

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTADA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE AMOXICILINA Y ÁCIDO CLAVULÁNICO
POR HPLC EN LECHE DE VACAS TRATADAS POR MASTITIS CLÍNICA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

ISMAEL MARTÍNEZ CORTÉS

ASESORES.

MVZ, MSc. Salvador Avila Téllez

MVZ, MSc. Rene Rosiles Martínez



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A las tres personas más importantes en mi vida, mi abuelita; Guadalupe Raquel Martínez Vázquez, mi madre; Amparo Cortés Martínez y mi padre el señor Ismael Martínez Ibarra.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO Y LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA por permitirme formar parte de una institución tan privilegiada y reconocida internacionalmente.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Salvador Avila Téllez, por todos sus consejos, apoyo, dedicación y confianza depositada en mi persona para ser un mejor ser humano y trabajar con dignidad.

Al Doctor Rene Rosiles Martínez, quien estuvo trabajando conmigo arduamente para el logro de este trabajo y quien siempre estuvo dispuesto a resolver todos aquellos problemas que se presentaban día a día.

Un sincero agradecimiento a el laboratorio BROVEL por todo su apoyo técnico y suministro de medicina y material, así como la donación de muchos de los insumos que se utilizaron para el desarrollo de este proyecto de investigación

Al Ingeniero José Ignacio Figueroa C. y al MVZ David Altamirano Hernández por permitirme los apoyos necesarios para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Agradecemos también a la Doctora Lilia Gutiérrez Olvera del Departamento de Fisiología y Farmacología FMVZ-UNAM por sus críticas constructivas y tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A mis amigos y compañeros que siempre han estado conmigo, la señora Gloria Álvarez Barranco , Radharani, Ra, Gabriel, Miguel, Jesús y a la familia Bernal y en especial a Karla, compañera, amiga y hermana.

A la señorita Dalia Fletes Casillas por todos aquellos momentos difíciles que pasamos y todo el apoyo brindado por ella y su apreciable familia durante el tiempo de desarrollo de este trabajo de investigación.

CONTENIDO

1) RESUMEN.....	Pág. 1
2) INTRODUCCIÓN.....	Pág.. 2
3) JUSTIFICACIÓN.....	Pág. 9
4) HIPÓTESIS.....	Pág. 9
5) OBJETIVO.....	Pág. 9
6) MATERIAL Y MÉTODOS.....	Pág. 10
7) RESULTADOS.....	Pág. 16
8) DISCUSIÓN.....	Pág. 18
9) CONCLUSIONES.....	Pág. 20
10) REFLEXIONES.....	Pág. 20
11) CUADROS Y FIGURAS	Pag.21.
12) REFERENCIAS.....	Pag.25

RESUMEN

MARTÍNEZ CORTÉS ISMAEL. Identificación de residuos de Amoxicilina y Ácido clavulánico por HPLC en leche de vacas tratadas por mastitis clínica. MVZ, MSc. Salvador Avila Téllez, MVZ, MSc. Rene Rosiles Martínez.

Resumen

Establecer Límites Máximos Permisibles (LMP) para residuos de fármacos en leche, es trascendental tanto para la salud humana como para la de los animales. El objetivo del establecimiento de estos límites permite estandarizar la cantidad máxima de residuos de fármacos que al consumidor no le generarán problemas de salud. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), es aceptada para uso oficial como prueba para la identificación de fármacos en leche. El presente estudio se realizó con 420 muestras de leche obtenidas de 35 glándulas mamarias de vacas tratadas por mastitis clínica con 900 mg amoxicilina y 180 mg de ácido clavulánico por glándula. Las muestras de leche se colectaron dos veces al día con intervalo de 12 horas, por 6 días. Estas se analizaron por HPLC, encontrando al onceavo ordeño (5.5 días) concentraciones de residuos de amoxicilina de 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 0.001 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de ácido clavulánico en leche. Estas cantidades al compararse con las señaladas por la Comunidad Europea, resultaron similares.

Introducción

La leche es una secreción de la glándula mamaria de los mamíferos, que a nivel nutricional es un alimento de valor biológico elevado.¹ El Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios, de la Secretaría de Salud establece que la leche destinada para consumo directo y la que se emplee como materia prima en procesos para la obtención de derivados de la misma, debe provenir de animales limpios, sanos; y debe ser leche con calidad sanitaria y libre de toda posible contaminación que ponga en riesgo la salud del consumidor. Así mismo la Norma Oficial Mexicana *NOM-184-SSA1-2002* y la Norma Mexicana *NMX-F-700-COFOCALEC-2004*, establecen que la leche que se emplee como materia prima debe presentar una prueba de inhibidores bacterianos con resultado negativo.

El ganado bovino productor de leche ha sido seleccionado para realizar una producción muy demandante que representa un reto fisiológico grande y que puede conllevar a infecciones frecuentes principalmente en la glándula mamaria, la mastitis es una patología común que presentan las vacas destinadas a la producción de leche y es, un factor que merma la obtención de leche con calidad^{2,3}.

La administración de medicamentos en los animales destinados a la producción de alimentos puede dejar residuos de fármacos en los productos obtenidos a partir de los animales tratados. Se dice que “cuando un antibiótico se administra por la vía intramamaria a una vaca lechera, inmediatamente a la administración existen concentraciones tan elevadas en leche, que son capaces de contaminar

la leche producida por otras 2500 vacas.” Cuando pasa más tiempo, y las concentraciones son mucho más bajas, la leche del animal tratado sigue siendo contaminante al mezclarse con la de otros animales⁴.

Para la producción de leche con calidad hay que aplicar procedimientos sanitarios correctos en el desarrollo de las prácticas de manejo que se realizan diariamente en la cadena de producción. Entre estos procedimientos está la selección y uso adecuado de los antimicrobianos empleados para el tratamiento del ganado contra diferentes patologías, siendo necesario conocer el tiempo de eliminación del medicamento aplicado para evitar los residuos en la leche músculo y otros subproductos.

Es conocido que concentraciones altas de residuos de fármacos son la principal falla y los principales problemas sanitario y económico en la producción de derivados lácteos⁵. Además puede constituir un riesgo para la salud del consumidor ya que los procesos de pasteurización lenta o rápida no logran la destrucción de la mayor parte de los fármacos⁶. A este respecto se realizaron análisis de leche de diferentes marcas comerciales y con diferentes tratamientos de pasteurización, encontrando un 33% de las muestras positivas a la prueba de inhibidores y de éstos, el 71% contenían tetraciclina^{6,7}.

Lo antes mencionado es importante ya que en la producción de derivados lácteos fermentados como pudieran ser el yogurt o el queso, las bacterias lácticas son de gran importancia en el proceso y estas, podrían desaparecer por la actividad de fármacos como los β -lactámicos. Este hecho es útil ya que la destrucción o disminución en el número de bacterias que producen ácido láctico,

es necesario para la obtención de los productos. Este hecho puede acarrear problemas económicos muy serios para la industria láctea, así también es importante ya que el uso de este tipo de medicamentos como los β -lactámicos es muy común en el tratamiento de problemas infecciosos en animales en lactación^{7, 8}. El lactosuero a pesar de la temperatura a la que es sometido durante su proceso, recibe una alta porción de residuos de antibióticos presentes en la leche, los cuales generan problemas de resistencia bacteriana en la población humana y en los animales^{6, 9}. También es necesario tener presente que en la alimentación animal de nuestro país, el uso del suero de quesería, que es un subproducto rico en proteínas y otros componentes lácteos, se utiliza de manera cotidiana y sin darle importancia a la calidad que este pueda presentar. Esto refuerza la importancia de controlar la presencia de residuos en leche, para evitar el problema de resistencia bacteriana y hacer más eficiente con esto la terapéutica veterinaria^{6, 9}.

Es necesario establecer límites máximos de residuos de fármacos en los productos de origen animal para las sustancias utilizadas como medicamentos veterinarios con el fin de proteger la salud de los consumidores. A este respecto la EMEA (The European Agency for Evaluation of Medicinal Products, *Veterinary*) y la FDA, (Food and Drug Administration) han establecido los Límites Máximos Permisibles (MRL's) para amoxicilina y ácido clavulánico 4 y 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ por la EMEA y 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de amoxicilina y 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de ácido clavulánico por la FDA^{10, 11}. Al realizar estudios con concentraciones de fármaco conocidas y evaluando la cinética que estos presentaban, para conocer con esto, los tiempos de retiro óptimos para que un alimento presente concentraciones

aceptables de estos fármacos. De la misma forma dan a conocer el nivel de no efecto de resistencias bacterianas (NOEL-bacteriológico) lo cual expresa la cantidad de fármaco que no genera ninguna reacción a nivel bacteriano *in vitro*. Con esto se obtiene la cantidad de fármaco que no generará ningún tipo de reacción en los consumidores (NOEL). Los MRL's son establecidos por cada país según criterios propios. Debido a esto, es de consideración vigilar la presencia de fármacos en leche, tanto por el productor como por la autoridad responsable o por las organizaciones de productores y la industria. Por esto es necesario que se cumpla estrictamente la Norma Oficial Mexicana NOM-184-SSA1-2002.

La identificación de límites máximos permisibles se debe hacer mediante métodos rápidos, confiables y eficientes, que pueda ofrecer resultados estrictos, para la protección de la salud de los consumidores.

Es justificable identificar la intensidad de eliminación a través de la leche de los antibacterianos que se usen para el tratamiento de vacas con mastitis. Para atender con énfasis el tiempo de eliminación que presenten cada uno de ellos; Esto es con el fin de aplicar las estrategias de manejo correcto de los antibióticos para evitar la contaminación de la leche y no poner en riesgo la salud del consumidor.

Para la detección de antibióticos en leche se han desarrollado métodos que permiten detectar en forma rápida y precisa los residuos, como es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se entiende por vida media al tiempo necesario para que llegue la concentración residual a la mitad de la concentración inicial. El coeficiente de eliminación se describe como la constante de eliminación es decir el equilibrio entre el tiempo y concentración del fármaco durante el experimento. El tiempo de retiro es el tiempo necesario para que la concentración de fármaco llegue a la cantidad máxima aceptable por las autoridades sanitarias. La cinética de eliminación se define como las concentraciones del fármaco identificadas por muestreo durante el tiempo experimental.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El método por HPLC es accesible, de alta especificidad y se ha utilizado en estudios para la detección de antimicrobianos en líquidos corporales. Prueba que tienen límites amplios de detección y por lo antes dicho, se justifica su uso como rutina oficial en el análisis para la identificación de fármacos¹².

Para el correcto funcionamiento de este método, se requiere de:

1.- El puerto de inyección; este mecanismo nos permite después de la inyección de aproximadamente 60 μ l, seleccionar el volumen específico a través de una asa volumétrica.

2.- Columna; Esta parte está compuesta de la fase móvil y la fase estacionaria, la fase móvil, la cual es un solvente que está fluyendo en forma continua a través de una columna, en esta columna se alojan las dos fases. La función de la fase móvil (líquida) es la de acarrear la muestra inyectada a través del

cromatógrafo y la de la fase estacionaria es la de retención de los componentes de la muestra, hasta llegar a un equilibrio de arrastre.^{12, 13}.

La separación de los componentes de la muestra, se da según la afinidad que tenga cada compuesto ya sea por la fase móvil o por la estacionaria, lo cual se observó con la salida de los compuestos en diferente tiempo, a este tiempo se le conoce como tiempo de retención^{12, 13}.

3.- Una vez lograda la separación, los compuestos son identificados al termino de la columna por el detector (ultravioleta) para este caso. Existen otros tipos de detectores los cuales serán seleccionados según la estructura y sensibilidad del compuesto a detectar.

4.- Dichos compuestos son enviados a una interfase la cual permite su integrar y graficar en un sistema de computación, para posteriormente poder ser interpretadas^{13, 14}.

Estructura química.

Entre los antibióticos utilizados para el tratamiento de mastitis en ganado lechero se usa la amoxicilina (β -lactámico semisintético de amplio espectro, derivada de la penicilina, con una modificación en su anillo β -lactámico) que produce daño en la pared celular de las bacterias e inhibe la síntesis de péptidoglicano. Otro fármaco que se usa en combinación con la amoxicilina para el tratamiento de la mastitis es el ácido clavulánico; este es producido por la fermentación de *Streptomyces clavuligerus* y posee la capacidad de inactivar una gran variedad de β -lactamasas mediante el bloqueo de los sitios activos de estas enzimas.

Vía de administración

La administración de los antibióticos vía intramamaria es la forma más directa para el tratamiento de mastitis. La difusión de fármacos a la glándula mamaria se da por métodos pasivos y depende de las propiedades de éste, como es la solubilidad en lípidos o en agua, grado de disociación, grado de micronización, coeficiente de partición y gradiente de concentración.

Se dice que el calentamiento o pasteurización de la leche no modifica el contenido de amoxicilina, aunque ocasionalmente sí altera la actividad antimicrobiana; también indican que los vehículos o los procedimientos de manufactura de los fármacos son distintos, por lo que la farmacocinética será diferente y por lo tanto la eliminación de los residuos de los fármacos será de 60 a 144 horas¹⁵.

Justificación.

Los residuos en leche de amoxicilina y ácido clavulánico podrán afectar la salud del consumidor, así como la manufactura de los derivados lácteos. Por lo anterior se justifica el estudio de residuos de fármacos en leche, el desarrollo y validación de métodos bioanalíticos de alta sensibilidad como HPLC para la identificación de medicamentos como la amoxicilina con ácido clavulánico utilizados en el tratamiento de mastitis en bovinos.

Hipótesis.

Los residuos de amoxicilina y ácido clavulánico identificables por cromatografía de líquidos de alta resolución en la leche de vacas postratamiento por vía intramamaria, desarrollan una cinética de eliminación.

Objetivo

Identificar los residuos de amoxicilina y ácido clavulánico en la leche a través del tiempo, después del tratamiento intramamario de vacas con mastitis.

MATERIAL Y MÉTODOS.

El estudio para la identificación de residuos de la amoxicilina y ácido clavulánico se llevó a cabo en la leche de vacas ubicadas en dos núcleos de producción, localizadas en el altiplano de México a 19° 16' latitud Norte, 99° 06' longitud Oeste, a 2240 msnm, en un clima templado, con una temperatura promedio anual de 14 a 16 °C con una precipitación pluvial de 700 a 800mm anuales, clima tipo C (wo) (w) B(I')¹⁶.

El trabajo se realizó con 35 muestras de leche de vacas Holstein-Friesian en producción. Como criterio de inclusión las vacas a tratar presentaron signos de inflamación en alguna de las glándulas mamarias (mastitis), así como alteraciones en la secreción láctea identificadas en los primeros chorros de leche al inicio del ordeño. El diagnóstico de la mastitis se realiza mediante: a) la exploración física de la ubre, b) prueba de tazón con paño negro y c) prueba de California para mastitis (CMT) ^{17, 18}. Estos animales no recibieron ningún tratamiento previo en las últimas dos semanas.

Las vacas seleccionadas, se ordeñaron mecánicamente y al finalizar éste, se preparó la ubre para la aplicación del tratamiento, como se menciona a continuación:

1. Lavado de pezones con agua potable, de modo que se remueva toda suciedad.
2. Secado de los pezones con toallas de papel desechable y limpias.

3. Antisepsia en los pezones con torundas impregnadas de alcohol al 70%, iniciando del meato del pezón hacia la base de este¹⁹, después se obtiene una muestra de leche de 50ml en un frasco estéril para la identificación del medicamento a estudiar.
4. Al termino del ordeño, se aplicó el medicamento en presentación de jeringas intramamarias, conteniendo amoxicilina 300mg, acido clavulánico 60mg, prednisolona acetato 10mg y un vehículo c. b, p, 8ml, dosis que se repitió cada 12 horas, por dos ocasiones más. Posteriormente se aplicó un antiséptico sobre el pezón.
5. En el siguiente ordeño con el procedimiento antes descrito se realizó la primera toma de muestra de leche la cual fue almacenada en un congelador a menos 28°C hasta su análisis en el laboratorio. Este procedimiento se repitió cada 12 horas durante 12 ocasiones es decir en los ordeños matutino y vespertino; hasta completar 420 muestras de leche para estudiar.
6. A toda vaca tratada se le dio seguimiento clínico, y se registro cualquier alteración que se presentara a nivel glandular.

Análisis de muestras.

Para la identificación de amoxicilina y acido clavulánico por HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución); se tomó como base el método descrito por Mohsen²⁰. Este es un método con un sistema isocrático y con las siguientes características cromatográficas.

1. Para la identificación de la Amoxicilina y Ácido clavulánico se utilizó una bomba de inyección binaria, detector ultravioleta (UV) a una longitud de

onda de 228nm, así como una columna fase reversa C18, de 100 x 4.6mm y tamaño de la partícula de 4 micras.

2. La fase móvil se compuso por una solución buffer de fosfato disódico 0.02M (molar) y metanol a una concentración de 96:4 v/v (960/40ml) respectivamente y con un pH 3, para ser bombeada con un flujo de 1.3 ml/minuto.

Para preparar la solución buffer a una concentración 0.02M, se obtuvo su peso molecular (141.954 g/L), útil para una obtener un litro de una solución 1M. De ahí se obtuvo la cantidad en gramos (2.839g/L) para que la solución tenga una concentración 0.02M y ajustando el pH a 3 con la aplicación de ácido fosfórico.

Una vez preparada la fase móvil (Sol. Buffer + metanol) y verificado que tenga un pH 3, la solución se hizo pasar a través de un filtro de borosilicato con la finalidad de retener partículas de un diámetro mayor a 0.05 micrómetros, y evitar el paso de partículas que puedan obstruir y modificar la señal del cromatograma.

Como parte final y antes de ser bombeada en el cromatógrafo la fase móvil fue sometida a una inyección de helio, para eliminar toda la cantidad de oxígeno que pudiera estar presente y provocar alguna reacción explosiva dentro del aparato.

3. Las soluciones madre de amoxicilina fue de 60mg/100ml y de 20mg/100ml de ácido clavulánico, disueltas en metanol. De estas soluciones se inyectaron 20µl de una dilución 1/10 la cual contenía 1.2ug/20µl amoxicilina y 0.4ug/20µl ácido clavulánico.

El procesamiento de la muestra se realizó de la siguiente manera.

1. Como primer paso se inyectaron en el cromatógrafo en varias repeticiones y en diluciones diferentes (1/10, 1/20 y 1/50), cada uno de los elementos que comprenden las soluciones de trabajo (metanol, amoxicilina y ácido clavulánico) con el fin de poder conocer las características respecto al tiempo de retención y el área de cada uno, para poder obtener el estándar con el cual serían analizadas las muestras a inyectar; la dilución de trabajo que presentó mejor respuesta fue 1/10 la cual contenía 1.2mg/20µl amoxicilina y 0.4mg/20µl ácido Clavulánico.
2. Preparación de la muestra.
 - 2.1- Se descongela la muestra de leche a temperatura ambiente.
 - 2.2- Se depositó la muestra de leche en un tubo con fondo cónico de 50ml y se centrifugó a 2500 revoluciones por minuto (RPM) por 20 minutos, con el fin de separar la grasa de la muestra.
 - 2.3- La grasa sobrenadante se separa por un medio físico.
 - 2.4- Se colecta 1 ml de leche y se le añaden 2ml de metanol para hacer la extracción del fármaco.
 - 2.5- Por medio de la adición de metanol se precipitan las proteínas al centrifugar la muestra a 2500 rpm por 25 minutos y extraer la amoxicilina.
 - 2.6- El sobrenadante fue transferido a un tubo de ensaye limpio con el fin de conocer la cantidad de la parte líquida y semilíquida de la muestra (sobrenadante y botón de proteínas) obtenida. Para conocer el valor de

dilución de cada muestra, volumen que sirvió para obtener la cantidad de amoxicilina y ácido clavulánico presente en cada muestra inyectada. Estos tubos fueron identificados según el número de la vaca y ordeño correspondiente.

3. Inyección de la muestra.

3.1- La identificación de la amoxicilina y el ácido clavulánico por HPLC, se hizo en 20µl del sobrenadante y éste se inyectó en el reodine con una jeringa de vidrio para cromatografía de líquidos.

3.2- Una vez abierto el reodine del inyector, se suministran 50µl del líquido. Este sistema lo hace pasar al asa dosificadora de 20µl y de aquí a la columna, que en este caso fue de C18 fase reversa. Una vez dentro de la columna la muestra es arrastrada por la fase móvil a una velocidad de flujo de 1.3 ml/min. Dentro de la columna el fármaco se sujeta a la fuerza de arrastre por la fase móvil y la fuerza de retención por la fase estacionaria y es identificado en el detector ultravioleta en un tiempo determinado (tiempo de retención); este fármaco es registrado a una longitud de onda de 228nm por la señal del integrador. El registro se dio por el tiempo de retención, la altura y/o la superficie de la señal.

3.3- El tiempo de corrida del cromatograma fue de 5 minutos, tiempo en el cual se observaron los diferentes picos correspondientes a: metanol, amoxicilina y ácido clavulánico respectivamente, según el tiempo de retención de cada uno.

Los cromatogramas fueron usados para la identificación y cuantificación de los fármacos en la muestra al referirlos al estándar. El tiempo de retención de la amoxicilina fue de 1 minuto y el del ácido clavulánico de 2 minutos; el tiempo del cromatograma fue de 5 minutos; los 3 minutos restantes se utilizaron para lavar el sistema y llevar la línea base de respuesta a cero.

4. Evaluación de resultados.

4.1- Las concentraciones de amoxicilina y ácido clavulánico, se agruparon por número de ordeño (del 1º al 12º); y de cada grupo se obtuvieron el promedio, la desviación estándar y concentraciones máximas y mínimas, datos que se capturaron en el programa OriginPro 7.5 para obtener la grafica de eliminación por concentración y tiempo en horas (número de ordeño).

4.2-Los resultados de las concentraciones identificadas se analizaron para la identificación de los parámetros: vida media, coeficiente de eliminación y tiempo de retiro^{21, 22, 23}.

RESULTADOS

Para la identificación de la cinética de la eliminación de la amoxicilina y ácido clavulánico en leche de vacas con mastitis después del tratamiento intramamario, estos fármacos se extrajeron con alcohol metílico. Con esta extracción además de separar la amoxicilina se precipitaron las proteínas y se obtuvo un sobrenadante transparente el cual fue utilizado para el análisis de los fármacos.

Las concentraciones de amoxicilina y ácido clavulánico obtenidas por análisis con Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), se agruparon por tiempos de muestreo. En las figuras 1 y 2 se anotaron las concentraciones promedio de cada grupo de los 12 ordeños.

En el primer muestreo (12 horas de aplicado el tratamiento) se obtuvo en promedio 1048 μ g (\pm 1511) con un (mínimo y máximo de 44 a 1363 μ g) de amoxicilina por Kilo de leche estudiada, 2° a las 24 horas 638 μ g (\pm 488) (174 a 1702 μ g), 3° a las 36 horas 1166 μ g (\pm 1910) (7 a 4417 μ g), 4° a las 48 horas 341 μ g (\pm 315) (20.58 a 1145 μ g), 5 ° a las 60 horas 357 μ g (\pm 730) (10 a 1662 μ g), 6° a las 72 horas 369 μ g (\pm 420) (3 a 1231 μ g), 8 ° a las 84 horas 245 μ g (\pm 476) (0.91 a 1093 μ g) y 9° a las 96 horas 192 μ g (\pm 171) (1 a 631 μ g) (cuadro 1 y figura 1).

De los resultados obtenidos por medio de la fórmula de cinética de primer orden ($Cr=Ci n^{-at}$) donde Cr= Concentración residual, Ci= Concentración inicial n= logaritmo natura de a y, a=constante de eliminación multiplicado por t, donde t= tiempo en horas para obtener los resultados siguientes; coeficiente de eliminación

de 0.046 expresado en tiempo y concentración. Vida media de 15.06 horas y un tiempo de retiro de 132 horas, es decir 11 ordeños considerando dos ordeños diarios (5.5 días).

El procesamiento de las muestras para la obtención del Acido Clavulánico y su análisis por HPLC fue el mismo que el señalado para amoxicilina. Las concentraciones obtenidas por muestreo son señaladas en la figura 2, cuando se indica que a las 96 horas la concentración encontrada fue de 0.001 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Discusión

La tendencia de eliminación expresada en la curva de la figura 1, indica una eliminación sostenida con tendencia a la baja, es decir que en el primer muestreo se encontró 1048 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de amoxicilina en la muestra de leche, a las 96 horas 192 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y a las 132 horas 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en las leches muestreadas.

Para considerar que la cantidad máxima admisible de amoxicilina para consumo es de 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, a las 132 horas (5.5 días, 11 ordeños) esta leche contenía menos residuos que el permitido por los Codex Alimentarios y las normas sanitarias de la Unión Europea (4 μg amoxicilina/kg de leche y 200 μg ácido clavulánico/Kg de leche), y Estados Unidos de América (10 μg amoxicilina/kg de leche y 200 μg ácido clavulánico/Kg de leche).

La concentración máxima permitida de ácido clavulánico por la EMEA y FDA en leche es de 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, A las 96 horas las muestras de este estudio contenían 0.001 μg ácido clavulánico/Kg leche, lo que indicó que dicha leche podría ser consumida en este tiempo²⁴.

De 12 a 132 horas de seguimiento de los posibles residuos de amoxicilina, se obtuvo en las primeras 24 horas una disminución del antibiótico en leche con tendencia a la baja, que a las 132 horas los residuos del fármaco se encontraron dentro de los límites aceptables según la EMEA y la FDA.^{10,11}.

Estos resultados concuerdan con lo expresado por otros autores^{10, 24,25}.

No obstante la DSM señala que en vacas con cuadros leves de mastitis las muestras resultaron libres de residuos al tercer día después de la aplicación del último tratamiento, pero en casos severos de mastitis se requirieron 7 días o mayor tiempo²⁵.

Conclusiones

- 1) Las muestras de leche de vacas tratadas por presentar cuadros de mastitis clínicas con grados de severos a moderados, aplicando amoxicilina y ácido clavulánico, resultó que a las 132 horas (5.5 días) posteriores al último tratamiento, contenían 4 µg de amoxicilina por Kilo de leche y 0.001 µg de ácido clavulánico.
- 2) La cantidad del amoxicilina y el ácido clavulánico encontrados a las 132 horas (5.5 días) de aplicado el último tratamiento son similares a los indicados por la EMEA y la FDA, quienes los consideran como Límites Máximos Permisibles (LMR`s) para consumo humano.
- 3) Con base a los resultados se sugiere que la leche pueda ser considerada óptima para consumo hasta el sexto día después del último tratamiento.

Reflexiones

- 1) Con base en los resultados logrados en este trabajo, la leche de vacas tratadas contra mastitis clínica sería apta para consumo después del sexto día de la aplicación de amoxicilina y del ácido clavulánico y que la vaca se halla recuperado de la mastitis.

CUADROS Y FIGURAS

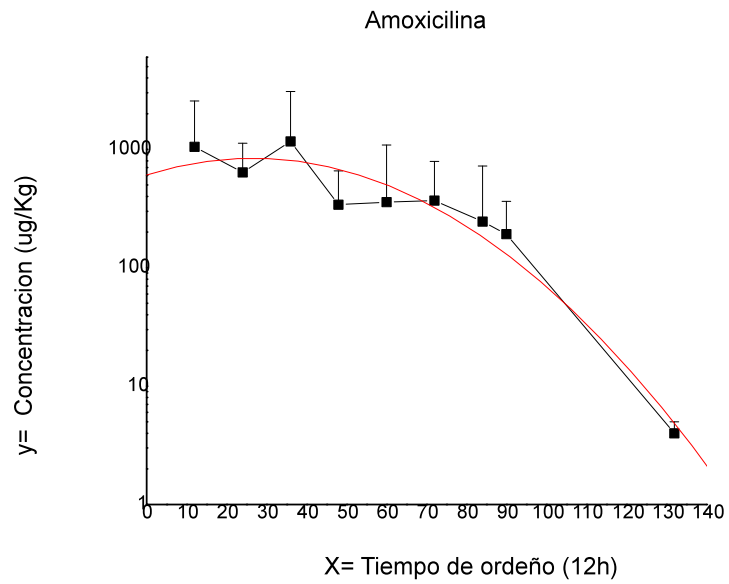


FIGURA 1.- Cinética de residuos postratamiento de amoxicilina en leche de vacas con mastitis, al aplicar 300mg/ glándula.

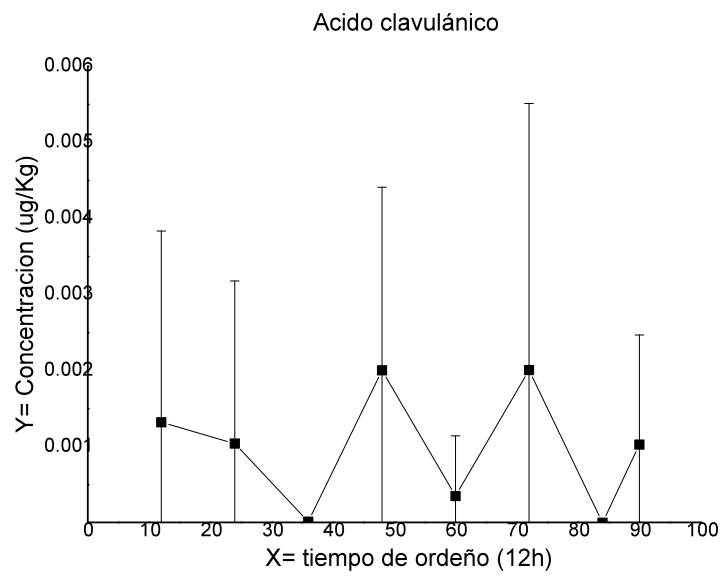


FIGURA 2.- Cinética de residuos postratamiento de Acido Clavulánico en leche de vacas con mastitis, al aplicar 60mg/ glándula.

Cuadro 1.

Valores ($\mu\text{g}/\text{kg}$) estadísticos descriptivos de residuos de amoxicilina en leche de vacas con mastitis analizados por HPLC.

Horas	Concentración promedio	Valor máximo	Valor mínimo	Desviación estándar
12	1048	1363	44	1511
24	638	1702	174	488
36	1166	4417	6.85	1910
48	341	1145	20.58	315
60	357	1662	10.20	730
72	369	1231	2.06	420
84	245	1093	0.91	476
96	192	631	1.03	171

Cuadro 2

Valores ($\mu\text{g}/\text{kg}$) estadísticos descriptivos de ácido clavulánico en leche de vacas con mastitis analizados por HPLC.

Tiempo (horas)	PROMEDIO($\mu\text{g}/\text{kg}$)	MAXIMO ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	MÍNIMO ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	DESVIACIÓN ESTANDAR($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
12	0.001454523	0.00766527	1.764E-06	0.00261009
24	0.001042054	0.0061872	2.633E-07	0.0021389
36	2.21897E-05	8.87587E-05	4.824E-07	4.1158E-05
48	0.002005401	0.006694933	3.921E-06	0.00240728
60	0.000590081	0.001766785	4.979E-07	0.00101906
72	0.002341728	0.008424871	5.51E-06	0.00371532
84	4.30278E-06	6.70449E-06	9.191E-07	2.7215E-06
96	0.001370621	0.004085002	4.95E-07	0.00152378

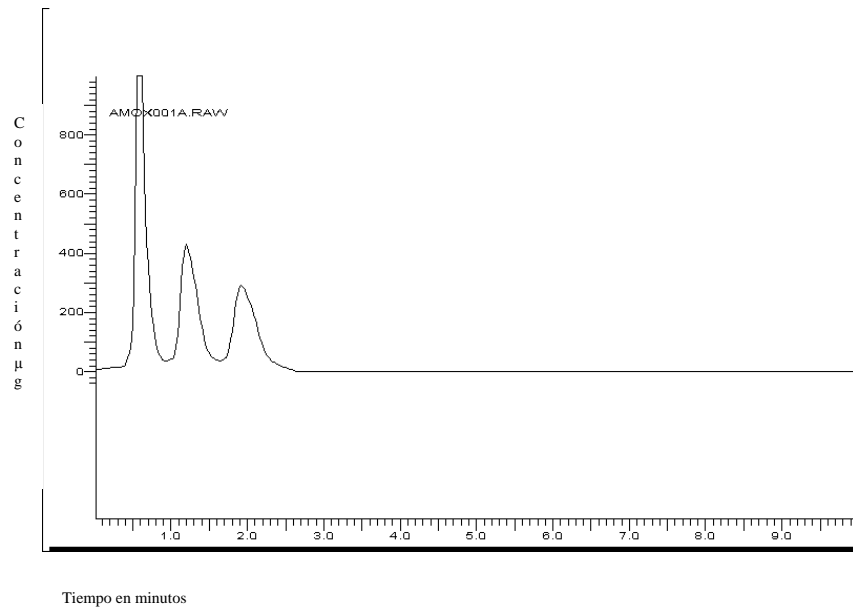


FIGURA 3.- Tiempo de retención (minutos) y altura (unidades de millar) de la señal del metanol (0.5 min, 1000), amoxicilina (1.2, 420) y ácido clavulánico 2.0 por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

REFERENCIAS

1. Figueroa M. L. G. Cuenta de células somáticas en leche de cabra mediante las pruebas diagnósticas, prueba de California, Wisconsin, cuenta microscópica y contador infrarrojo. (tesis de licenciatura). México D.F. FMVZ, UNAM, 2008.
2. Schalm WO; Carrol EJ and Jain NC. Bovine mastitis. Philadelphia: Lea & Febiger. 1971
3. Gray DM, Schalm OW. The mastitis variable in milk yield as estimated by the California mastitis test. Am. J. Vet. Res. 23:541. 1962
4. Errecalde O. J. Uso racional de los antimicrobianos en el tambo, Revista del Colegio de Veterinarios de la Prov. de Bs. As. 2007, 12(39): 48-59.
5. Suhren G. Influence of residues of antimicrobials in milk on commercially applied starter cultures-model trials. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 1996, 49: 131-149.
6. San Martin N. B. y col. Evaluación de los tiempos de resguardo en la leche de vacas en lactancia de dos antibióticos de larga acción: amoxicilina LA y Oxitetraciclina LA. Avances de Medicina Veterinaria, vol, 10, N°1, Enero- Junio, 1995.
7. Brady, M. S.; Katz, S. E. Antibiotic, antimicrobial residues in milk. J. Food Protect. 1988. 51: 8-11.
8. Allison, J. R. D. Antibiotic residues in milk. British Vet. J. 1985. 141: 9-16.
9. Berruga M. I. y col. Detection of antibiotic residues on cheese whey, Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal, Valencia, Spain.

10. The european Agency for Evaluation of Medicinal Products, *Veterinary Medicines Evaluation Unit (EMEAMRL/152/96-FINAL)*,1996.
11. Boggio. J. C. Problemática de antimicrobianos y residuos en leche. Cátedra de farmacología, Universidad Católica de Córdoba. Disponible en:
http://www.aprocal.com.ar/publicaciones_tecnicas/FarmacocineticayResiduos.htm
12. Willard, HH., *Instrumental Methods of Analysis*, Wadsworth, Inc., U.S.A., 1988. Handbooks of Amersham Pharmacia Biotech: *Ion Exchange Chromatography, Affinity Chromatography, Hydrophobic Interaction Chromatography, Reversed Phase Chromatography*, Sweden, 2002.
13. Botsoglou R. N. 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.
14. DickButterworths, London, 1976, 3-21.
15. Sumano L. H., Brumbaugh W. G., Mateos T. G. Bases farmacológicas del tratamiento de la mastitis bovina. (estudios recapitulativos). Revista Veterinaria México, 1996.
16. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kopen. 4^a ed. UNAM. México, D.F. Instituto de Geografía. 1989.
17. Ávila T. S. Producción intensiva de ganado lechero. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria. Edith. Continental. México. 1984.
18. Ávila T. S, Valdivieso N. G. Fisiopatología de la glándula mamaria y ordeño. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (libro en CD- ROM). Centro de Cómputo de la FMVZ. UNAM. FMVZ-UNAM; 2001.

19. Brown W. R, Morse I. G, Newbould S. H. F. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis. Nacional mastitis council, inc., Washington D.C. 1969.
20. Seyed Mohsen Foroutan *et al.* "Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by isocratic reversed-phase HPLC using UV detection". ScienceDirect. 2007.
21. Dario R. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. Red Latinoamericana de Química, 1996. Disponible en: <http://www.relaq.mx/RLQ/tutorials/cromatografia/hplc.html>.
22. 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.
23. García M.J., Calemt F. J. Métodos cromatográficos. Segunda edición. Barcelona: Toray Masson, 1975, 34-58.
24. Cerrutti, R. D, y col. Utilización de un método de inhibición microbiológica para la determinación del tiempo de retirada de amoxicilina en leche. Revista FAVE- Ciencias Veterinarias 1 (2) 2002.
25. DSM, texto consolidado producido por la empresa DSM Delvotest. Productos. Detección de fármacos en leche. Disponible en: http://www.dsm.com/le/nl_NL/delvotest/html/home.htm
26. TEXTO consolidado producido por el sistema CONSLEG de la Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas. CONSLEG:1990R2377-16/08/203