ng/ml a 1112.2 ng/ml.

CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1

Confirmación de la linealidad (r^2) de los estándares de Rifaximina (Rifa)

<i>Ensayo</i>	<i>Dilución</i>	<i>mg/ml</i>	<i>ngRifa/50μl</i>	<i>Área</i>	<i>r^2</i>
1	0.01	0.01026	513	2364994	0.992
2	0.01	0.01026	513	2423337	
3	0.02	0.00513	256	1368923	
4	0.02	0.00513	256	1335423	
5	0.04	0.00257	128	500364	
6	0.04	0.00257	128	568163	

r^2 =coeficiente de correlación

Cuadro 2

Resultados de estudio de estándares de Rifaximina para la obtención de la repetitividad.

ng/50 μ l	<i>Area</i> <i>μV*s</i>	<i>Area</i> <i>μV*s</i>	<i>Area</i> <i>μV*s</i>	<i>Area</i> <i>μV*s</i>	<i>Area</i> <i>μV*s</i>	<i>Prom</i> <i>μV*s</i>	<i>Desv</i> <i>relativa</i>
513	2364994	2423337	2314141	2219911	2291076	2322692	3.303
256	1368923	1335423	1371355	1344997	1367111	1357562	1.19
126	550364	551105	558389	568173	519390	549484	3.32

Desv relativa= desviación relativa

μ V*s=milivolts por segundo

Cuadro 3

Precisión del HPLC para la Rifaximina (concentración de estándar 128 ng/ml)

<i>Número de inyección</i>	<i>Area μV*s</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>
1	551496	0.51
2	506983	0.52
3	521009	0.53
4	548963	0.53
5	511236	0.53
<i>Media</i>	527605	0.52
<i>Desv estándar</i>	20995	0.00894
<i>Desv relativa</i>	3.98%	1.71%

Desv estándar= desviación estándar Desv relativa=desviación relativa μV*s=milivolts por segundo

Cuadro 4

Precisión del HPLC para la Rifaximina (concentración de estándar 256 ng/ml)

<i>Número de inyección</i>	<i>Area μV*s</i>	<i>Tiempo de retención(min)</i>
1	1368923	0.53
2	1335423	0.52
3	1371355	0.51
4	1244997	0.51
5	1267111	0.53
<i>Media</i>	1316516	0.519
<i>Desv estándar</i>	58441	0.01

Desv relativa 4.43% 1.92%

Desv estándar= desviación estándar Desv relativa=desviación relativa $\mu V*s$ =milivolts por segundo

Cuadro 5

Precisión del HPLC para la Rifaximina (concentración de estándar 513 ng/ml)

<i>Número de inyección</i>	<i>Area</i> $\mu V*s$	<i>Tiempo de retención (min)</i>
1	2364994	0.52
2	2423337	0.54
3	2314141	0.52
4	2219911	0.52
5	2480822	0.54
<i>Media</i>	2358919	0.527
<i>Desv estándar</i>	100449	0.01
<i>Desv relativa</i>	4.25%	2.07%

Desv estándar= desviación estándar Desv relativa=desviación relativa

$\mu V*s$ =milivolts por segundo

Cuadro 6

Análisis de recuperación de Rifaximina

<i>Número de ensayo</i>	<i>ng Rifa/50μl</i>	<i>Cantidad recuperada</i>	<i>%</i>
1	205.2	109.967	53.59
2	205.2	114.781	55.93
3	205.2	104.583	50.96
4	205.2	115.688	56.37
		<i>Media</i>	54.17
		<i>Desv estándar</i>	2.48

Desv relativa

4.59

Desv estándar= desviación estándar

Desv relativa=desviación relativa

$\mu V*s$ =milivolts por segundo

Cuadro 7

Medición de la estabilidad del estándar

<i>ngRifa/50μl</i>	<i>Area $\mu V*s$</i>	<i>Area $\mu V*s$</i>	<i>Area $\mu V*s$</i>	<i>Prom $\mu V*s$</i>	<i>Desv relativa</i>
513	2364994	2423337	2342689	2377007	1.75
256	1368923	1335423	1348693	1351013	1.24
128	527163	510388	544369	527306.7	3.22

Desv estándar= desviación estándar

Desv relativa=desviación relativa

$\mu V*s$ =milivolts por segundo

Cuadro 8

Concentraciones de Rifaximina en leche de vacas tratadas en lactación

<i>Vaca</i>	<i>Día</i>	<i>Area $\mu V*s$</i>	<i>Concentración ng/ml</i>	<i>Vaca</i>	<i>Día</i>	<i>Area $\mu V*s$</i>	<i>Concentración mg/ml</i>
46	1	*	*	102	1	296797	1102.415
46	2	806895	3373.927	102	2	427463	1684.282
46	3	434615	1716.13	102	3	299726	1115.458
46	4	205794	697.17	102	4	252270	904.132

46	5	*	*	102	5	299009	1112.265
46	6	*	*	102	6	*	*
46	7	*	*	102	7	*	*

$\mu\text{V}\cdot\text{s}$ =milivolts por segundo

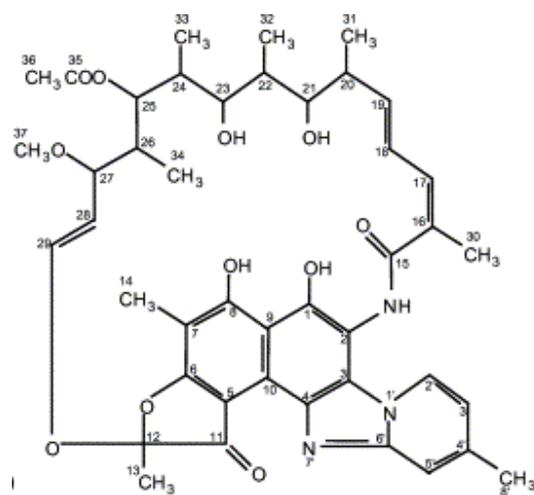


Figura 1 Estructura química de la Rifaximina (Bonechi, Corbini, Bonati, 2004)

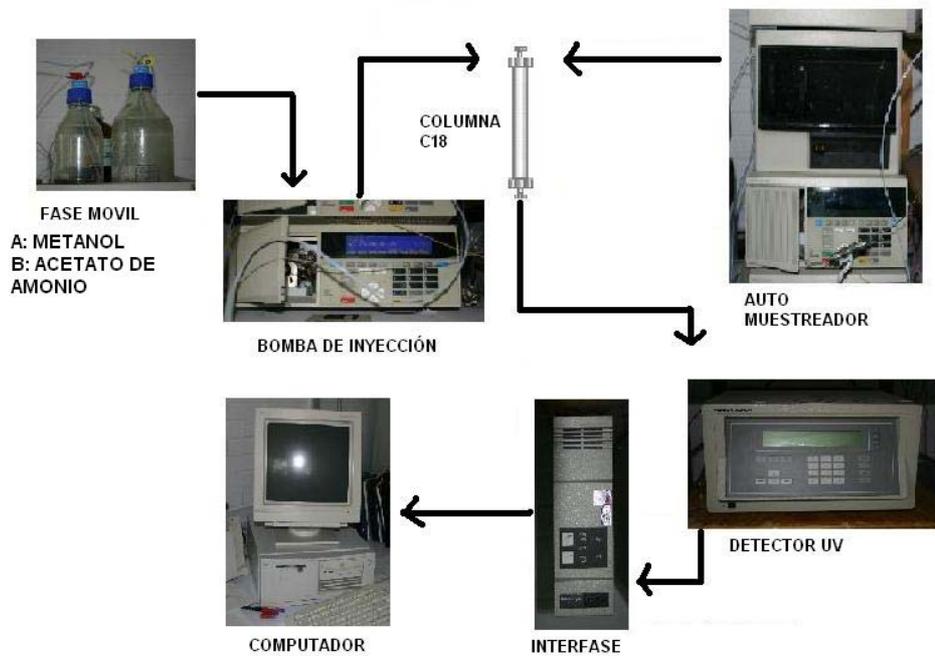


Figura 2. Funcionamiento del HPLC. La muestra extraída es colocada en la bandeja del automuestreador, el cuál la inyectara hacia la guardacolumna y posteriormente a la columna C18. Al mismo tiempo, la bomba de inyección se encarga de inyectar la fase móvil (encargada del arrastre de los compuestos) hacia la misma columna. Los compuestos se forman en diferentes paquetes proyectándose en diferentes tiempos de retención, y son identificados por el detector UV que enviará la información a través de una interfase hacia el computador, donde se presentarán los cromatogramas mediante el Total Chrome.

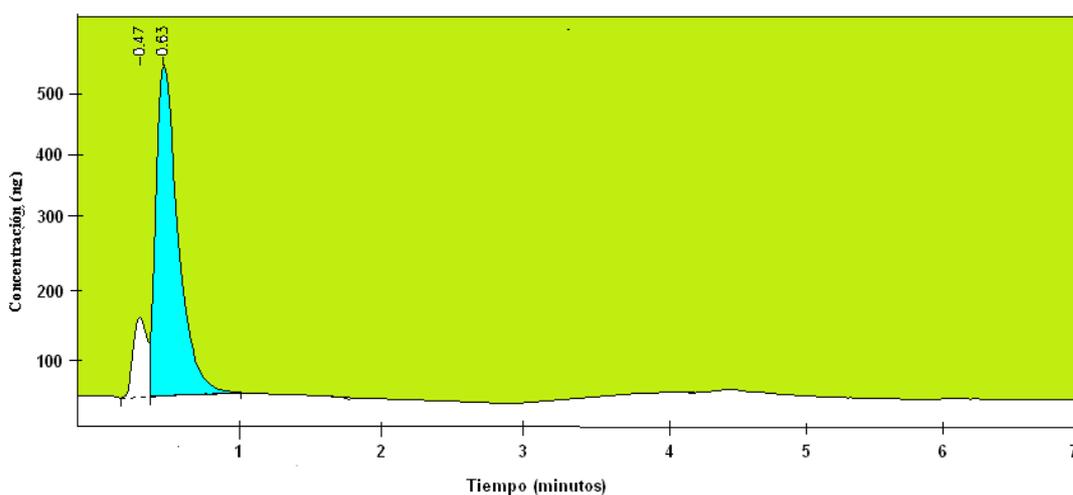


Figura 3 Análisis de Rifaximina (concentración 513 ng). El área azul representa el pico del antimicrobiano. El gráfico proviene del cromatograma dispuesto por el programa Total Chrome

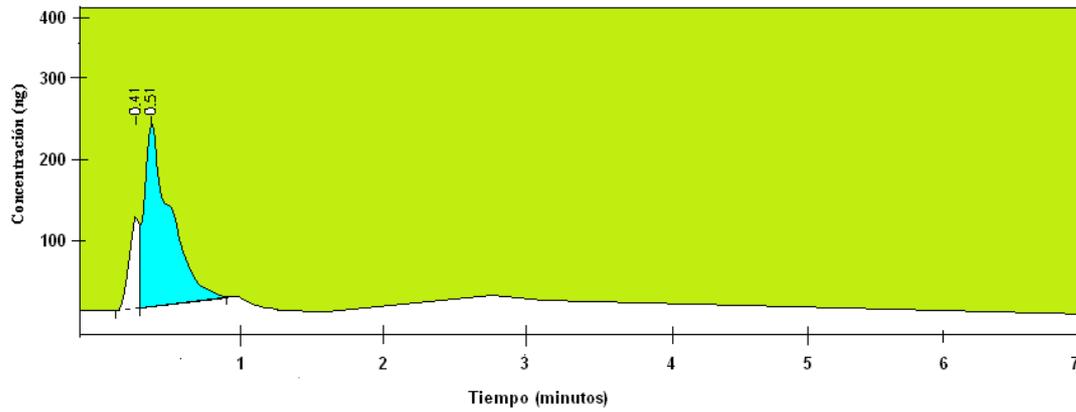


Figura 4 Análisis de Rifaximina (concentración 256 ng). El área azul representa el pico del antimicrobiano

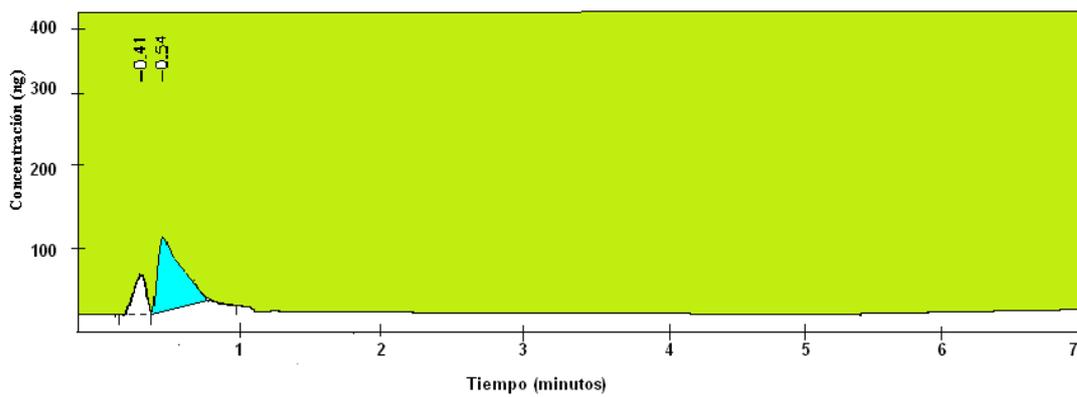


Figura 5 Análisis de Rifaximina (concentración 128 ng). El área azul representa el pico del antimicrobiano

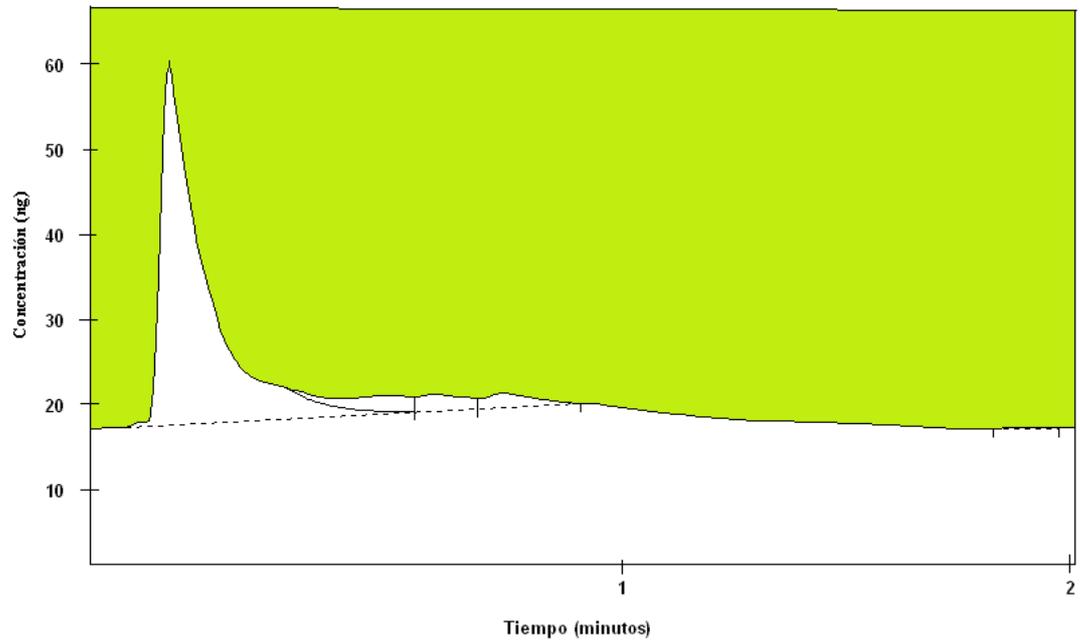


Figura 6 Muestra de calostro (primer día). No se encuentra la señal con igual tiempo de retención que el estándar de la Rifaximina.

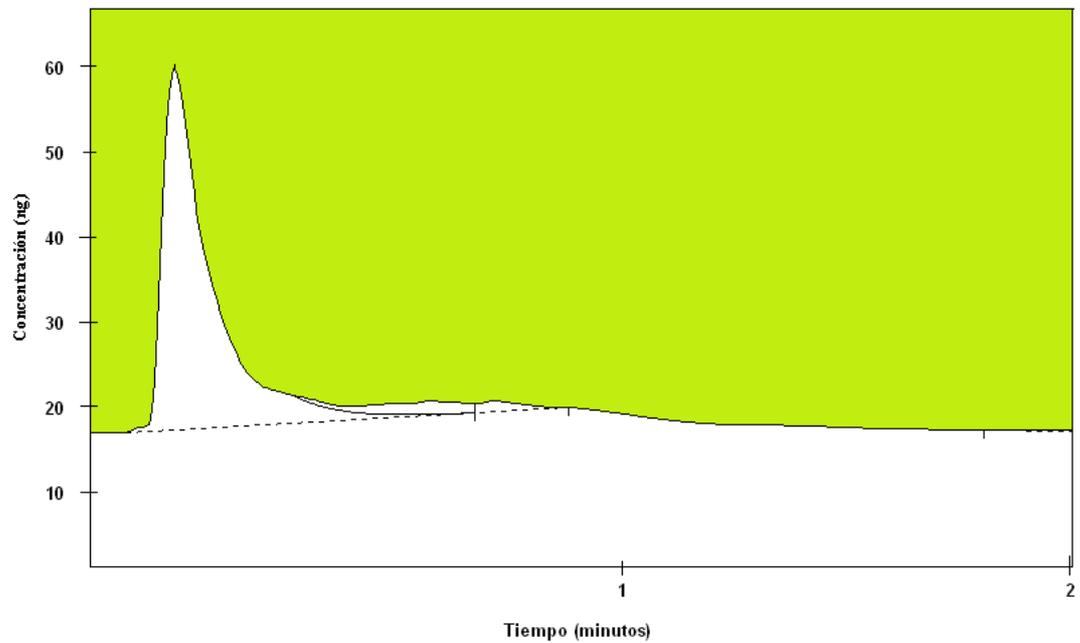


Figura 7 Muestra de calostro (segundo día). No se encuentra la señal con igual tiempo de retención que el estándar de la Rifaximina.

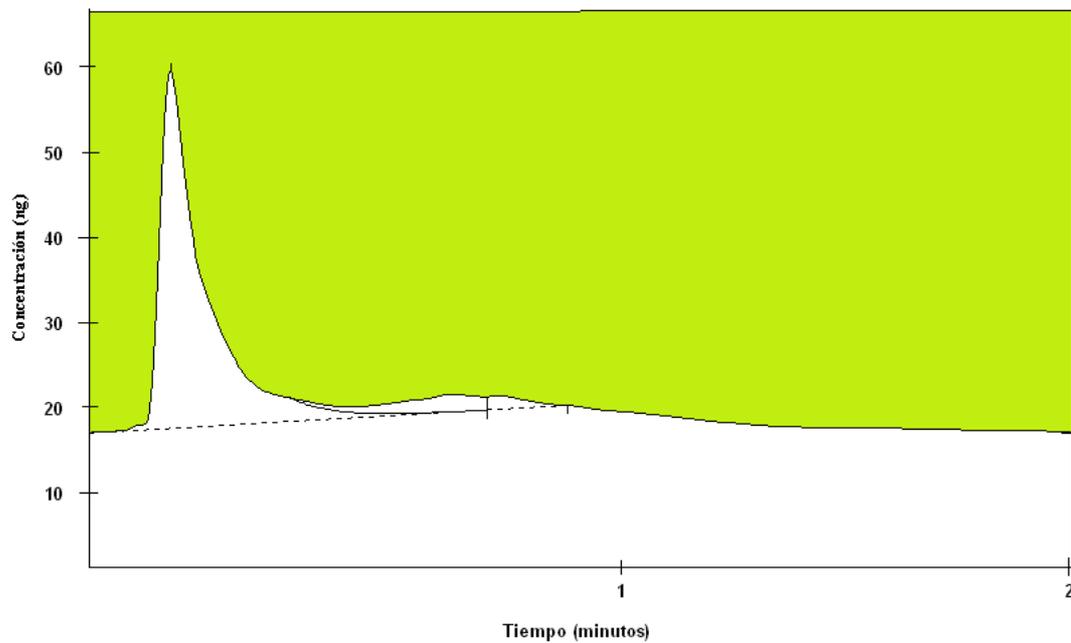


Figura 8 Muestra de calostro (tercer día). No se encuentra la señal con igual tiempo de retención que el estándar de la Rifaximina.

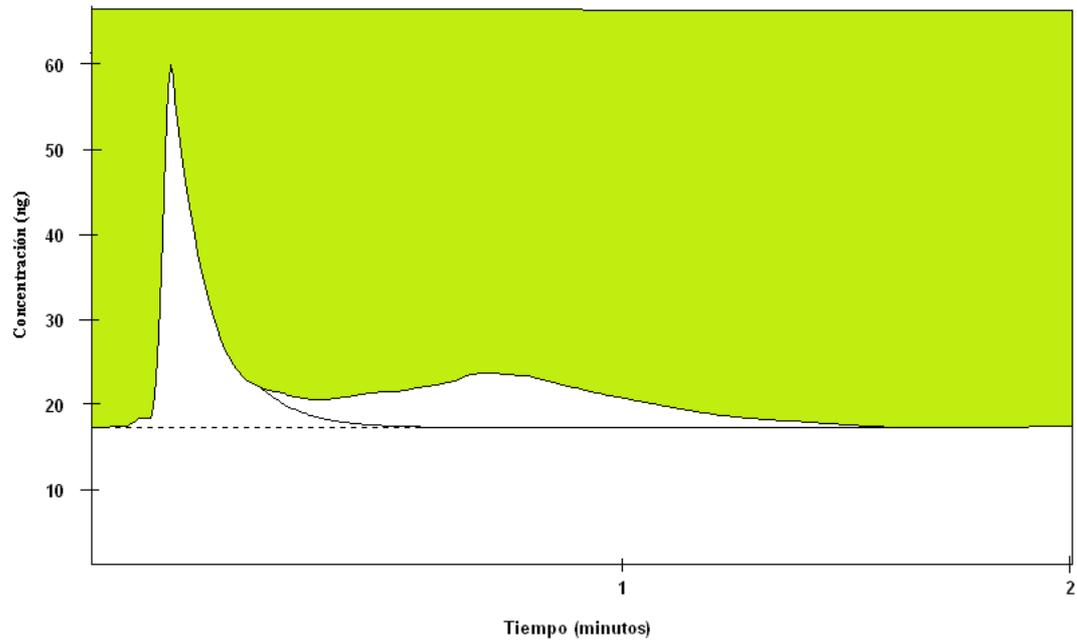


Figura 9 Muestra de calostro (cuarto día). No se encuentra la señal con igual tiempo de retención que el estándar de la Rifaximina.

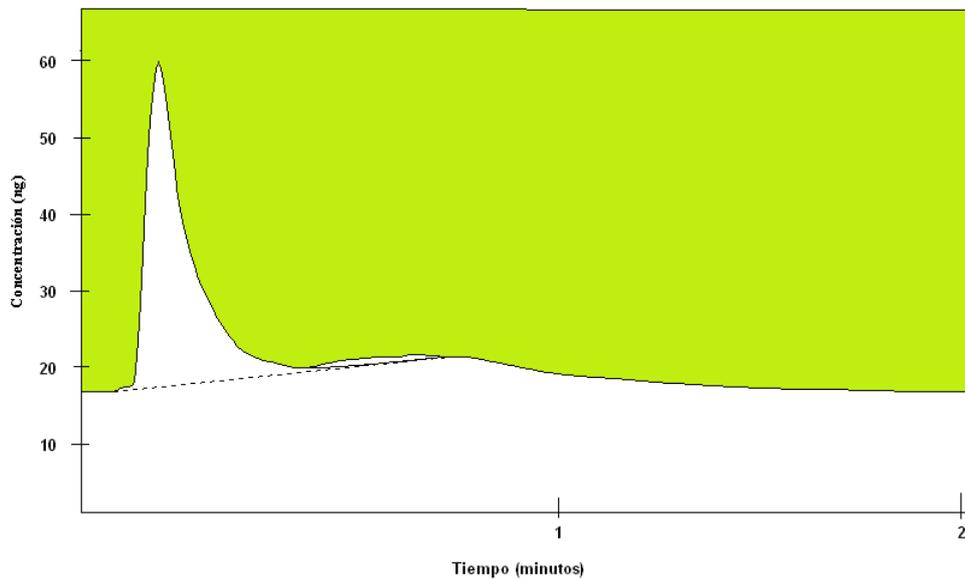


Figura 10 Muestra de leche (quinto día). No se encuentra la señal con igual tiempo de retención que el estándar de la Rifaximina.

REFERENCIAS

1. Schalm OW, Carroll JE, Jain CN. Bovine mastitis. Philadelphia: Lea & Febiger. 1971, 110-192
2. Ocampo L. Calidad composicional de leche. Proceedings of the III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de Leche; 1997, Guanajuato, México.
3. Nollet L. Handbook of food analysis. New York :M. Dekker,1996
4. Botsoglou, Nikolaos A. Drug residues in foods : pharmacology, food safety, and analysis. New York : M. Dekker, 2001
5. Ocampo L. Residuos de Antibióticos en Productos de Origen Animal. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgClig011.pdf>
6. Ley General de Salud. Reglamento en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 18 de enero de 1988.
7. Salix products. Xifaxan Physician Resource Center Salix Pharmaceuticals, Inc.; c2002 (updated May 2004; cited Sept 2004). Disponible en: <http://www.salix.com/products/xifaxan/index.aspx>.
8. Gobernado M. y Ponce J. Revisión Rifaximina. Revista Especializada en Quimioterapéuticos volumen 17 numero 2: 141-143 2004
9. Domínguez A. La circulación del medicamento en el organismo. Capítulo 2. Programas informáticos Abbot Laboratories. Universidad de Salamanca 1999.

10. Lullman H, Mohr K, Ziegler A.. Atlas de farmacología. Primera edición. Barcelona: Ediciones científicas: 1992
11. Ley General de Salud. Buenas Prácticas de Fabricación para Fármacos; 19 de octubre de 1998. Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998.
12. Asta F, Venturini A. Report of pharmacokinetics in rats, dogs, after oral administration. Proceedings of the III Mediterranean Congress of Chemotherapy, 1982; Dubrovnik, Yugoslavia
13. Bertocchi L, Varisco G, Farina G. Rifaximin and Cephacetrile in a control program for *staphylococcus aureus* infections in dairy herds. Proceedings of the XVII World Buiatric Congress; 2000, Bologna, Italia.
14. Rufo G. Fatroximin. Dry Cow Intrammary Ointment: in vitro udder pharmacokinetics. Institute of Infectious Diseases, Profilaxis and Veterinary Policy, University of Milan. Clinical Report. Bologna (Italia), 1992, 17
15. Moulin G. Activity of Rifaximin in milk secretions in the dry Cow. National Center for Veterinary and Food Studies, Ministry of Agriculture and Forestry, Laboratory of Veterinary Drugs. Clinical Report. Bologna, Italia, 1991, 21
16. The European Agency for the Evaluation of medical products, Summary Report. European Medicines Agency; 2008 (updated 2008 Jan 8; cited 2001 Dec. Disponible en:
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/press/pr/085899.pdf>

17. The European Agency for the evaluation of medicinal products, Summary Report. European Medicines Agency; 2001 (updated 2001 Feb 12; cited 1999 Dec). Disponible en:
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/044398en.pdf>
18. Pérez L, Palma C, Villegas R, Vega M. Metodología analítica y detección de residuos de Ivermectina en muestras de leche de rebaños de la Provincia Ñuble, Chile. Universidad de Concepción. Archivo Médico Veterinario, 2006; 2:143-150
19. Riediker S, Diserens J, Stadler R. Analysis of β -Lactam antibiotics in incurred raw milk by rapid test methods and Liquid Chromatography. J Agric Food Chem 2001; 49: 245-252
20. Xianhua Z, Jingli D, Ke L, Liya Z, Suodi Z. Sensitive quantification of rifaximin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2006 Dec 19; 850:358-359.
21. Botsoglou R, Nikolaos A. Drugs in food-producing animals: a general view of drug usage. Drug residues in foods: pharmacology, food safety, and analysis. First edition. New York (EUA), 2001, 173-185
22. Dickes G. Gas Chromatography in Food Analysis. London Butterworths, London, 1976, 3-21
23. Leo M, Nollet L. Instruments and techniques. Handbook of food analysis. First edition. New York : M. Dekker, 1996, 2057-2135

24. Smedley L, Weber R. Bacteriological Analytical Manual Online, Rapid HPLC Determination of Sulfamethazine in Milk. Center for Food Safety and Applied Nutrition, c2001. Disponible en:
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
25. Kasavic Y. HPLC for pharmaceutical scientists. Second edition. Michigan: Wiley, 2007, 93-127
26. McNair H. Basic Liquid Chromatography. First edition. Massachusetts: Wiley, 1998, 113-215
27. Dario R. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. Red Latinoamericana de Química, 1996. Disponible en :
<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.html>
28. Caraballo G.R. Cinética y efecto del fosfato sódico de dexametasona en líquido articular de caballos (tesis de maestría). México D:F. FMVZ, UNAM, 2008
29. García M.J., Calmet F.J. Métodos cromatográficos. Segunda edición. Barcelona: Toray Masson, 1975, 34-58