

Nº 128
365



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**EFFECTO DE LA EBULLICION SOBRE LA PERSISTENCIA
DE RESIDUOS DE CLORANFENICOL EN LECHE
DE VACA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

**MEDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

JORGE LARA ESPINOSA

ASESORES : **M.V.Z. HECTOR SUMANO LOPEZ
Q.F.B. JOSEFA VARGAS RIVERA**

MEXICO, D. F.

1992



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	11
DISCUSION	12
LITERATURA CITADA	21

RESUMEN

LARA ESPINOSA JORGE. Efecto de la ebullición sobre la persistencia de residuos de cloranfenicol en leche de vaca; bajo la dirección de Héctor Sumano López y Josefa Vargas Rivera.

La hipótesis de este trabajo se basó en los datos publicados por Epstein *et al* (4) quienes mencionan que los residuos de cloranfenicol se pueden disminuir en carne, por medio del procesado para embutidos y enlatados, como consecuencia de la temperatura de 122° C a la que se someten. Se realizó el ensayo utilizando 20 vacas en producción las cuales se dividieron en 4 grupos de 5 animales cada uno. A los grupos "A" y "B" se les aplicó una dosis de 30 mg/kg de cloranfenicol por vía intramuscular cada 8 horas durante 3 días y a los grupos "C" y "D" se les aplicó una dosis de 50 mg/kg cada 8 horas durante 6 días. Se determinó la concentración de cloranfenicol en 200 muestras, los 5 días siguientes a la última aplicación. Además se trabajaron 30 muestras lacteas libres de fármacos, las cuales se dividieron en 5 grupos de 6 muestras. De estas últimas la cantidad de muestra que se tomó para cada procedimiento fue de 1.96 ml y se le adicionó a cada una 0.04 ml de solución de cloranfenicol. La cantidad que se utilizó de cada una de las 200 muestras para el experimento fue de 2 ml. Cada grupo de las

diferentes muestras se sometió a ebullición a distintos tiempos iniciando con 5, 10, 15, 20 y 30 minutos. La recuperación y medición de los niveles de cloranfenicol se llevaron a cabo después de la ebullición mediante el método espectrofotométrico basado en el acoplamiento de la isoniazida con el grupo nitrobenzeno de la molécula del cloranfenicol. La recuperación de cloranfenicol en todas las muestras de leche fue cercana al 98% por lo que se rechaza la hipótesis del trabajo.

INTRODUCCION

En México se contaba con diferentes presentaciones comerciales que contenían cloranfenicol, las cuales se utilizaban para el tratamiento de infecciones causadas por diferentes agentes, como: Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Shigella paradysenteriae, Pseudomonas aeruginosa, especies de Brucella, Aerobacter aerogenes, Pasteurella tularensis, Escherichia coli, Proteus vulgaris, especies de Salmonella, Bacillus anthracis, Corynebacterium pyogenes, Erysipelothrix rhusiopathiae, Klebsiella pneumoniae, especies de Haemophilus, especies de Bordetella, Clamidas, Rickettsias y Dermatophilus (7, 14, 19). A menudo, este tratamiento se aplicaba en animales que se encontraban en la línea de producción con las consecuentes pérdidas económicas si se observaban períodos rigurosos de retiro de la ordeña que fluctúan de 7 días por vía parenteral hasta 30 días por vía intramamaria (8, 12, 16, 20).

Se debe considerar que hoy día existe un deceso importante de leche, principalmente porque los animales fueron tratados con medicamentos. El destino de esta leche es por ley su eliminación, con el consecuente deterioro de las ganancias para el ganadero, en una industria lechera cada día inserta en una crisis mayor.

Por otro lado, existe una creciente preocupación por el

impacto que puede tener en la salud pública la presencia de residuos de antibióticos y quimioterapéuticos en la leche (10, 19). Un caso particular que merece especial referencia es el del cloranfenicol, ya que su persistencia en este producto puede favorecer la resistencia bacteriana en los humanos a patógenos peligrosos como es el caso de la Salmonella spp (15). Pero además, se sabe que este antibiótico es capaz de inducir anemia aplásica en individuos susceptibles con proporciones mínimas de únicamente 1 ppm (1). Más aún, para comprender la toxicidad del cloranfenicol baste mencionar que la anemia aplásica ha sido reportada en pacientes tratados únicamente con preparaciones oftálmicas (2). Por lo tanto, la presencia de este antibiótico en leche resulta potencialmente letal para algunos consumidores, de ahí que en muchos países no se permita el uso de cloranfenicol en animales cuyos productos pudieran ser utilizados para el consumo humano y no se admite la existencia de residuo alguno (5).

La molécula del cloranfenicol es relativamente simple, es por esta razón que desde sus inicios se obtiene sintéticamente y no por extracción del Streptomyces venezuelae como en un principio se lograba (19). El cloranfenicol había gozado de extraordinaria popularidad en la medicina veterinaria hasta días recientes, ya que se utilizaba para el tratamiento de

enfermedades digestivas, respiratorias, mastitis y prevención de infecciones secundarias durante procesos virales (7, 13, 15, 17, 20).

El cloranfenicol actúa inhibiendo la síntesis proteica teniendo su efecto sobre los ribosomas (6, 9). Este fármaco es altamente liposoluble por lo que difunde a casi todo el organismo del animal (9, 17, 18). En el mercado mexicano se encontraban disponibles sales como la palmitato (insípida) para aplicación oral, la succinato para su aplicación parenteral, una de cloranfenicol base, también para vía oral con cubierta entérica y otra para aplicación intramamaria.

En la mayoría de las especies, el cloranfenicol se absorbe por el tubo gastrointestinal con una eficiencia cercana al 100%. En los rumiantes, el cloranfenicol se destruye en gran proporción en el rumen (3, 9, 17, 18) y la administración de 50 a 100 mg/kg por vía oral en los becerros no resulta suficiente para lograr niveles sericos mayores de 3.5 a 4 $\mu\text{g/ml}$ (17). Este aspecto era de vital importancia para el tratamiento de los animales, si se considera que la concentración mínima terapéutica es de 5 $\mu\text{g/ml}$ (9, 17). Por lo tanto, el cloranfenicol se aplica en becerros por vía parenteral, lo que necesariamente implica la persistencia de residuos.

El cloranfenicol tiende a acumularse en los tejidos y el

periodo mínimo de retiro de la ordeña ó para ser enviado a rastro el animal que fue tratado con dicho fármaco es de 7 a 30 días; aunque en fechas pasadas y contrario al criterio actual se ha dicho que en tres o cuatro días los niveles de cloranfenicol en leche pueden llegar a ser mínimos y no peligrosos (9).

Se reconoce que el cloranfenicol alcanza concentraciones similares a las del plasma en la glándula mamaria infectada cuando se administra a razón de 50 mg/kg (13), lo que se considera de beneficio para el tratamiento sistémico de las mastitis. El cloranfenicol muestra una toxicidad mínima y contrario a la creencia popular, no produce anemia aplásica en los animales domésticos (9, 11, 18). No obstante uno de los inconvenientes del uso del cloranfenicol radicaba en que debido a su amplio espectro, podía presentarse como efecto colateral la generación de superinfecciones causadas por hongos (18).

En lo que se refiere a residuos y contrario a lo establecido en la United States Pharmacopoea (U.S.P.), Epstein *et al* (4) postulan que la molécula de cloranfenicol se destruye a 122°C durante el procesado de alimentos para embutidos y enlatados. Es por esta razón que resulta congruente pensar que si lo propuesto por Epstein *et al* (4) puede aplicarse a la ebullición que de manera tradicional se somete a la leche en México, se le puede

brindar otro uso a dicho producto.

Las ventajas de un estudio de estas características quizá no tenga una aplicación industrial inmediata, pero de obtenerse resultados positivos, estos pueden ayudar a que se vea incrementado el consumo per capita de leche en nuestro país, incidiendo todo esto de manera favorable en la economía de los productores de leche, incluyendo a los que lo hacen para consumo propio.

Así pues, de acuerdo con lo propuesto por Epstein et al (4), con respecto a que los residuos de cloranfenicol pueden ser reducidos ó incluso eliminados mediante calentamiento a 122°C, se consideró de utilidad calentar muestras de leche libres de fármacos a las cuales se les agregó cloranfenicol, para evaluar la posible disminución ó desaparición de los niveles agregados, así como evaluar el mismo procedimiento en leches de bovinos tratados con el antibiótico. Este último punto se realizó para apegarse más a las condiciones experimentales sugeridas por Epstein et al (4).

HIPOTESIS.

La ebullición de la leche con residuos de cloranfenicol a una temperatura de 122°C durante 20 minutos provoca la disminución ó total degradación de los residuos de cloranfenicol.

OBJETIVO

Evaluar si la ebullición de la leche con residuos de cloranfenicol a una temperatura de 122°C durante 20 minutos provoca la disminución ó total degradación de los residuos de cloranfenicol, mediante el método espectrofotométrico basado en el acoplamiento de la isoniazida con el grupo nitrobenzeno del cloranfenicol.

MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron 230 muestras de leche, de las cuales 200 se obtuvieron de vacas que fueron tratadas con cloranfenicol y las 30 restantes de vacas que no fueron tratadas con ningún antibiótico, a estas últimas se les agregó una solución de cloranfenicol que contenía 3 $\mu\text{g/ml}$, se dividieron las muestras en 5 grupos de 6 réplicas cada uno. Las 200 muestras se dividieron en 5 grupos de 40. Cada muestra fue de 1.96 ml y se les adicionó 0.04 ml de la solución de cloranfenicol antes mencionada. Cada grupo de muestras se sometió a diferente tiempo de ebullición al de los demás. Los tiempos de ebullición fueron de 5, 10, 15, 20 y 30 minutos respectivamente. En forma adicional se metieron 10 muestras con sus respectivos estándares al autoclave y fueron sometidas a 125°C durante 90 minutos y a 20 libras de presión/cm.

El método de cuantificación del cloranfenicol fue implementado conforme a lo descrito por O'Gorman y Diamond (14). Los agentes que se requirieron se mencionan en la lista que a continuación se muestra:

Reactivos.

1. Acetato de isoamilo (ó acetato de amilo).
2. Hidrazida del ácido nicotínico solución al 3% (isoniazida).

3. Hidroxido de sodio al 1.5 N ó 6%.
4. Buffer de fosfatos pH 7 preparado disolviendo
 - 7.61 g de $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 2.21 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$en un litro de agua destilada ajustando el pH
5. Solución Stek. Agua destilada 1 mg/ml.

Procedimiento:

Se añadieron 2 ml de solución buffer de fosfato a todos los tubos problema con 1.96 ml de leche, se depositó agua destilada como reactivo blanco en otro tubo se pipeteó acetato de isoamilo 6 ml a cada tubo después de lo cual todos los tubos fueron tapados y agitados durante 10 segundos. A cada tubo conteniendo 4 ml de sobrenadante-solvente se añadió 2 ml de hidrazida de ácido isonicotínico al 3%.

Posteriormente los tubos fueron tapados e incubados en baño María a 30°C durante 45 minutos, los tubos se agitaron perfectamente a intervalos de 5 minutos para asegurar que la mezcla fuera homogénea. Al final del período de incubación la capa de color amarillo se aspiró y se midió en un espectrofotómetro a 430 nanómetros contra el agente blanco ó el reactivo blanco. El procedimiento puede ser modificado mediante el uso de cantidades dobles de todas las soluciones para obtener ó manejar volúmenes más grandes.

RESULTADOS.

Las determinaciones que se realizaron a las 200 muestras provenientes de vacas tratadas con cloranfenicol, así como a las 30 muestras con niveles agregados, después de la ebullición se muestran en los cuadros 1 y 2.

A las 200 muestras se les determino el promedio de residuos de cloranfenicol que contenían, posteriormente se sometieron a ebullición, a diferentes tiempos a cada uno de los 5 grupos para en seguida nuevamente determinar la cantidad de residuos que contenían. Resultando que la recuperación ó persistencia de residuos fue cercana al 100% en todos y cada uno de los casos.

En el grupo de 30 muestras, al cual se le agregaron niveles de cloranfenicol la recuperación fue del 94%.

Las temperaturas promedio que se registraron a lo largo de las ebulliciones se presentan en el cuadro 3, incluyendo los valores obtenidos en la autoclave.

En la figura 1 y cuadro 4 se presenta la validación de la técnica con la curva de recuperación correspondiente.

DISCUSION.

El método utilizado se basa en la extracción de los componentes grasos de la leche, utilizando acetato de isoamilo y haciendo reaccionar la porción nitrobencénica de la molécula de cloranfenicol con la isoniazida (14). Este método resulta suficientemente lineal entre los límites de 1 a 50 µg/ml, rango en el cual se incluyeron todas las determinaciones de este ensayo. En las pruebas realizadas no se presentó disminución de la transmitancia y por lo tanto se concluye que el método tiene una elevada especificidad por el grupo nitrobenzeno del cloranfenicol y es altamente reproducible.

En informes anteriores, Epstein *et al.* (4) encontraron que el procesado de muestras para enlatado y embutido disminuían hasta en un 50% la cantidad de cloranfenicol existente en las muestras. Esta destrucción se lleva a cabo aparentemente a 122°C, temperatura que no se logró alcanzar en ninguno de los tiempos de ebullición, la temperatura más alta alcanzada fue de 95°C. Desde este punto de vista se puede decir que el proceso de ebullición de la leche no destruye en lo absoluto los residuos de cloranfenicol y se pone de manifiesto que por medio de este ensayo no se pueden validar los datos especificados por Epstein *et al.* (2).

Por otro lado, los resultados que se obtuvieron de las muestras que se introdujeron al autoclave, si se deben considerar como homólogos del proceso al que Epstein *et al* (2). No obstante los datos obtenidos demuestran que no le sucede nada a los residuos de cloranfenicol en leche que fueron sometidos a 125°C durante 90 minutos a 20 libras de presión por cm^2 , y la curva de recuperación que se obtuvo en el espectrofotometro se muestra en la figura 2. Considerando dichos resultados, se deben tomar con extrema precaución los datos especificados por Epstein *et al* (2).

Hasta hace poco tiempo se decía que el cloranfenicol no debía ser utilizado en la medicina veterinaria en México dado que la persistencia de residuos podía inducir la generación de cepas resistentes tanto para el hombre como para los animales. No obstante, de manera más importante se puede mencionar que el cloranfenicol en proporciones de 1 ppm es capaz de inducir anemia aplástica en individuos susceptibles (1). Más aún se ha visto que el cloranfenicol puede inducir anemia aplástica aun con la administración oftálmica de preparados para ese propósito. De lo anterior se desprende la necesidad de llevar a cabo un control más estricto del uso de este antibiótico para la clínica de bovinos productores de leche. Hoy en día se supone que esto ya no representa un problema, ya que a partir de 1990

el uso del cloranfenicol quedo prohibido dentro de la rama veterinaria, no obstante que en el mes de julio de 1992 aún se recibió en algunos estados una comunicación a farmacias en la que se prohíbe la venta de cloranfenicol en cualquier presentación. Quizá esta decisión fue tomada con base a las restricciones que para el mismo antibiótico se tomaron en el resto del mundo. Sin embargo, aún resta saber si se ha seguido estrictamente esta prohibición, sobretodo si se toma en cuenta que es poco ó nulo el control sobre fármacos importados.

En el diario oficial de 1988 se especifica que la leche y otros productos de origen animal no deben contener residuos de farmacos y otros químicos*. Esto resulta teóricamente deseable pero es prácticamente inoperante ya que no existe un organismo oficial instrumentado para hacer efectiva esta prohibición.

* Diario Oficial de la Federación (Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos). Tomo CDXII, No 11, México D.F. lunes 18 de enero de 1988. primera sección índice, Poder Ejecutivo, Secretaría de Salud, Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Pp Primera Sección 29

Cuadro 1 Datos obtenidos de la determinación de cloranfenicol en leche de vacas tratadas con dicho fármaco.

Grupo	Día de muestreo	Nivel x de cloranfenicol previo a ebullición	Tiempo de ebullición	Nivel x de cloranfenicol postebullición
1	1	15 µg/ml	5 minutos	15 µg/ml
2	2	10 µg/ml	10 minutos	10 µg/ml
3	3	7 µg/ml	15 minutos	7 µg/ml
4	4	2 µg/ml	20 minutos	2 µg/ml
5	5	3 µg/ml	30 minutos	3 µg/ml

Cuadro 3 Temperaturas registradas a lo largo del proceso de ebullición y en la autoclave.

Minutos	Temperatura promedio de ebullición en °C	Presión Lbs/cm ²
Del 1 al 9	94	
Del 10 al 30	95	
90	130	20

Cuadro 4 Valoración de la técnica para la determinación de cloranfenicol

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	4	2	-	6	*	2	2	2	**	-	0
1	4	1.985	0.005	6	*	2	2	2	**	0.021	5 µg
2	4	1.98	0.02	6	*	2	2	2	**	0.027	10 µg
3	4	1.96	0.04	6	*	2	2	2	**	0.058	20 µg
4	4	1.94	0.06	6	*	2	2	2	**	0.091	30 µg
5	4	1.92	0.08	6	*	2	2	2	**	0.118	40 µg
MLB	4	-	-	6	*	2	2	2	**	0	-
ML1	4	1.94	0.06	6	*	2	2	2	**	0.050	17 µg
ML2	4	1.94	0.06	6	*	2	2	2	**	0.048	16 µg

1. Buffer de fosfato pH en ml.
2. Agua destilada en ml.
3. Solución Stok de cloranfenicol µg/ml
4. Acetato de amilo en ml.
5. * Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se recupera y agitar 10 minutos.
6. Sobrenadante en ml.
7. Solución de NaOH al 1.5 N en ml.
8. Solución de isoniazida al 3% en ml.
9. ** Incubar a 30°C por 45 minutos
10. Absorbancia 430 nm.
11. Concentración de cloranfenicol por ml de muestra.

B= Reactivo blanco

MLB= Muestra lactea blanco

ML1= Muestra lactea

ML2= Muestra lactea duplicado

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura 1 Curva de estandares de cloranfenicol recuperados de acuerdo con lo descrito por O'Gorman y Diamond (14).

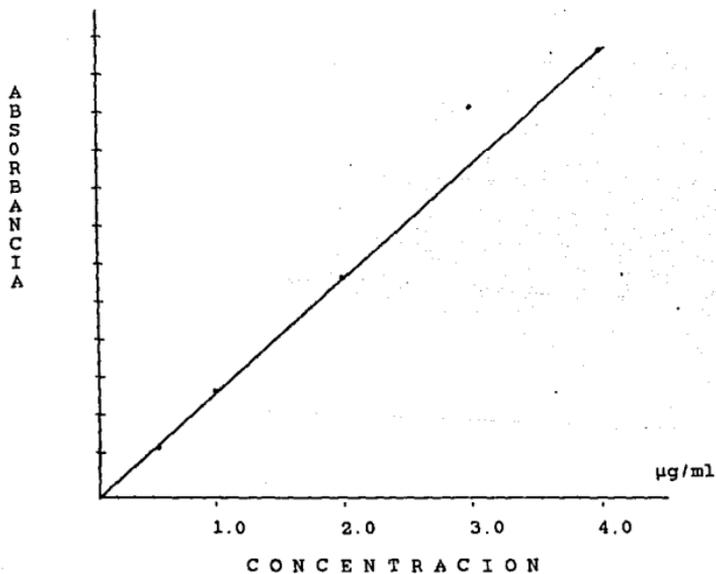
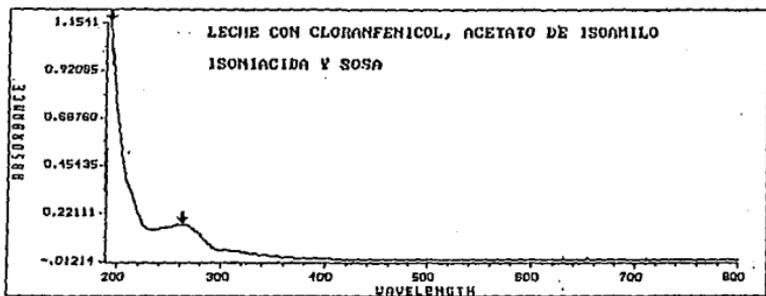


Figura 2 Determinación de cloranfenicol en leche con niveles agregados de cloranfenicol que fue sometida al autoclave.



NOTA: La flecha indica la presencia de cloranfenicol.

LITERATURA CITADA.

- 1.- Abrams, S.M., Degnan, T.J. and Vinciguerra, V. 1980 Marrow aplasia following topical application of chloramphenicol eye ointment. Arch. Int. Med. 140: 576 - 578.
- 2.- Allison, J.R.D. 1985. Antibiotics residues in milk. Br. vet. J. 141: 9 - 16.
- 3.- Clark, C.H. : Chloramphenicol dogase. Med. vet. pract., 59: 749 - 754 (1978).
- 4.- Epstein, R.L., Randecker, V., Corrao, P., Keeton, J.T. and Cross, H.R. : Influence of heat and Cure Preservatives on Residues of Sulfamethazine, Chloramphenicol and Cyromazine in Muscle Tissue. J. Agric. Food Chem., 36: 1009 - 1012 (1988).
- 5.- Gracey, J.E. : Higiene de la carne. 8a edición, Interamericana-Mc Gray Hill, México D.F., 1989.
- 6.- Huber, W.G. : Aminoglycosides, Marolides, Lincimycin, Polimyxins, Chloramphenicol and other antimicrobial agents. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 5th ed. Edited by

Booth, N.H., Macdonald, L.E. 748 - 771. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1982.

7.- Joight, A.P. : Chloramphenicol Therapy in Large Animals, J. Am. Med. Assoc., 178 : 309 - 310 (1981).

8.- Jones, L.M. : Farmacologia y terapeutica veterinarias. UTEHA, México D.F., 1982.

9.- Knight, P. : Chloramphenicol therapy in large animals. J. Am. vet. med. Ass. 178 : 309 - 313 (1981).

10.- Larcey, R.W. : Does the Use of Chloramphenicol in Animals Jeopardise the Treatment of Human Infections. Vet. Rec., 114:6-8.

11.- Mercer, H.D., Geleta, J.N., Baldwin, R.A. and Shimoda, W. : View point and current concepts regarding accepted and tried products for control of bovine mastitis. J. Am. vet. med. Ass., 69 : 1104 - 1113 (1976).

12.- Nouws, J.F.M., Vree, T.B., Holtkamp, J., Baakman, M., Driessens, F. and Guelen, P.J.M. : Pharmacokinetics Residue and Irritation Aspects of Chloramphenicol Sodium Succinate and

Chloramphenicol Base Formulation, Following Intramuscular Administration to Ruminants. Vet. Q., 8 : 224 - 232 (1986).

13.- Nouws, J.F.M. and Ziv, G. : Pharmacological aspects of chloramphenicol administration by the intramammary route to lactating dairy cows. Vet. Q., 4 : 23 - 31 (1982).

14.- O'Gorman, D.W.H. and Diamond, L.K. : Chloramphenicol in Blood : Simple Chemical Estimations in Patients Receiving Multiple Antibiotics. Sci., 144 : 296 - 297 (1964).

15.- Punch, P.I., Costa, N.D., Chambers, E.D., Slatter, D.H. and Wilcox, G.E. : Plasma and tear concentrations of antibiotics administered parenterally to cattle. Res. vet. Sci., 39 : 179 - 187 (1985).

16.- Rosenstein, E. : Prontuario de especialidades veterinarias. 12a edición, P.L.M., México D.F., 1990.

17.- Sisodia, C.S. : Pharmacotherapeutics of chloramphenicol in veterinary medicine. J. Am. vet. med. Ass., 176 : 1069 - 1071 (1980).

18.- Sisodia, C.S., Dunlop, R.H., Gupta, V.S. and Taksas, L. : A pharmacological study of chloramphenicol in cattle. Am. J. vet. Res., 34 : 1147 - 1150 (1973).

19.- Sumano, L.H. y Ocampo, C.L. : Farmacología veterinaria, Mc Graw Hill, México D.F., 1990.

20.- Tanner, V. and Wuethrich, A. : Pharmacokinetics of Chloramphenicol in Cows After Intramuscular Application, Vet. Res. Commun., 9 : 25 - 34 (1985).