

00344

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
in vitro DE LA CEFQUINOLONA (CQMEPCA 406
(s) L) COMPARANDOLA CON ENROFLOXACINA Y
TIANFENICOL CONTRA *Vibrio alginolyticus* ASI
COMO LA DETERMINACION DE RESIDUOS DE LA
(CQMEPCA 406 (s) L) EN TILAPIA *Oreochromis sp.*
POR MEDIO DEL HPLC.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

MARIBEL GARCIA RAMOS

Biología de sistemas y Recursos Acuáticos

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. LUIS OCAMPO CAMBEROS

COMITE TUTORIAL

M. en C. LUIS OCAMPO CAMBEROS

M. en C. Ma. DEL PILAR TORRES GARCIA

M. en C. JORGE MANUEL ROMERO JARERO

CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F.

2000



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.

AGRADECIMIENTOS

Al comité tutorial por sus consejos y su apoyo, M. en C. Luis Ocampo Camberos, M. en C. Ma del Pilar Torres Garcia y M. en C. Jorge Manuel Romero Jarero

Al comité revisor por sus comentarios y sugerencias; Dr. José Luis Arredondo Figueroa, Dr. Miroslav Macek, Dr. Héctor Sumano López y Dr. Pedro Ramírez García.

A la Química Lina Laura Nava Muñoz, por su ayuda, orientación y consejos respecto a la cromatografía líquida y sobre todo por tu amistad

A mi director de tesis M. en C. Luis Ocampo Camberos por apoyarme siempre y por contribuir a la mejora de este trabajo

A la M.V.Z. Ana Auró de Ocampo por apoyarme e impulsarme cuando más lo necesitaba.

Al Químico Leonardo Ortiz por los consejos y apoyo para llevar a cabo la fase *in vitro* de este trabajo.

A las Biólogas, Ana y Vanny por soportarme todo este tiempo, las quiero mucho

A los laboratorios Aranda, por todo su apoyo para realizar la fase de residuos en sus instalaciones y por todas las facilidades que me otorgaron.

DEDICATORIAS

Con mucho amor a mi esposo Othón Zozoaga Velázquez, por estar siempre conmigo, por sus consejos, por que aprendí de él que este instante que es la vida es para triunfar y siempre ser mejor.

A mi papi José García Lemus por que siempre lo he admirado por el esfuerzo que a hecho por sacarme adelante, por ser siempre mi ejemplo a seguir y por ser mi papá Lo amo

A mi mami Teresa Ramos Torres por ser la heroína de mi vida, por estar siempre conmigo, y porque con su entereza me a sabido guiar, y lo más importante porque siempre han estado los dos conmigo cuando los necesito, ¡ah! y por ser mi mami. La amo

A mis sobrinos Sady, Angel, Uris, Yanis y Zaira, por ser muy especiales para mi.

Con mucho cariño a mis hermanos Efren, Javier y Eli, por ser mis amigos y por todos los momentos bonitos y no tan bonitos que hemos compartido.

A todos los organismos que dan su vida por el progreso de la ciencia

CONTENIDO

	Pags
Resumen	1
Introducción	3
Objetivos	8
<i>in vivo</i> y farmacocinética (residuos)	
Generales	
Particulares	
Hipótesis	8
Antecedentes	10
Fase <i>in vitro</i>	10
Fase <i>in vivo</i>	13
Farmacocinética (residuos)	14
CQMEPCA	20
Antecedentes del desarrollo de un antibacteriano	
Estructura química	
Estabilidad	
Mecanismo de acción	
Potencia y espectro microbiológico de la CQMEPCA	
Toxicidad aguda	
Eficiencia clínica	
Farmacocinética	
Perspectivas de trabajo	
Cromatografía	
Material y método	31
Fase <i>in vitro</i>	
Farmacocinética (residuos)	
Obtención de organismos	

Fase analítica	
Equipo de cromatografía	
Procedimiento	
Estándar	
HPLC	
Espectrofotómetro	
Muestra de órganos	
Para la absorbancia	
Filtrado libre de proteínas	
Proteínas plasmáticas	
Resultados	40
Fase <i>in vitro</i>	40
Farmacocinética (residuos)	47
Obtención del peso de los órganos	
Análisis del estándar de la CQMEPCA	
Determinación de la CQMEPCA por absorbancia (U.V. visible) en el pool de órganos de peces en estudio hígado, bazo y riñón	
Análisis	55
Consideraciones	62
Bibliografía citada	64
Anexo	72

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Títulos	Paginas.
1	Núcleo básico de las quinolonas	23
2	Estructura básica de las fluoroquinolonas	23
3	Estructura molecular de la CQMEPCA	23
4	Cefalosporina C	24
5	Compuesto denominado 7(ACA) (ácido 7-amino cefalosporánico)	24
6	Interacciones existentes entre los medicamentos enrofloxacin y cefaquinolona) en relación a la presencia de <i>Vibrio alginolyticus</i>	42
7	Promedio de los halos de inhibición de enrofloxacin y cefaquinolona en presencia de <i>Vibrio alginolyticus</i>	44
8	Diferencia de promedios de halos de inhibición entre tratamientos, a distintas diluciones en presencia de <i>Vibrio alginolyticus</i>	46
9	Absorbancia de los estándares de enrofloxacin, 7-ACA y CQMEPCA (cefaquinolona)	73
10	Cromatograma del estándar de CQMEPCA	75
11	Cromatograma del estándar de uno de los precursores de CQMEPCA, la enrofloxacin	76
12	Cromatograma del estándar de uno de los precursores de CQMEPCA, la 7- ACA	77
13	Absorbancia de las muestras de hígado a una concentración de 5 mg/kg, mostrando el filtrado libre de proteínas	78
14	Absorbancia de las muestras de hígado de peces expuestos a la molécula de CQMEPCA a una dosis de 5 mg/kg a diferentes tiempos de medicación	81
15	Absorbancia de las muestras de bazo de peces expuestos a la molécula de CQMEPCA a una dosis de 5 mg/kg a diferentes tiempos de medicación	85
16	Absorbancia de las muestras de riñón de peces expuestos a la molécula de CQMEPCA a una dosis de 5 mg/kg a diferentes tiempos de medicación	89

17	Absorbancia de las muestras de hígado de peces expuestos a la molécula de CQMEPCA a una dosis de 10 mg/kg a diferentes tiempos de medicación	92
18	Absorbancia de las muestras de bazo de peces expuestos a la molécula de CQMEPCA a una dosis de 10 mg/kg a diferentes tiempos de medicación	96
19	Absorbancia de las muestras de riñón de peces expuestos a la molécula de CQMEPCA a una dosis de 10 mg/kg a diferentes tiempos de medicación	100
20	Cromatograma de las muestras de hígado de peces los cuales estuvieron expuestos a una dosis de 5 mg/kg de CQMEPCA a diferentes tiempos, mostrando la primera lectura de siete realizadas	103
21	Cromatograma de las muestras de bazo de peces los cuales estuvieron expuestos a una dosis de 5 mg/kg de CQMEPCA a diferentes tiempos, mostrando la primera lectura de siete realizadas	104
22	Cromatograma de las muestras de riñón de peces los cuales estuvieron expuestos a una dosis de 5 mg/kg de CQMEPCA a diferentes tiempos, mostrando la primera lectura de siete realizadas	105
23	Cromatograma de las muestras de hígado de peces los cuales estuvieron expuestos a una dosis de 10 mg/kg de CQMEPCA a diferentes tiempos, mostrando la primera lectura de siete realizadas	106
24	Cromatograma de las muestras de bazo de peces los cuales estuvieron expuestos a una dosis de 10 mg/kg de CQMEPCA a diferentes tiempos, mostrando la primera lectura de siete realizadas	107
25	Cromatograma de las muestras de riñón de peces los cuales estuvieron expuestos a una dosis de 10 mg/kg de CQMEPCA a diferentes tiempos, mostrando la primera lectura de siete realizadas	108

LISTA DE TABLAS

Tablas	Títulos	Paginas
1	Respuesta de la eficacia de Enrofloxacin y Cefaquinolona (CQMEPCA) Contra <i>V. alginolyticus</i> en cinco diferentes diluciones	40
2	Resultados de la inhibición de Enrofloxacin y Cefaquinolona (CQMEPCA) contra <i>Vibrio alginolyticus</i> en cinco diferentes diluciones	41
3	Muestra las diferencias entre los halos de inhibición de enrofloxacin y Cefaquinolona (CQMEPCA)	45
4	Peso de los órganos del primer grupo de 35 peces tilapia <i>Oreocromis</i> sp después de la inyección de CQMEPCA	47
5	Peso de los órganos del segundo grupo de 35 peces tilapia <i>Oreocromis</i> sp después de la inyección de CQMEPCA	47
6	Muestra la absorbancia (U.V. visible) y HPLC detectada en órganos de peces hígado, bazo y riñón al ser expuestos a la CQMEPCA a una dosis de 5 mg/kg, a diferentes tiempos	49
7	Muestra la absorbancia (U.V. visible) y HPLC detectada en órganos de peces hígado, bazo y riñón al ser expuestos a la CQMEPCA a una dosis de 10 mg/kg, a diferentes tiempos	49
8	Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de los dos precursores en hígado de peces a una dosificación de 5 mg/kg, en U.V. visible y HPLC	50
9	Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de los dos precursores en bazo de peces a una dosificación de 5 mg/kg, en U.V. visible y HPLC	51
10	Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de los dos precursores en riñón de peces a una dosificación de 5 mg/kg, en U.V. visible y HPLC	52
11	Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de los dos precursores en hígado de peces a una dosificación de 10 mg/kg, en U.V. visible y HPLC	52
12	Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de los dos precursores en bazo de peces a una dosificación de 10 mg/kg, en U.V. visible y HPLC	53

- 13 Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de los dos precursores en riñón de peces a una dosificación de 10 mg/kg, en U V visible y HPLC

RESUMEN

Las enfermedades bacterianas en los peces están asociadas a causas externas y son importantes por considerables pérdidas que ocasionan en la producción de la población. Las enfermedades son causadas principalmente por *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio salmonicida* y *Vibrio alginolyticus*. Debido a la presencia de un alto número de bacterias en el medio acuático se ha recurrido a agentes antibacteriales, las fluoroquinolonas en general la enrofloxacin son uno de los medicamentos más utilizados en acuicultura las cuales actúan en la bacteria modificando la estructura de la enzima de girasa-ADN topoisomerasa que es el blanco del mecanismo de acción de estos antibióticos.

La unión de la enrofloxacin con una cefalosporina forman un complejo denominado CQMEPCA (cefaquinolona o CQ), el cual es de amplio espectro, por lo que es importante conocer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (es el valor potencial de un antimicrobiano para evitar el crecimiento de alguna bacteria) de la enrofloxacin, CMI de cefaquinolona (CQMEPCA) y la CMI del tianfenicol (antibiótico en estudio para entrar al rubro de utilidad en acuicultura) en presencia de *Vibrio alginolyticus*. El objetivo de este trabajo es determinar la actividad *in vitro* de la CQMEPCA, enrofloxacin y tianfenicol en presencia de vibrio. Los resultados de este análisis cuando la CQMEPCA se encontraba en una dilución de 0.13 mg ml^{-1} presentaba un CMI de $2.4 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ y la enrofloxacin ya no presentaba CMI a la misma dilución. En estudios reciente la CQMEPCA presenta mayor efectividad que la enrofloxacin *in vivo* que *in vitro*. Para el tianfenicol resultó que la bacteria presenta resistencia a este, no obteniéndose halos de inhibición en presencia de vibrio.

La terapia de las enfermedades bacterianas en acuicultura es complicada, debido al limitado número de agentes terapéuticos aprobados para su uso en peces. Otro de los objetivos de esta investigación fue determinar los residuos de la CQMEPCA en tilapias clínicamente sanas, para lo cual se requirieron de 70 organismos a los cuales se les administró la cefaquinolona vía intramuscular, se hicieron dos grupos de 35 peces y a unos se les administró 5 mg kg^{-1} y al otro grupo 10 mg kg^{-1} después se sacrificaron a

diferentes tiempos y se les extrajeron algunos órganos como fueron hígado, bazo y riñón, y se realizó un análisis farmacocinético con estos órganos, obteniendo que se encontraron residuos en hígado a una concentración de 5 mg kg^{-1} en las primeras 12 horas solamente y para la concentración de 10 mg kg^{-1} se encontraron residuos en el bazo solamente en las primeras 4 horas. Con estos datos farmacocinéticos obtenidos y en virtud de la potencia antibacteriana de esta molécula es factible asegurar que, previo a un diseño de farmacia, para encontrar el mejor vehículo, se puede contar ya con el primer antibiótico de diseño y desarrollo completamente mexicano.

INTRODUCCION

Las epidemias de enfermedades originadas por bacterias son comunes en poblaciones densas en acuarios o cultivos de peces. La predisposición de los peces a tales problemas frecuentemente están asociados con la pobre calidad del agua, el mal manejo, la transportación del pez, cambios marcados en la temperatura, la hipoxia, y condiciones de estrés. Normalmente se encuentran altas concentraciones de bacterias de 10^8 ml l^{-1} en depósitos y acuarios, muchas de las cuales son oportunistas y activadas por un ambiente adverso, un huésped débil, o un organismo patógeno primario, muchas de las bacterias patógenas de los peces son aeróbicas y gram negativas (McNeill, 1979, Benediktsdottir et al , 1998)

Una de las enfermedades más comunes asociadas con condiciones de estrés en agua dulce son causadas por *Aeromonas hydrophila*, *A. liquefaciens* y *A. punctata*. Las *Pseudomonas* spp. *P. fluorescens* y *P. putida* son también patógenos facultativos para los organismos de agua dulce y son similares a la *A. hydrophila*. Todas las especies de agua dulce parecen ser susceptibles a los microorganismos patógenos debido a las deficiencias nutricionales, heridas traumáticas, parasitismo y cambios de temperatura (Olsson et al , 1998)

Las enfermedades más importantes en las granjas de peces provocan considerables pérdidas en la producción de la población, las cuales son causadas por *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio alginolyticus* (Samuelsen et al., 1997)

La vibriosis es una enfermedad sistémica común que afecta muchos cultivos, acuarios, ambientes naturales, estuarios y ambientes marinos; siendo menos común en peces de aguas frías. *Vibrio anguillarum* y otras especies de vibrios son responsables de algunas enfermedades, las cuales producen manifestaciones sistémicas incluyendo hemorragias; las infecciones causadas por vibrio son comunes y generalmente caracterizadas por lesiones superficiales de piel con ulceraciones externas en la pared del cuerpo, hemorragias en aletas y cola y cambios degenerativos de órganos internos,

los cuales pueden conducir a una considerable mortalidad (Roberts 1982, 1989, Baron y Finegold, 1990)

Los vibrios son saprofitos y son parte normal de la flora de los intestinos de peces marinos, los cuales son bien conocidos en la acuicultura alrededor del mundo; dentro de este género podemos encontrar las siguientes especies: *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio damsela* que son reconocidos como organismos patógenos de peces marinos y moluscos (Nicolet, 1985, Cottral, 1986, Lavilla et al., 1990; Hjeltnes y Roberts, 1993; Austin y Austin, 1993, Jawetz et al., 1996).

El diagnóstico de estas bacterias requiere la identificación de aislamientos puros de piel o de cualquier órgano infectado. Las medidas preventivas pueden ser, un amplio espacio para los organismos, temperatura constante, alimentación adecuada y así poder minimizar el estrés. La vibriosis de agua fría, es un serio problema en los cultivos marinos de salmónidos ya que está caracterizado por una alta mortalidad y una gran resistencia a las drogas, el agente etiológico es *V. salmonicida*. Desde que a *Vibrio* spp. se le ubica en ambientes marinos y dulceacuícolas es difícil liberarse de él (Fraser et al., 1991, Baron y Finegold, 1990).

Debido a la presencia de bacterias en el medio acuático se ha recurrido al uso de agentes antibacteriales en acuicultura, lo que tiene ya una larga historia, la cual comenzó a fines de los años 30's cuando la sulfameracina de amplio espectro quimioterapéutico fue introducida en los EE UU, realizándose pruebas *in vitro* y demostrando ser potentemente activa en contra de varias especies patógenas para peces e incluía a *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* y *Vibrio alginolyticus*, debido al mal manejo de los antibióticos las bacterias se vuelven altamente resistentes a estos como puede el caso de sulfamidas (Brander et al., 1989; Inglis y Richards, 1991).

Ha surgido un interés reciente en acuicultura y se han enfocado los esfuerzos de investigación al desarrollo de antibacterianos para usarse como quimioterapéuticos para las enfermedades infecciosas de los peces. Ensayos farmacocinéticos han sido desempeñados con numerosos antibacteriales en muchas especies de peces pero a menudo bajo condiciones extremas diversas, incluyendo variables ambientales (Temperatura del agua, salinidad, pH, etc) biológicas (Varias etapas de vida, anadromos contra especies marinas o de agua dulce, etc) y experimentales (Ensayos en campos clínicos contra pruebas de eficacia de laboratorio, varias rutas de administración incluyendo alimentación, e inyecciones parenterales), haciendo muy difíciles las comparaciones y las generalizaciones subsecuentes racionales en la farmacocinética¹ de una simple droga o una familia de antibacteriales entre varias especies de peces (Meinertz et al., 1996; Stoffregen et al., 1997).

Mantener y criar peces tropicales es un pasatiempo muy popular alrededor del mundo. Con un costo de casi de 16 millones de dólares, de peces tropicales de agua dulces, los cuales son rebasados anualmente en granjas en Florida y esto representa solo una fracción de la industria entera. La mayoría de los peces enfermos son tratados por acuiculturistas, aficionados y encargados de tiendas para animales con quimioterapéutica extrapolando las dosis de medicamentos de animales superiores. En un esfuerzo para contener el flujo de medicamentos para mascotas y para peces que se desarrollan en la industria de la acuicultura y posteriormente son consumidos; los EE.UU cuentan con la FDA (*Food and Drug Administration*) que es la agencia que restringe la amplia disponibilidad de los compuestos terapéuticos (Grondel (b) et al., 1987; Lewbart et al., 1997).

Las Fluoroquinolonas en principio fueron efectivas en otros animales como perros, gatos y borregos cuando eran administradas oralmente, pero recientemente se han hecho pruebas de su actividad *in vitro* en contra de *Aeromonas salmonicida* y *Vibrio* sp. los resultados han sido promisorios y disponibles y al parecer para ser utilizados en acuicultura (Pelzar, 1986, Stamm, 1989; Sumano, 1993).

La enrofloxacin es un compuesto antibacteriano derivado de la fluoroquinolona

aprobado en los EE UU por la FDA para uso exclusivo de perros y gatos, y es el antibiótico que presenta un amplio espectro de actividad bactericida incluyendo bacterias gram-negativa, organismos intracelulares tales como *rickettsia*, *chlamydia*, y *mycoplasma* y un menor espectro de actividad contra organismos Gram positivos. Se ha demostrado que la enrofloxacin es eficaz contra bacterias patógenas comunes que impactan el cultivo de salmonidos como pueden ser *Aeromonas salmonicida* (agente causante de la furunculosis) *Vibrio anguillarum*, (agente causante de la vibriosis), importantes enfermedades infecciosas que son causantes de serios daños económicos al cultivo de peces (Kazuaki, 1996; Stoffregen et al., 1997). Es el antibiótico con más uso en la terapéutica de organismos acuáticos, debido a la alta eficacia bactericida de las quinolonas a bajas concentraciones, su baja toxicidad y la nula resistencia bacteriana mediada por plásmidos, la resistencia se debe a la modificación de la estructura de la enzima de girasa-ADN (topoisomerasa) que es el blanco del mecanismo de acción de estos antibióticos (Paul et al., 1994; Booth y McDonald, 1988).

Pero las fluoroquinolona han atraído mucho interés en los pasados 10 años. Ellas proveen un amplio espectro de actividad antibacteriana y son particularmente activas contra los patógenos Gram negativos. La enrofloxacin mata la bacteria en bajas concentraciones provocando una obstaculización del espiral normal de DNA dentro del núcleo a través de la actividad de la DNA-girasa. Este mecanismo único de acción hace efectiva a la enrofloxacin contra la bacteria que es resistente a otros antibióticos (Lewbart et al., 1997).

Otras quinolonas y antimicrobiales de la fluoroquinolona sujetos a pruebas farmacocinéticas en las enfermedades infecciosas de peces incluyen ácido nalidixico ácido oxalínico, sarafloxacin, y difloxacin (Stoffregen et al., 1997).

La difloxacin y la sarafloxacin son nuevas aril-fluoroquinolonas antibacterianas que han sido identificadas como agentes potencialmente terapéuticos contra enfermedades bacterianas de peces. Esos compuestos han ampliado su espectro, con una actividad antibacterianas potente *in vitro* e *in vivo*, actúan rápidamente como potentes bactericidas y los patógenos tienen una baja posibilidad a desarrollar

resistencia a las sustancias, actúan por interferencia con la enzima bacteriana esencial, la DNA-girasa

El tianfenicol es un nuevo análogo sintético del cloranfenicol (este antibiótico con anterioridad fue utilizado mucho en terapéutica de organismos acuáticos). El cloranfenicol fue retirado del mercado por exhibir una actividad tóxica y que consiste en causar anemia aplásica en seres humanos, a raíz de esto se desarrolló un análogo del cloranfenicol el cual conservara su actividad antimicrobiana y no tuviera efectos colaterales (Sumano y Ocampo, 1997; Nordmo et al., 1998).

La CQMEPCA es una nueva generación de antibióticos los cuales están constituidos por la unión de una fluoroquinolona y una cefalosporina dando como resultado un antibiótico de amplio espectro, como es el caso de la cefaquinolona (Corpi et al., 1995), uno de los objetivos de esta investigación es tratar de incorporarlo al rubro de los antibióticos utilizados en las bacteremias de peces.

La terapia de las enfermedades bacterianas en acuicultura son complicadas debido al limitado número de agentes terapéuticos aprobados para ser utilizados en peces, aunado a esto se requiere de una investigación previa para obtener información farmacocinética la cual es esencial para el cálculo de regímenes de dosis racionales para dichas especies.

Mas aún, la naturaleza intensiva de la acuicultura requiere que los agentes antibacterianos usados para tratar infecciones de peces sean de bajo costo, efectivos y fácil de administrar (Alavi et al , 1993; Samuelsen et al., 1997).

¹ La farmacocinética se ocupa de estudiar el movimiento de los fármacos en el cuerpo, calculando desplazamiento en los diversos niveles orgánicos (compartimentos), la forma en que el organismo biotransforma estos medicamentos y las características de su excreción o eliminación. Desde un punto de vista práctico, podemos inferir que la farmacocinética es la disciplina que a través del estudio de la dinámica de la absorción, la distribución, la biotransformación y la excreción explica las fluctuaciones plasmáticas, urinarias, histológicas, etc., de los fármacos. La farmacocinética estudia la respuesta de los organismos vivos a los fármacos, en ausencia de enfermedades. (Sumano y Ocampo, 1997)

OBJETIVOS

Fase *in vitro*

GENERALES

Comparar la efectividad de CEFAQUINOLONA (CQMEPCA 406 (S) L) con respecto a otros fármacos comerciales (enrofloxacina y tianfenicol) *in vitro* a diferentes concentraciones evitando el crecimiento de *Vibrio alginolyticus*.

PARTICULARES

Comparar la actividad antibacteriana de la cefaquinolona (CQMEPCA) y otros fármacos comerciales (enrofloxacinas y tianfenicol) *in vitro* para inhibir el crecimiento de *Vibrio alginolyticus*.

Determinar los halos de inhibición producidos por CQMEPCA, enrofloxacina y tianfenicol a las mismas concentraciones.

Encontrar la Concentración Mínima Inhibitoria de la (CQMEPCA 406 (S) L) en diferentes diluciones

HIPOTESIS

El efecto antibacteriano *in vitro* de la CQMEPCA 406 (s) L puede ser mayor que la enrofloxacina y tianfenicol inhibiendo el crecimiento de *Vibrio alginolyticus*.

OBJETIVOS

Farmacocinética (residuos)

GENERALES

Obtener los tiempos de retención de una nueva molécula de la familia de las cefaquinolonas (CQMEPCA) en tilapia *Oreochromis* sp. clínicamente sanas, al aplicar el fármaco por vía intramuscular a dosis de 5 y 10 mg kg⁻¹ de peso vivo.

PARTICULARES

Determinación farmacocinética de residuos de la CQMEPCA mediante los métodos de espectrofotometría con arreglos de diodos y HPLC, posterior a la administración intramuscular a dosis bajas (5 mg kg⁻¹) en tilapia *Oreochromis* sp. clínicamente sanas

Determinación farmacocinética de residuos de la CQMEPCA mediante los métodos de espectrofotometría con arreglos de diodos y HPLC, posterior a la administración intramuscular a dosis altas (10 mg kg⁻¹) en tilapia *Oreochromis* sp. clínicamente sanas

Especificar la farmacocinética de residuos del fármaco CQMEPCA del cuerpo de la tilapia *Oreochromis* sp. Posterior a la administración intramuscular

Establecer la dosis y el intervalo de dosificación de la CQMEPCA al ser eliminado de la tilapia *Oreochromis* sp

HIPOTESIS

La variable farmacocinética de la CQMEPCA [antibacteriano de la familia de las cefaquinolonas (cefalosporinas y fluoroquinolonas)] puede ser descrita con farmacocinética compartamental utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como método analítico cualitativo/cuantitativo en peces clínicamente sanos

ANTECEDENTES

Fase *in vitro*

Bertoldini y Sala (1989) trabajaron con los valores al 100% del CMI, los cuales fueron determinados por enrofloxacin y sarafloxacin contra 37 cepas de *Yersinia ruckeri*, 25 de *V. anguillarum* y una de *A. salmonicida*, aisladas de granjas de peces en Italia. La enrofloxacin consistentemente dio los valores más bajos

Stamm (1989) trabajo con dos nuevas quinolonas antibacterianas, difloxacin (A-56619) y sarafloxacin (A-56620), las cuales fueron comparadas con ácido oxalínico, oxitetraciclina, y ormetoprim-sulfadimetoxina *in vitro* para poder inhibir el crecimiento bacteriano patógenas comunes en los peces. Los objetivos fueron determinar (1) las frecuencias de resistencia *in vitro* para antibacterianos en 8 tiempos, y las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), (2) los promedios y extensiones del decremento en la susceptibilidad antibacterial cuando los organismos fueron seriamente transferidos para incrementar las concentraciones de la droga, (3) la estabilidad del decremento de susceptibilidad, y (4) la resistencia cruzada para otros antibacterianos por organismos con resistencia desarrollada. La frecuencia de resistencia espontanea para todos los antibacterianos en 8 tiempos dió como resultado un CMI bajo de 10^{-7} a 10^{-10} . Las quinolonas seleccionadas demostraron bajos niveles de resistencia *in vivo*. El promedio de susceptibilidad decreció durante la transferencia serial y fue gradual para todos los organismos con las combinaciones de drogas, en contraste para la difloxacin y sarafloxacin. La CMIs del ácido oxalínico, oxitetraciclina, y ormetoprim-sulfadimetoxina, resultaron que tienen una resistencia desarrollada estable para los antibacterianos. La resistencia cruzada fue observada entre las dos quinolonas pero no así con los otros antibacteriales, excepto por la oxitetraciclina. Basado en estos resultados, la resistencia para la difloxacin y sarafloxacin por los patógenos del pez no se desarrollara fácilmente durante el uso de la terapia apropiada

Bowser y House (1990) utilizaron un total de 25 bacterias patógenas en peces que fueron probadas *in vitro* para encontrar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias

en tubos de ensayo expuestas a enrofloxacin, ácido nalidixico y ácido oxalinico en varias diluciones. La enrofloxacin fue más inhibitoria que el ácido nalidixico y el ácido oxalinico con 24 de 25 bacterias probadas, los tres compuestos tenían la equivalencia CMI para una de las *Aeromonas salmonicida* aisladas. El ácido oxalinico con 17 de 25 organismos probados y fue equivalente al ácido oxalinico con 6 de los 25 organismos probados.

Lewis y Hastings (1990) utilizaron ácido oxalinico y dos nuevas fluoroquinolonas. ciprofloxacina y norfloxacina haciendo una evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana contra *Aeromonas salmonicida*, obteniendo que el ácido oxalinico tiene una actividad semejante a la ciprofloxacina en términos de una Concentración Mínima Inhibitoria de $0.18 \mu\text{g ml}^{-1}$, y norfloxacina no presenta esta actividad, pero presentaron la habilidad para matar a cepas resistentes de *Aeromonas salmonicida*.

Barnes y Amyes (1991) realizaron una prueba *in vitro* utilizando 25 bacterias patógenas para peces, para poder determinar la Concentración Mínima Inhibitoria en tubos de diferentes diluciones, utilizando enrofloxacin y ácido nalidixico observándose que la enrofloxacin dio mejores resultados en 17 de 25 organismos que el ácido nalidixico.

Barnes (1991) también realizó pruebas en pollos con el ácido oxalinico y cinco nuevas fluoroquinolonas: sarafloxacina, enrofloxacin, PD 127, 319, PD 117, que tienen una elevada actividad *in vitro* contra *Aeromonas salmonicida*. Sarafloxacina, enrofloxacin, PD 127, 139 y PD 117, tiene significativamente mayor actividad que cualquier ácido oxalinico, para matar al 99% de las bacterias después de 1 hora.

Inglis y Richards (1991) demostraron que las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 29 agentes antimicrobianos que fueron determinados por algunos aislamientos representativos de *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* y *Vibrio* sp. once de ellos, son usados ampliamente en practicas clínicas y fueron probados adicionalmente contra 28 a 36 campos que fueron aislados. Las fluoroquinolonas fueron

inhibidas en muy bajas concentraciones con un 50% de *A. salmonicida* teniendo un CMI de enrofloxacin con un valor de 0.02 g ml^{-1} . La distribución de CMI en las fluoroquinolonas y al ácido oxalínico fueron similares e indicaron una posible resistencia cruzada. La amoxicilina, fluorfenicol, minociclina, rifampicina y las sulfonamidas tuvieron un pico sencillo en la distribución de CMI con valores de 1.25 g ml^{-1} . Las concentraciones mínimas inhibitorias de fluoroquinolonas fueron 4 veces más grandes a una temperatura de 10°C comparada con 22°C . Esto no sucedió tanto con la amoxicilina, fluorfenicol o la sulfacorfridacina-trimetoprim (S-TP). *A. salmonicida* fue rápidamente aniquilada a una temperatura de 22°C por la fluoroquinolona y S-TP, el ácido oxalínico y amoxicilina aniquilaron a las bacterias en un tiempo de 24 horas y el fluorfenicol resulto ser bacteriostático.

Martinsen et al , (1992) observaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de ácido oxalínico, flumequina, sarafloxacin, enrofloxacin y oxitetraciclinas contra bacterias patógenas en peces *Aeromonas salmonicida*, *V. Anguillarum* y *Yersinia ruckeri* determinándose la CMI a 15°C , y se obtuvo que la enrofloxacin tiene mayor actividad a temperaturas elevadas, por otro lado la actividad de oxitetraciclina se inhiben a altas temperaturas, sarafloxacin es levemente más activa que flumequinas y el ácido oxalínico en peces.

Austin y Austin (1993) observaron una enfermedad en peces, que afectaba principalmente la piel con un alto nivel de mortalidad, la cual ocurría en estado juvenil cuando los organismos presentaban un peso de 20 g en acuario a una temperatura de 25°C , posteriormente se identificó *Vibrio alginolyticus* y se obtuvo como consecuencia que los peces mostraron melanomas, abscesos musculares y abdomen inflamado con liquido ascítico. Se hicieron inmersiones en 20 mg l^{-1} de cloramina por 15 minutos durante 3 días consecutivos obteniendo resultado favorable.

Ahmed y Shoreit (1994) observaron cientos de peces enfermos y tomaron una muestra al azar de organismos, las cuales estaban clínica y microbiológicamente dañados. Los signos clínicos incluyeron hemorragias en el cuerpo especialmente en el abdomen, ojos nublados, exoftalmia, ascitis, inflamación del orificio anal y congestión

de los órganos internos. Posteriormente se aislaron 15 especies de vibrio los cuales fueron identificados mediante morfología colonial y pruebas bioquímicas. Se indujo una infección experimental usándose las especies de la tilapia *Oreochromis mossambica* y *Oreochromis nilotica* mostrando similitud clínica. *Vibrio* sp tuvo una sensibilidad a estreptomycin, neomicina, netilmicina, oxitetraciclina y cloranfenicol.

Wang et al., (1995) demostraron las actividades antibacteriales *in vitro* de 8 fluoroquinolonas, incluyendo difloxacin (DIF), enrofloxacin (ENR), fleroxacin (FLE), norfloxacin (NOR), OD124816 (PD124), PD127391 (PD127), PD131628 (PD131) y sarafloxacin (SAR) las cuales fueron comparadas con no fluoroquinolonas, incluyendo ácido naladixico (NA) y ácido oxalínico (OA) y no quinolona, incluyendo oxitetraciclinas (OTC) y sulfadimetoxina-ormetoprim (SO), para el método de disolución serial de plata se usaron aislamientos de vibrio obtenidos de un cultivo de camarón. El Wilcoxon firmado en una prueba de rango mostró el siguiente orden de mayor sensibilidad: OTC (NA (SO (OA, DIF, y FLE (NOR (PD124 y SAR (ENR (PD131 (PD127. Las fluoroquinolonas incluidas DIF, ENR, FLE, NOR, PD124, PD127 y PD131 tiene una actividad antibacterial mayor que las no fluoroquinolonas y las no quinolonas, y el vibrio aislado fue más sensible al NA y OA que al OTC.

Fase *in vivo*

García (1997) realizó un estudio en tilapia *Oreochromis mossambicus*, la cual se infectó experimentalmente con *Vibrio fluorences* vía intramuscular y se dosificó con la (CQMEPCA 406 L (s)) "cefaquinolona" que es una mezcla de dos fármacos (fluoroquinolona y cefalosporina) a diferentes concentraciones en dos formas distintas en el alimento y en el agua, mostrando que era más efectiva la administración del antibiótico en el alimento ya que la mortalidad fue menor que la mortalidad obtenida al suministrarse el antibiótico en el agua. La concentración DL (dosis letal) de (CQMEPCA 406 L (s)) "cefaquinolona" suministrada en el alimento fue de 6.56 mg/kg y la concentración DL 50 de CQMEPCA 406 L (s)) "cefaquinolona" suministrada en el agua fue de 20.52 mg/kg. Al comparar los resultados obtenidos de mortalidad de las tilapias *Oreochromis mossambicus* medicadas con cefaquinolona el cual fue de un 80%,

con respecto a la mortalidad obtenida de las truchas *Oncorhynchus mykiss* las cuales fueron dosificadas con enrofloxacin (fluoroquinolona) obteniéndose una mortalidad del 85%, esto quiere decir que la CQMEPCA o cefaquinolona es más efectiva in vivo que la enrofloxacin.

Farmacocinética (residuos)

Grondel (a) et al. (1987) plantearon un estudio de farmacocinética para la investigación de la absorción, distribución, eliminación y bioabibilidad de la oxitetraciclina (OTC) en carpa, *Cyprinus carpio* L. Las diferentes rutas de administración de la OTC en la carpa fueron intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) y oral con una cantidad de OTC de 60 mg/kg de peso corporal. Los niveles de OTC fueron determinados en plasma y en diversos tejidos. El análisis de la concentración de la droga en plasma vía (i.v.) reveló que la eliminación final de la vida media fue de $(139.8 \pm 38.1 \text{ h})$ Siguiendo con la administración (i.m.) de la OTC, C_{\max} $56.8 \pm 10.9 \mu\text{gOTC/ml}$ a 14 h pos ingestión. El área de V_d fue de $2.1 \pm 0.66 \text{ l/kg}$. Extremas diferencias se han observado con respecto a la bioabibilidad de la vía de administración i.m. y la administración oral; aproximadamente 80 y 0.6%, respectivamente. La ingestión i.m. en tejidos de OTC, reveló que la droga fue acumulada en el pronefro, hueso y escamas. Después de 21 días las concentraciones de OTC fueron 2.9 ± 0.8 , 5.2 ± 0.3 y $4.7 \pm 3.1 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. Los datos de los parámetros farmacocinéticos son discutidos con base en la relación de la susceptibilidad y el sistema inmune del pez.

Grondel (b) et al. (1989) realizaron estudios farmacocinéticos comparativos de la conducta de la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) y el pez gato africano (*Clarias gariepinus*). Las vías de administración de la OTC fueron intravenosa (i.v.) e intramuscular (i.m.), las dosis administradas fueron de 60 mg/kg de peso corporal. La trucha y el pez gato se mantuvieron a una temperatura constante de 12°C y 25°C, respectivamente. La concentración de droga en el plasma del pez gato africano y en la trucha arcoiris administrada por vía i.v. fue de ($C_p = 86 \pm 10 \mu\text{g/ml}$) y la trucha ($C_p = 753 \pm 290 \mu\text{g/ml}$). Una diferencia significativa fue observada con respecto a la larga distribución aparente de volumen ($V_{d(\text{area})}$) después de la administración i.v. de la OTC

(trucha, valor medio 2 l/kg, pez gato, valor medio 1.3 l/kg) Los valores obtenidos para la vida-media fueron para trucha, 89.5 h, para el pez gato, 80.3 h). La media máxima de la concentración del plasma (C_{max} = 56.9 $\mu\text{g/ml}$) obtenida para la trucha después de 4 h de la administración i.m. de OTC. En el pez gato africano bajo C_{max} = 43.4 $\mu\text{g/ml}$ después de 7 h. No hubo diferencias significativas en lo observado con respecto a la bioabilidad seguida por la administración i.m. de OTC (trucha, 65%, pez gato, 86%)

Rogstad et al. (1991) estudiaron la absorción, distribución y eliminación de la oxitetraciclina en plasma, músculo, hígado, mucosa del intestino, piel y vértebras en trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* de agua dulce en donde fueron estudiadas dosis de 150 mg/kg. La absorción de la droga fue lenta y únicamente cerca del 2.6% de la dosis administrada en el tiempo máximo fue absorbida. La distribución de la droga fue en todos los tejidos. La vida media fue detectada en el plasma aproximadamente en 11 días.

Bowser et al. (1992) administraron la enrofloxacin via intravenosa y por via oral, después fue determinada la actividad farmacocinética. El primer grupo de estudio estuvo constituido por 26 truchas arcoiris *Oncorhynchus mykiss* las cuales se mantuvieron a 15°C y se les administró una dosis de 5 a 10 mg/kg de su peso corporal via intravenosa, posteriormente la extracción de la sangre fue después de 60 h. El segundo grupo de organismos se mantuvo a una temperatura de 10°C a 15°C, estuvo constituido por 80 peces para cada rango de temperatura, se le administró la enrofloxacin via oral a las siguientes concentraciones 5, 10 y 50mg/kg de peso corporal y después de 60 h fueron extraídas las muestras de sangre. En el primer grupo la constante de hibridación de α y β no presentó diferencias entre las dosis. La fase de distribución fue rápida con una vida-media de 6 a 7 minutos para ambas dosis. La eliminación completa de la vida media fue de 24.4 h (95% CI = 20.2 - 30.8) y 30.4 h (24.2 - 41.0), respectivamente para 5 y 10 mg/kg de las dosis. Una $V_{d(\text{area})}$ fue observado en las dosis de 5 y 10 mg enrofloxacin/kg.: 3.22 y 2.56 l/kg, respectivamente. La dosis de despeje para el cuerpo fue de 5mg/kg con 92 ml/h kg y 58 ml/h kg para 10 mg/kg de las dosis. Para la siguiente administración oral de

enrofloxacina aparentemente K_a concluyen que todas las dosis a una temperatura de 10°C presentan un promedio de 62% siendo menor aparentemente la K_a a una temperatura de 15° C. Para la aparente estimación del $t_{(1/2)k}$ concluyen que ambos rangos de temperatura tienen 29.5 h (18.4 – 73.4) y 56.3 h (38.3 – 106.6). El promedio de bioabilidad fue de 42% de las dosis a una temperatura de 15° C y fue disminuyendo el promedio a 25% a una temperatura de 10° C. La concentración máxima del suero fue entre 6 y 8 h. La eliminación de la vida-media en trucha arcoiris fue aproximadamente entre 5 y 9 días, esta estimación es importante cuando es considerada la duración de la terapia en pruebas clínicas.

Kazuaki (1995) estudio la farmacocinética para entender la bioabilidad de oxitetraciclina (OTC) en ayu (*Plecoglossus altivelis*) los cuales fueron infectados con vibrio. La temperatura del agua se mantuvo a $18.0 \pm 0.3^\circ \text{C}$ en todo el experimento. La concentración del suero de OTC en peces sanos después de la administración de 25 mg/kg^{-1} del peso corporal fue descrita mejor para modelos de dos compartimentos, mientras que la administración oral fue de 100 mg/kg^{-1} del suero en peces sanos e infectados de ayu. La estimación de la bioabilidad después de la administración oral fue de 9.3% para los peces sanos y 3.8% para los peces infectados. La eliminación de la vida-media del suero en músculo, hígado y riñón fue de 53.1 h, 106 h, 125 h y 117 h para los peces sanos, y 63.2 h, 92.9 h, 107 h y 123 h para peces infectados, respectivamente. Las proteínas del suero *in vivo* de OTC fué de $68.0 \pm 28\%$ para peces sanos y $69.9 \pm 4.4\%$ para peces infectados.

Meinertz et al (1996) analizaron la farmacocinética de la benzocaina en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). La administración de benzocaina fue mediante bolos via intraarterial a unas concentraciones de 6 y 9 mg/kg . Las concentraciones de benzocaina después de 2 minutos de la administración fueron muy altas las variables y decrecieron rápidamente en los primeros 10 minutos. Las concentraciones de benzocaina cerca de los 90 minutos bajaron después de la dosificación. Se hicieron tres compartimentos para el modelo farmacocinético obteniendo que la mejor descripción fue en el plasma. Al finalizar el experimento el modelo del parámetro indica que la distribución de benzocaina afuera del plasma fue limitada, a pesar de que la distribución

inicial de benzocaina fue rápida en el plasma, en la fase terminal de benzocaina su eliminación fue relativamente lenta (fase de eliminación terminal vida-media de 89 y 109 minutos)

Sohlberg et al. (1996) determinaron la actividad antimicrobial de la droga flumequina, mediante la canulación y la no canulación en el salmón del atlántico (*Salmo salar*) en agua marina a 11° C. Los peces canulados fueron divididos en dos grupos, 8 de ellos se les proporcionó flumequina a 25 mg/kg por medio de la vía intravenosa en la vena caudal y a otros 8 oralmente vía estómago por el tubo que pasa por debajo del esófago; durante un periodo de dos días, posteriormente se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos después de la administración de la droga. Al grupo de los peces no canulados también se les administró flumequina vía intravenosa y oral. El volumen de distribución ($V_{d(ss)}$) es dos veces más largo en el grupo canulado comparado con el grupo no canulado, en los peces que estuvieron sometidos a una administración de la droga vía intravenosa. En la eliminación de la vida-media difiere considerablemente, en los grupos canulados y en los no canulados. La lenta reducción de la concentración en el plasma en los peces canulados debido a la larga $V_{d(ss)}$ genera pequeñas diferencias en (C/T) entre los grupos. En el estudio la eliminación de flumequina en el grupo canulados difiere con respecto al grupo no canulado en salmón del atlántico.

Lewbart et al. (1997) realizaron la administración de enrofloxacin en pacu rojo por vías intramuscular (i.m.) y oral (p.o.) e inmersiones en acuarios. La vida media de enrofloxacin en la administración i.m. fue de 28.9. La concentración máxima (C_{max}) a las 4 hrs fue de 1.64 $\mu\text{g/mL}$ seguido por una dosis única de 5.0 mg/kg *in vitro* para la concentración mínima inhibitoria (MIC) para 20 organismos infectados por bacterias. Después de 48 h de la administración pos i.m., la concentración media del plasma de enrofloxacin fue mayor que la MIC para las bacterias gram negativas para peces enfermos. La vía oral de la administración de la enrofloxacin produjo una C_{max} de 0.94 $\mu\text{g/mL}$ de 6-8 h. La C_{max} estuvo más arriba de lo reportado *in vitro* MIC. Las concentraciones de la inmersión en los acuarios fueron de 2.5 mg/L por 5 h. La C_{max} fue de 0.17 $\mu\text{g/mL}$ después de 2 h pos tratamiento en muestras del plasma. La concentración de enrofloxacin en el plasma excedió lo publicado *in vitro* MIC's para

los peces infectados con bacterias 72 h después del tratamiento. Es posible y práctica la obtención de la concentración de enrofloxacin en sangre en el pacu rojo usando la p o i m y los baños de inmersión. La ruta i m fue más predecible y se presento con una alta concentración de droga en el plasma

Yonis et al (1997) trabajaron con dos grupos de 150 *O. niloticus* las cuales fueron inoculadas vía i.p. con 0.2 ml del cultivo de caldo (3.5×10^7 /ml) de *V. anguillarum* [*Listonella anguillarum*]; 20 peces fueron inoculados como control, siguiendo el desarrollo de los signos clínicos. Trabajaron con dos grupos de peces, el primer grupo A fue inyectado por vía i.p. con enrofloxacin a 10 mg/kg y el segundo grupo B fue inyectado con 20 mg/kg peso corporal. La enrofloxacin persistió durante el tratamiento en los peces durante las 24 y 48 hrs siguientes a la ingestión de 10 y 20 mg/kg, respectivamente. La distribución de la vida media fue de 31.6 ± 5.18 y 26.11 ± 1.93 minutos y la eliminación de la vida media fue de 7.92 ± 0.44 y 6.52 ± 0.38 h, respectivamente. La eliminación de enrofloxacin para todo el tejido fue de 96 h. La mortalidad decreció de 27.33% y 25.33% a 13.76 y 8.93% en el grupo A y B, respectivamente, 48 h después de la ingestión de enrofloxacin

Stoffregen et al. (1997) trabajaron con una familia de antibacterianos que son un grupo relativamente reciente entre los componentes bactericidas, la eficiencia de las características generales de estos compuestos es que son de amplio espectro y las bacterias muestran una mínima resistencia en pacientes tratados. Las fluoroquinolonas son prescritas ampliamente en humanos y recomendados por médicos veterinarios en medicina veterinaria, en EE UU están actualmente aprobados solo dos compuestos, enrofloxacin (Baytril® Bayer Animal Health, Shawnee Mission, KS) y sarafloxacin (SaraFlo® , Abbott Laboratories, North Chicago, IL), actualmente las fluoroquinolonas son utilizadas para tratamientos bacterianos en cultivos de peces. La enrofloxacin fue administrada en Salmón del atlántico en estado juvenil por vía intraarterial (i.a), intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.) y la administración oral. Las tres primeras rutas fueron dosificadas con 10 mg/kg, y por vía oral se realizaron con dos dosificaciones 10 (p.o.-10) y 5 (p.o.-5) mg/kg. En los modelos farmacocinéticos se observaron las siguientes vidas-medias ($t_{1/2}$) de 130.6, 34.32, 84.98, 105.11, y 48.24 h.

Por debajo del area de la curva las concentraciones de la droga en el tiempo (AUC) fueron de 84 3, 75 31, 55 61, 41 68, y 38 81 $\mu\text{g h ml}^{-1}$, y una bioabilidad (F) de 100, 89 34, 65 97, 49 44, y 46.04% (i a , i p , i m , p.o.-10, p.o.-5, respectivamente). Toda la administración de las rutas de 10mg/kg encontradas en el cultivo comparando la concentración de drogas en las curvas de tiempo para el tejido, indican distintas desventajas para emplear una ruta cinética Finalmente, la dosis 5 mg/kg (p o.-5) comparable en la multiplicación de los tejidos en la concentración-tiempo de la curva de 10 mg/kg en dosis (p.o.-10), con tales evidencias farmacocinéticas la justificación terapéutica prueba que la eficiencia es a bajas dosis.

Abedini et al. (1998) estudiaron la farmacocinética y la bioabilidad de oxitetraciclina (OTC) en el Salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) marino y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de agua dulce, comparando una sola dosis de OTC (50mg/kg) administradas vía i.a, con una temperatura del agua de 11°C. Se obtuvieron muestras de sangre en diferentes tiempos de los peces, se seleccionó una fase sólida y se analizó OTC con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Presentaron la misma ruta de administración y el tiempo de concentración de la OTC en la sangre en la trucha arcoiris y en el salmón. En el modelo derivado para los parámetros farmacocinéticos y la aparente bioabilidad de OTC se observó lo siguiente: La eliminación de la vida-media, volumen de distribución y la bioabilidad oral de OTC en el salmón chinook fue de 88.29 h, 0.89 l/kg y 24.84% respectivamente; Los valores correspondientes de la trucha arcoiris fueron 94.22 h, 0.87 l/kg y 30.30%, respectivamente. El resultado del presente estudio indica que las diferentes especies y la alta salinidad de 24‰ no juegan un rol importante en la absorción y eliminación de OTC para los salmonidos. Además, las truchas de agua dulce pueden ser usadas como modelos para estudios de farmacocinética de OTC y viceversa.

CQMEPCA

Antecedentes del desarrollo de un antibacteriano

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

Las fluoroquinolonas y los β -lactámicos integran el grupo de antibacteriales de mayor desarrollo farmacéutico, que mayor espectro han cubierto y que mayor potencia han presentado en ésta última década (Sumano, 1993).

A partir de su caracterización en 1945, los β -lactámicos, y en especial las cefalosporinas, experimentan un enorme desarrollo de compuestos biosintéticos. Sin embargo, no fue sino hasta 1964 que se introdujo la primera cefalosporina dentro de la práctica médica (Thomson et al., 1984; Capril, 1988). Actualmente se distinguen tres generaciones de cefalosporinas, e incluso hay quienes consideran la existencia de una cuarta con la cefaquinoma y la cefepima (Botter et al., 1995; Jones, 1996; Elkhaili et al., 1997).

Pues bien, Leshner (1960) presentó a la comunidad médica la primera quinolona antibacteriana, el ácido nalidixico (Albercht, 1977). Esta molécula resultó ser de gran valor para la quimioterapia de las enfermedades bacterianas, en virtud de haber contribuido como el núcleo básico (Figura 1) de los compuestos de último desarrollo de importancia mundial, en el área de los medicamentos antibacterianos: las fluoroquinolonas (Figura 2) En la actualidad, esta molécula y muchos análogos más, han recibido su patente mundial (Prescott y Baggott, 1991). En México se han

clasificado en generaciones (Sumano, 1993) y las de tercera generación son las más usadas contra infecciones bacterianas, pero desafortunadamente se ha abusado de su uso, obedeciendo más a presiones comerciales, que a criterios clínicos farmacológicos y epidemiológicos y también debido a que se hacen extrapolaciones de especie a especie. Se han implementado diversas formas de dosificación, incluso metafiláctica y premezclas de manera que las fluoroquinolonas se han convertido en el grupo de medicamentos más utilizados en estas dos últimas décadas. Sus significativas ventajas en cuanto a su espectro, actividad y farmacocinética, son evidentes (Sumano, 1993), en Estados Unidos de Norteamérica, después de décadas de presiones ha aceptado el uso de la sarafloxacin en pollos y de la enrofloxacin en Bovinos.

Considerando este marco de referencia, y dados los recursos económicos necesarios para presentar al mercado un nuevo antibacteriano eficaz, es factible explicarse porque, actualmente, el descubrimiento de nuevos antimicrobianos en medicina humana y medicina veterinaria se encuentra a cargo de proyectos conjuntos entre universidades e institutos de investigación y la industria privada; esto solo se ha llevado a cabo en países desarrollados (Alper, 1993; Pharmaceutical Manufacturers, 1993; Billstein, 1994).

Anualmente, las grandes corporaciones farmacéuticas en el mundo, destinan gastos inmensos para el desarrollo de nuevas moléculas. En contraste, en Latinoamérica, incluyendo México, ningún laboratorio hasta ahora, había destinado recursos para el desarrollo de moléculas originales (Anónimo, 1995).

Sin embargo, a mediados de esta década, nuestro país, a través de los laboratorios Aranda², se ha colocado como pionero en el desarrollo e investigación de un novedoso grupo de antibacterianos, las cefaquinolonas³ (patente cefalones), molécula patentada internacionalmente por los Laboratorios Aranda.

El concepto original para el desarrollo de la cefaquinolona, fue el de crear un efecto doble, utilizando cefalosporinas y fluoroquinolonas para la formación o la

² Dr Gustavo García de la Mora Departamento de Posgrado. Facultad de Química. UNAM.

³ Química Lina Laura Nava Muñoz. Control de Calidad. Laboratorio Aranda. Querétaro Qro.

acerca de la pérdida de actividad generada por las manipulaciones de dicha molécula en sitios estratégicos (Ito et al, 1980; Bergan, 1987) La experiencia con este tipo de compuestos híbridos no había sido del todo favorable en otros laboratorios. La tarea no fue ni es fácil, pues se deben de obtener productos con una actividad antimicrobiana superior a la de las partes que lo componen (Chu y Fernández, 1989; Santamaría, 1997), para que el proyecto sea viable.

Los esfuerzos de investigación y desarrollo en este campo, se iniciaron en 1990, a partir de los grupos terapéuticos disponibles, más favorables y estudiando las diferentes posibilidades de mezclas físicas y sustitución de radicales en las diferentes posiciones de las moléculas individuales (Méndez, 1996). Después de múltiples consideraciones y tentativas de hibridación, se concluyó que la mejor expectativa, era la de realizar la unión de un grupo fluoroquinolínico con un derivado del ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), precursor sin actividad antimicrobiana, formando un grupo carboxamido con el 7-amino del núcleo lactámico (Figura 3)

Estructura química

La cefalosporina C (Figura 4), obtenida a partir de la especie de *Cephalosporium acremonium*, tiene un anillo β -lactámico y un anillo adyacente de dihidrotriazina. El tratamiento ácido de la cefalosporina C, hidroliza al ácido 1-7 aminocefalosporánico (7-ACA) (Figura 3). En sí el compuesto 7-ACA no tiene actividad biológica y se utiliza como materia prima para aumentar radicales en un sitio específico (Smith y Reynard, 1993). Este mismo grupo se utilizó en la reacción de la cefaquinolona.

La idea inicial se basó en la sustitución de un anillo cefalosporánico (ácido 7-amino cefalosporánico) en la posición 3 de un anillo 1 ciclopropilo 7-etil-piperazinilo 6-fluoro-quinolínico, mediante la formación de un grupo carboxamido (Figura 5) el acoplamiento de un grupo β -lactámico en sustitución del carboxilo de la posición 3 del anillo quinolínico, formándose un radical carboxamido y grupo amino del anillo β -lactámico, siendo perfectamente estable, y da lugar a una molécula de potencia considerable. De la reacción básica, se han generado múltiples opciones con mayor o

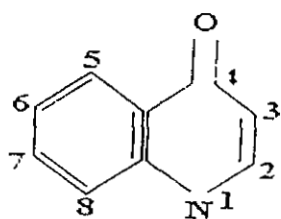


Figura 1 Núcleo básico de las quinolonas.

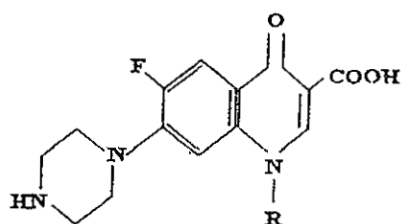


Figura 2. Estructura básica de las fluoroquinolonas.

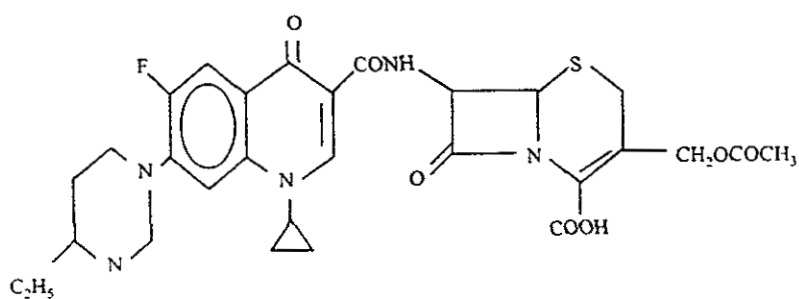


Figura 3 Estructura molecular de la CQMEPCA (Sumano *et al.*,1998).

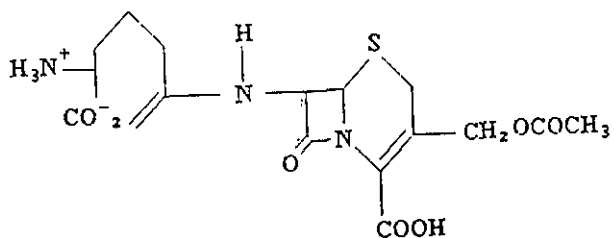


Figura 4 Cefalosporina C

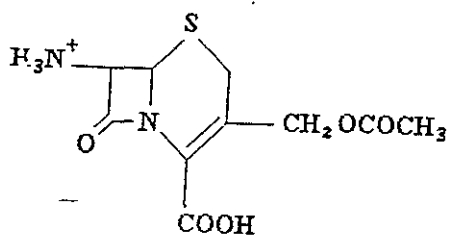


Figura 5. Compuesto denominado 7(ACA) (ácido 7-amino cefalosporánico)

menor actividad dependiendo de los precursores utilizados para su síntesis (Johnson et al, 1996) En la estructura molecular de las cefaquinolonas, hay cuatro grupos substituyentes; dos en el núcleo fluoroquinolínico y dos en el grupo cefalosporánico, lo que da como resultado la posibilidad de sintetizar más de dos mil compuestos de los cuales, 128 se consideran como compuestos de investigación prioritaria en este campo.

Las moléculas que se seleccionaron, se sometieron a determinaciones fisicoquímicas como: a) humedad por Karl Fisher, b) punto de fusión, c) cromatografía de capa fina (TLC), d) espectrofotometría por infrarrojo (IR), e) resonancia magnética nuclear (RMN), f) espectrofotometría de masas¹ Así se comprueba y con certeza la existencia de la unión de las porciones quinolónicas y cefalosporánicas mediante el grupo carboxamido, la presencia del anillo β -lactámico sin degradación y el peso molecular de 650 daltones de los compuestos formados de acuerdo con la estructura diseñada

Estabilidad

La primera molécula liberada para ese estudio se codificó como CQMEPCA. Es un antimicrobiano que en estado sólido es relativamente estable. La cefaquinolona, en una solución de agua destilada tiene un aspecto brillante de color amarillo con un pH de 10.47. Al igual que la mayoría de las cefalosporinas (Goodman, 1986, United States Drug Information, 1995), la cefaquinolona no representa un comportamiento estable, por lo que se indica que, una vez reconstituida se utilice en la siguiente hora para garantizar su pureza. Después de 96 horas a temperatura ambiental, la solución tiene apariencia turbia y de color amarillo ámbar, esto se debe a la hidrólisis de la carboxamida de la CQMEPCA² Si se requiere utilizar durante períodos prolongados, se recomienda su refrigeración³.

² Dr Gustavo García de la Mora Departamento de Posgrado. Facultad de Química. UNAM.

³ Química Lina Laura Nava Muñoz. Control de Calidad. Laboratorio Aranda. Querétaro Qro.

Mecanismo de acción

Poco se sabe del modo de la acción de la CQMEPCA, y si existe, o no relación con respecto a los componentes por separado. En un ensayo microbiológico Jones, 1996 sugirieron que era posible, que dicha molécula tuviera un mecanismo antibacteriano doble, esto es, que actuara tanto en el citoplasma bacteriano, inhibiendo el desenrollamiento bacteriano del ADN, como en la pared celular. A través de la inhibición de la polimerización de los nucleótidos de Park. Aún se investiga para determinar con exactitud la participación de estas vías del metabolismo bacteriano y quizá otras que pudiesen estar involucradas en el mecanismo de acción de esta novedosa molécula.

Para conocer el mecanismo de acción de la CQMEPCA, se determinó la relación entre la localización de la CQ y sus precursores en comparación con el valor correspondiente al ADN bacteriano aislado, mediante la técnica reportada por Maniatis y Sambrook (1989) No se detectó interacción de la CQ a nivel del ADN, pero este estudio no puede destacar su participación a otros niveles del material nuclear, como la ADN girasa, polimerasas, etc. En otros estudios donde se analizó el papel de plásmidos que codifican la resistencia de quinolonas, con respecto a la resistencia de la CQMEPCA, no se detectó efecto del plásmido *gyra-A*, por lo que se infirió que el efecto de este antimicrobiano difiere al de las cefalosporinas de primera generación, y que posiblemente, posee un mecanismo de acción diferente a los ahora conocidos, que incluyen a ambos efectos a nivel de pared (o quizá de membrana) y a nivel citoplasmático, posiblemente en parte, mediado por un efecto sobre precursores de ADN⁴. Hasta el momento, las evidencias indican que la actividad antibacteriana de la CQMEPCA es persistente en bacterias resistentes a éste y lo mismo sucede cuando hay resistencia para fluoroquinolonas, pero en contadas cepas de *Pseudomonas* spp. en las que se ha detectado resistencia tanto a cefalosporinas como a fluoroquinolonas y se reduce la actividad de la CQMEPCA⁵.

⁴ Proporcionado por el Departamento de Control de Calidad de los Laboratorios Aranda

⁵ Hospital General de Zona del IMSS de Querétaro. Qro. estudio con más de 200 bacterias hospitalarias y Laboratorio Clínico Especializado en Querétaro. Qro.

Potencia y espectro microbiológico de la CQMEPCA

Se le considera una agente bactericida de amplio espectro que tiene actividad *in vitro* contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, presentando una acción muy importante contra bacterias extra-celulares e intra-celulares (Méndez, 1996). Con relación a los resultados obtenidos por pruebas comparativas de la molécula contra tres fluoroquinolonas y cefalosporinas con base en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI'S) contra *Staphylococcus aureus*, se dedujo que CQMEPCA es⁶:

31.7 veces más potente que la norfloxacin	(2 ^{da} generación)
7.9 veces más potente que la ciprofloxacina	(2 ^{da} generación)
31.7 veces más potente que la cefatoxina	(3 ^{ra} generación)
15.8 veces más potente que la cefoperazona	(3 ^{ra} generación)
1.9 veces más potente que la enrofloxacin	(3 ^{ra} generación)

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

Toxicidad aguda

Se han realizado múltiples ensayos para determinar la dosis letal LD 1%, LD 50%, y el margen terapéutico en ratas y ratones. Los resultados reflejan una toxicidad baja; de 8.6 g kg⁻¹, y 9.56 g kg⁻¹ respectivamente, por vía intravenosa; y por vía oral fueron la LD 50% de 7.8 g kg⁻¹ y la LD 1% de 2 g kg⁻¹, a una dosis efectiva de 99% de 3 g kg⁻¹ ⁶.

Comparativamente con la toxicidad conocida de otros antimicrobianos utilizados rutinariamente (aminoglicósidos, cloranfenicol, rifampicina, etc.) (Sumano y Ocampo, 1997), la CQMEPCA muestra notables ventajas. No obstante, aún resta llevar a cabo otras pruebas de toxicidad.

⁶ Dr. E. Lorenza, Departamento de Farmacología Facultad de Medicina UNAM

Eficiencia clínica

Se han realizado diversos estudios de carácter clínico, para conocer la eficacia de este nuevo grupo de medicamentos. Inicialmente, al conocer que la CQMEPCA tenía un efecto bactericida⁷ notable, confirmado por los abundantes resultados de los CMI realizados (Méndez, 1996), se confirmó que a nivel tisular, se lograban concentraciones bactericidas en tejidos clave (v.g. pulmón), a través de observaciones en los bioensayos realizados en ratón, desafiados con *Pasteurella multocida* tipo A. patógena, donde los animales tratados con la CQMEPCA adquiriendo un 100% de protección, confirmada por la ausencia de mortalidad (Ovalle, 1996). Asimismo, se ha trabajado con vacas, perros, becerros, bovinos y aves, donde se ha observado una notable eficacia de estos fármacos (Santamaria, 1997, Ocampo y Sumano, 1998; Sumano et al., 1998).

Farmacocinética

Para continuar con el proceso de desarrollo e investigación de la molécula CQMEPCA, fue necesario realizar estudios *in vivo*, desafiando a la CQMEPCA, dado que en caso de encontrar efectos *in vitro* que no corresponden a lo observado *in vivo*, no es ajeno a la farmacología. Se medicaron vía intravenosa, con cefaquinolona a ratones, que posteriormente se inocularon con *Pasteurella multocida*, se realizaron muestreos sanguíneos a diferentes tiempos para determinar la cinética de desaparición plasmática vs. tiempo, mediante el método de Bennet et al., 1966. Dicho ensayo mostró que a las 2 horas de sangrado, la media del halo de inhibición fue de una concentración plasmática equivalente a menos de $0.01 \mu\text{g ml}^{-1}$ ⁸

Dado que la CQMEPCA mostró, que en los ensayos *in vitro* tenía una eficacia antibacteriana excepcional, y en virtud de los ensayos de desafío en ratones, así como la bioseguridad en ratones, se consideraron puntos de apoyo para llevar a cabo ensayos que definieran la farmacocinética del compuesto en perros. También mediante el análisis bacteriológico-cuantitativo diseñado por Bennet et al., 1966; Ovalle, 1996,

⁷. Bactericida: Mata a la bacteria

⁸ Premio CANIFARMA a tecnología farmacéutica, 1995.

Sumano et al., 1998, encontrando que la relación entre concentración y tiempo de la CQMEPCA se ajustó mejor a un modelo de dos compartimentos, con un volumen de distribución aparente del compartimento de 2.5 l kg^{-1} y un volumen de distribución aparente en el estado estable notablemente elevado de 4.03 l kg^{-1} y una vida de eliminación de 2 horas. Se lograron concentraciones plasmáticas bactericidas por unas cuantas horas únicamente, pero las concentraciones tisulares se predijeron como muy elevadas durante un mínimo de 6 horas, especulando que un intervalo de dosificación de 8 horas sería eficaz en la mayoría de las infecciones bacterianas que cubren el espectro de este antibacteriano (Ovalle, 1996).

En otro ensayo farmacocinético en perros con afecciones pulmonares bacterianas, medicadas con CQMEPCA, (Sumano et al., 1998), utilizando el mismo método de análisis bacteriológico-cuantitativo diseñado por Bennet et al., 1966, encontraron que, de acuerdo con el rango de la constante eliminación rápida se sugiere tener un intervalo de dosificación menor de 12 horas en estos casos clínicos. Asimismo, se encontró un volumen de distribución muy grande (7.1 l kg^{-1}). Los ensayos llevados a cabo mediante la farmacocinética, han sido realizados por la técnica microbiológica de Bennet et al., 1966, la cual solo detecta la fracción farmacológicamente activa y no está diseñado para contabilizar las fracciones sin actividad biológica, brindando así una visión parcial del destino de los antimicrobianos en el organismo.

Dentro del desarrollo de un medicamento, se requiere la elaboración de pruebas farmacocinéticas en organismos sanos, a fin de conocer con exactitud el destino del medicamento en el organismo problema (Adams, 1995). De tal suerte, es necesario llevar a cabo estudios de bioacumulación en este sentido en cada una de las especies a las que se les habrá de aplicar.

Perspectiva de trabajo

Para que una compañía farmacéutica, pretenda comercializar un compuesto en EE UU, debe proporcionar a la FDA (Administración de Drogas en el Alimento) una técnica analítica, generalmente por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Esto se hace con el fin de poder hacer un seguimiento de la incidencia de residuos y verificar otras pruebas cinéticas (Sundolf et al ,1986; Craigmill et al.,1994, Crawford y Franco, 1994)

Cromatografía

La cromatografía comprende un grupo de métodos de separación variado que permite separar, identificar y determinar compuestos afines en mezcla que no podrían separarse de otra manera. Es una técnica de separación basada en la diferente velocidad con la que se mueven los componentes de una mezcla a través de una fase estacionaria, mediante el flujo de una fase móvil. El éxito depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir el tipo de columna, su contenido, la fase móvil, la longitud, la presión, condiciones electroquímicas de la columna, y la velocidad de flujo de la fase móvil, etc. (DiCesare et al., 1996)

La migración diferencial en el HPLC es el resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna, y al salir de ésta, se conducen por la fase móvil hacia un detector, y en el orden que emergen, se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma que resulta, nos muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico, por lo que este tiempo se emplea para identificar el compuesto previamente comparándolos con los estándares que se estén utilizando. El tiempo de retención se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo pico en el cromatograma (DiCesare et al , 1996).

MATERIAL Y METODO

fase *in vitro*:

Se prepararon 100 ml de agar caldo infusión cerebro corazón (CICC) según especificaciones del producto los cuales se esterilizaron en un autoclave (con una temperatura de 121°C, con una presión de 15 libras durante 15 minutos) Se dejó enfriar a medio ambiente hasta que bajó a una temperatura de 40°C, se prepararon 3 cajas petri en las cuales se vaciaron aproximadamente 30 ml del medio, dentro de un cuarto de vaciado para evitar contaminación de las cajas. Posteriormente se sembró la bacteria en estudio que en este caso fue *Vibrio alginolyticus* (Analytical Profile, 1986) por medio de la técnica de estrias, se incubaron por 24 horas a 30°C en una estufa, para utilizarlas posteriormente (cultivo de 24 horas de incubación).

Se utilizó un refractario cuadrado tipo Pyrex el cual se lavó con agua y jabón, se secó con alcohol y se selló con dos capas de plástico de silicón (ega-pack), se envolvió con papel, y se esterilizó en autoclave a 121°C/15lbs/15minutos.

Se prepararon 210 ml de agar caldo infusión cerebro corazón (CICC) según especificaciones del producto, y se llevó al punto de ebullición hasta que el medio quedó totalmente transparente (sin grumos). Posteriormente se vaciaron 200 ml del agar (hirviendo) de CICC en una probeta calibrada y después se vació en un frasco de vidrio con tapón de aluminio, el agar restante se introdujo en 3 tubos de ensayo con una capacidad de 10 ml, los cuales fueron llenados de 3 a 5 ml de CICC. Se introdujeron los medios de (CICC) para su esterilización en un autoclave a 121°C/15 libras/15 minutos.

Del cultivo obtenido con anterioridad se tomo una asada de la bacteria *Vibrio alginolyticus* y se introdujo en uno de los tubos preparados con CICC y se estandarizó la concentración de bacterias con un espectrofotómetro de Bausch & Lomb hasta alcanzar una lectura de 0.1 de absorbancia, a 530 nanometros (onda de luz visible).

Una vez esterilizados los refractarios se quitó el papel, junto a los mecheros de Bunsen. (Esta operación se llevo acabo en un cuarto cerrado para evitar las corrientes de

aire y contaminación), al refractario se le quito el plástico y se vertió el agar CICC (200 ml), después con el mechero se procedió a quitar las posibles burbujas de aire presentes en la superficie del agar vertido, se tapó nuevamente con el plástico y se esperó a que solidificara el agar en una superficie plana, durante una hora aproximadamente a una temperatura ambiente, una vez que solidificó el medio, se le agregó 200 ml de la solución bacteriana leída en el espectrofotómetro, posteriormente con un isopo se procedió a dispersar homogéneamente todas la solución bacteriana en la superficie del agar, una vez terminado este procedimiento se hicieron perforaciones equidistantes (una de otra) con un sacabocados de 0.5 cm de diámetro⁹, utilizándose un diagrama de perforaciones debajo del refractario (Beishir, 1977)

Para la preparación del antibiótico se hicieron las siguientes diluciones de los antibióticos a estudiar 6.85 mg kg⁻¹ de CQMEPCA, enrofloxacin y tianfenicol los cuales se disolvieron en 100 ml de agua destilada, de esa solución se tomó 1 ml y se llevó a 10 ml de agua destilada (para tener la disolución mencionada anteriormente del antibiótico).

⁹La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos reconoce dos métodos generales para la evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos: el método de difusión en agar y el turbidimétrico (cfr Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Sexta edición. 1994 P 49). Estos dos métodos generales son reconocidos también en recientes ediciones de las Farmacopeas de los Estados Unidos (cfr U.S. Pharmacopoeia USP 23 National Formulary NF 18. United Pharmacopoeia Convention Inc. 1994 P 1690) e Inglaterra (cfr British Pharmacopoeia 1993. p. A167)

El método de difusión en agar es la técnica que se utiliza más comunmente (cfr. Pelzcar, M. J. Jr. Microbiology. Fifth edition. McGraw-Hill, New York, 1986. p.536; Tortora, G.J., Funke, Berdell, R. Y Case, Christine, L. Introducción a la Microbiología. Tercera edición. Traducción de Rafael R. Anglada. Acribia, Zaragoza, 1993. p. 494) y se fundamenta en la difusión del compuesto a evaluar desde un punto de aplicación a través de una superficie de agar inoculado con el microorganismo de prueba. A partir del disco se origina un gradiente de concentración del compuesto en el medio. Si el compuesto tiene propiedades antibacterianas contra ese microorganismo originará zonas de inhibición del crecimiento del microorganismo.

El tamaño de la zona de inhibición está relacionada con la concentración del compuesto (cfr. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Ob cit. p. 79 y Jawetz, Ernest y Melnick, Joseph L. Manual de Microbiología Médica. Manual Moderno, México, D.F., 1981. p.116)

Dentro de los métodos de difusión en agar destacan tres variantes distinguiéndose por la forma en que se hace la aplicación del compuesto en el medio de cultivo. El que se emplea con más frecuencia utiliza disco de papel filtro. Otro método empleado es el de cilindros de acero con medidas estandarizadas y una tercera variante implica hacer perforaciones en el medio de cultivo (pozos) en donde se coloca el compuesto a evaluar (cfr Manual de Medios de Cultivo Merck. 1994. p 47).

Posteriormente en un tubo de ensayo se vertió la solución obtenida en nueve tubos con tapón de rosca se tenía 1 ml de solución salina estéril, y del tubo madre se tomo un mililitro de solución bacteriana y se paso a los tubos con solución salina es decir del primero al segundo del segundo al tercero y del tercero al cuarto hasta llegar al noveno tubo (El mismo procedimiento se llevó acabo con cada uno de los medicamentos)

Con una micropipeta esterilizada se tomaron 100 μl de cada solución, de los tubos del 6 al 10 los cuales tenían las concentraciones siguientes: 2.14 mg ml^{-1} , 1.07 mg ml^{-1} , 0.535 mg ml^{-1} , 0.2675 mg ml^{-1} y 0.1337 mg ml^{-1} respectivamente (todas las concentraciones fueron las mismas para cada fármaco) se utilizó una puntilla diferente en cada ocasión y se vertió a los pozos hechos con anterioridad en el refractario, posteriormente se identificaron los pozos en el refractario y en una hoja de papel se hizo un diagrama de la colocación de los antibióticos en cada pozo, se dejo a temperatura ambiente durante 24 horas y cada operación se llevó acabo tres veces con cada fármaco, después realizaron las lecturas de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano obtenidos con un vernier. El manejo estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza de doble entrada, una prueba de tuckey y los resultados obtenidos se procesaran mediante el programa de stat graphy (Liman, 1993)

MATERIAL Y METODO

Farmacocinética (residuos)

Obtención de organismos

Los organismos que se utilizaron en este experimento fueron donados por el "Centro Acuicola Zacatepec y El Rodeo" ubicado en el estado de Morelos.

Se utilizaron 70 peces, tilapia *Oreochromis* sp. con un peso promedio de 100g \pm 5 g, clínicamente sanos. La fase experimental se llevó a cabo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en el Area de Acuicultura perteneciente al Departamento de Especies no Tradicionales

Durante el estudio los peces fueron mantenidos en tinas de 540 litros con una previa dechloración del agua, aireación constante y temperatura ambiental del agua que oscilo entre 19 y 23° C, posteriormente fueron introducidos en acuarios de cristal de 60 litros con las mismas condiciones mencionadas anteriormente y la densidad de los organismos en cada acuario de cristal fue de tres individuos, estos organismos se mantuvieron en los acuarios una semana para aclimatación previa, posterior al tratamiento (Bowser et al., 1992).

Se formaron aleatoriamente 2 grupos de 35 organismos, a su vez estos 35 organismos fueron divididos en 7 subgrupos con 5 peces cada subgrupo, a los cuales se les administró una dosis única de CQMEPCA en la región caudal vía intramuscular de 5 mg kg⁻¹ y 10 mg kg⁻¹ para cada grupo al mismo tiempo. La inyección fue de un volumen aproximado de 0.5 ml/pez con jeringas de insulina¹⁰.

La cefaquinolona que se utilizó fue una solución *in situ* de CQMEPCA (5g y 10g) y un diluyente de NaOH al 5% y agua destilada c.b.p. 100ml con un pH de 12 y una pureza del 98.66%. La cefaquinolona fue proporcionada por Laboratorios Aranda Lote No. 1308

¹⁰ Jeringa B-DPLASTIPAK* 1 ml, con aguja 29X13mm, Becton Dickinson & Co 1 Becton Drive de México

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

El primer grupo de organismos (35) al ser divididos en 7 grupos con cinco peces y tratados con el fármaco CQMEPCA a la concentración baja de 5 mg kg^{-1} fueron sacrificados macerando el cerebro. Cada 5 peces fueron sacrificados en los tiempos mencionados a continuación: 1, 2, 4, 12, 24, 48 y 72 h. A estos organismos se les extrajo el hígado bazo y riñón. Los órganos obtenidos fueron guardados en bolsas de plástico transparente (10X15 5cm), todos los órganos iguales se colocaron en una sola bolsa, etiquetados previamente y llevado a congelación a -4°C hasta su determinación analítica. El segundo grupo de organismos también fue tratado con el fármaco CQMEPCA a la concentración alta de 10 mg kg^{-1} y fue sometido al mismo procedimiento que el grupo anterior de organismos (Bowser et al., 1992; Samuelsen et al., 1997; Stoffregen et al., 1997).

La fase analítica se realizó en los Laboratorios Aranda, ubicados en San Martín de Porres # 105, Fraccionamiento Industrial Carrillo Puerto, Querétaro, Querétaro describiéndose a continuación.

Equipo de cromatografía

Se utilizó un equipo de cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) 1050 Hewlet Packard, un detector con luz ultravioleta con lámpara de deuterio con 512 diodos de longitud de onda variable marca Hewlet Packard, bomba cuaternaria e inyector automático. Un integrador HP3396 serie II, una columna de fase inversa, Columna uBondapak C18 125 A° $10\mu\text{m}$ de $3.9 \times 150\text{mm}$ HPLC Waters¹¹.

Condiciones del HPLC:

Bomba: Gradiente Metanol:40/Buffer:60 de fosfato de amonio dibásico pH 3.5, 0.04M

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

Tiempo 12 minutos.
 Inyector Volumen de inyección de 20µl
 Tiempo 12 minutos
 Detector: Longitud de onda: 280nm. (280 nm BW 32 REF 450nm BW 32).
 Tiempo 12 minutos.
 Integrador. ZERO = 0
 ATT = 6
 CHT SP = 0.5
 AR REJ = 10 000
 THRSH = 4
 PK = 0.04
 TIME 0 INT 8

La espectrofotometría se realizó en un espectrofotómetro marca Varian, modelo Caryle, (scan) U.V. Visible
 Condiciones del espectrofotómetro.
 Lámpara ultravioleta (250nm a 350nm), Threshold: 0.0200.

Procedimiento.

Estándar:

Se pesaron aproximadamente 50 mg de CQMEPCA, disolviéndose en 2.0 ml de $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ el cual tiene una concentración igual a 0.04 m, posteriormente se ajustó el pH a 10 con hidróxido de amonio, y se agitó hasta conseguir la dilución completa. Se aforó a 50 ml en un matraz volumétrico con una mezcla de agua acetonitrilo 1:1 grado HPLC y se agitó. Se tomó una alícuota de 1 ml y se adicionó a un segundo matraz volumétrico de 25 ml y se aforó con una mezcla de metanol: $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ teniendo una concentración de 0.04 m, y se ajustó el pH a 3.5 con ácido acético glacial, 1:1 grado HPLC.

Para el HPLC:

Se tomaron 2 ml con una jeringa¹² y se filtraron con el acrodisc de nylon 0.45 µm directamente a un vial de 2 ml y se inyectaron al HPLC bajo las condiciones

¹² PLASTIPAK 10 ml. con aguja 21X32mm. Becton Dickinson de México.

anteriormente descritas, estas especificaciones se establecieron previamente en el estándar. Véase cromatograma, se determinó la media del área y tiempo de retención de CQMEPCA con base al estándar.

Para el espectrofotómetro:

Se tomó una alícuota de 1 ml del segundo matraz (ver estándar) y se adicionó a un tercer matraz volumétrico¹³ de 10 ml, este se aforó con una mezcla de metanol: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ teniendo una concentración de 0.04 mol l^{-1} , y se ajustó el pH a 3.5 con ácido acético glacial, 1:1 grado HPLC; de esta solución se tomaron 2 ml que se colocaron en una celda de 1.0 cm, posteriormente se leyó la muestra en el espectrofotómetro bajo las condiciones anteriormente descritas, y se establecieron las condiciones del estándar; determinándose la región ultravioleta y la absorbancia de la solución analizada. La muestra de CQMEPCA se disolvió en buffer de fosfato de amonio con un pH de 10 y se trató con agua/acetonitrilo y buffer de fosfato de amonio¹⁴ con un pH de 3.5 y 0.04 mol l^{-1} /Metanol hasta que llegó a una concentración de 0.04 mg/ml .

Muestra de órganos

Se descongelaron los órganos y se hizo un pool con los cinco órganos obtenidos de los organismos (hígado, bazo, riñón) y estos fueron macerados con la fase móvil de la CQMEPCA que en este caso fue con ácido tricloroacético al 10% (ATCA), la relación fue 1 g de órgano por un ml de la fase móvil, y se maceraron perfectamente en un mortero.

Para la absorbancia:

Se tomó un volumen de 2 ml de la solución anterior y se vació a una celda de 1.0 cm^3 , y las condiciones del espectrofotómetro fueron como anteriormente se

¹³El material de cristalería que se utilizó es marca Pyrex® México.

¹⁴Todos los reactivos que se utilizaron son de Laboratorios J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V. Phillipsburg, USA. ó Xalostoc, México

mencionaron, con base en esto se determino la región ultravioleta de la absorbancia de la solución que se utilizó, la cual fue de $280 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$.

Preparación previa:

Se utilizó el suero obtenido de la maceración del pool de los órganos y se aforó a un ml con $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.04 mol l^{-1} , con un pH de 3.5/ CH_3OH 1:1 posteriormente se adicionó 0.5 ml de CCl_3COOH al 10 %, la solución se agitó vigorosamente durante 30 segundos dejándose reposar durante un minuto, después se centrifugó la muestra a 7000 rpm durante 10 minutos.

La fracción superior (sobrenadante) es el filtrado libre de proteínas y la fracción inferior (pastilla) son proteínas plasmáticas

Filtrado libre de proteínas

Se separó todo el sobrenadante con la ayuda de una pipeta pasteur aforándose con una mezcla de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ con un pH de 3.5, 0.04 mol l^{-1} , 1:1 grado HPLC. Para el HPLC se tomó de esta solución 1 ml con una jeringa y se filtró con un filtro de acrodis nylon de $0.45 \mu\text{m}$, se vertió en un vial de 2 ml, se inyectó 3 veces cada muestra; y se determinó la media del área de retención de CQMEPCA con base en el tiempo de retención del estándar. Las condiciones de HPLC fueron las mismas que anteriormente se mencionaron.

Proteínas plasmáticas:

A la fracción que se precipitó, se le adicionó 0.5 ml de trietilamina al 6% en metanol, se agitó y se removió constantemente con la ayuda de una espátula, para que la trietilamina penetrara en los espacios intermoleculares de las proteínas, después se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se separó la fracción superior (sobrenadante) y se desecho con la ayuda de una pipeta pasteur; el precipitado corresponde a las proteínas. Se introdujo en el matraz donde se encuentran las proteínas

0.5 ml de trietilamina al 6% en metanol y se removió constantemente con la ayuda de una espátula para que la trietilamina penetre en los espacios intermoleculares de las proteínas y se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos. Después se separó la fracción superior (sobrenadante) y se vació a un matraz volumétrico de 10 ml, con la ayuda de una pipeta pasteur. Se aforó a 10 ml con una mezcla de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ con un pH de 3.5, 0.04M, CH_3OH 1:1 grado HPLC.

Para HPLC se tomó 1 ml de la solución anterior con una jeringa¹⁵ de 5 ml y se filtró con un filtro acrodis de nylon de 0.45 μm y esta mezcla se vertió a un vial de 2 ml; se inyectaron tres veces cada muestra, después se determinó la media del área de retención de CQMEPCA con base en el tiempo de retención del estándar. Las condiciones del HPLC fueron las mismas que se mencionaron.

¹⁵ PLASTIPAK 5 ml. con aguja 21X32mm. Becton Dickinson de México.

RESULTADOS

Fase *in vitro*

La comparación que se hizo de los antibióticos enrofloxacin y cefquinolona para inhibir el crecimiento de la bacteria *Vibrio alginolyticus* nos da una idea aproximada sobre la potencia antimicrobiana de estos. No obstante, esta comparación no puede ser muy exacta ya que la respuesta del microorganismo a los diferentes compuestos en el método de difusión de pozos en agar depende también de las propiedades de difusión de las diferentes sustancias, ya que la enrofloxacin es una molécula mucho más pequeña que la cefquinolona debido a que la conformación de este antibiótico esta dada por una molécula de enrofloxacin y una de cefalosporina.

La medición antibacteriana mediante el método de pozos en agar, tales como los utilizados en este estudio, proporcionan una primera información sobre la posible actividad antibacteriana de nuevos compuestos como es el caso de la cefquinolona. Los resultados obtenidos sirven como un criterio válido para posteriores estudios *in vitro* seguidos de estudios *in vivo* para finalmente decidir si se trata de compuestos con uso terapéutico en especies acuáticas como es el caso de los peces (Medina, 1998)

En la tabla 1, se muestran sólo dos de los tres antibióticos que originalmente se

Tratamientos. Diluciones.	Halos Promedio	Halos N	Halos Std.Dv.
Enrofloxacin	2.9	15	0.422577
2.14	3.5	3	0.1
1.07	3.2	3	0.1
0.535	2.8	3	0.1
0.26	2.6	3	0.1
0.13	2.4	3	0.1
Cefquinolona	1.238	15	0.901429
2.14	2.6	3	0.1
1.07	1.666	3	0.057735
0.535	1.1233	3	0.005774
0.26	0.8	3	0.1
0.13	0	3	0
Total	2.069	30	1.09218

Tabla 1. Respuesta de la eficacia de Enrofloxacin y Cefquinolona (CQMEPCA) contra *V. alginolyticus* en cinco diferentes diluciones

estudiarían en este experimento, debido a que la bacteria resultó ser resistente al tianfenicol por lo tanto no presentó halos de inhibición con ninguna de las 5 diluciones a estudiar. Enrofloxacin presentó mayor promedio en los halos de inhibición que cefquinolona por ejemplo con la dilución más alta que fue la de 2.14 mg ml⁻¹ enrofloxacin tuvo un promedio de halos de inhibición de 3.5 µg ml⁻¹, mientras que la cefquinolona con la misma concentración obtuvo un promedio de halos de inhibición de 2.6 µg ml⁻¹; si se comparan las concentraciones más bajas de los antibióticos se observa que la enrofloxacin con una dilución de 0.13 mg ml⁻¹ obtiene un halo de inhibición de 2.4 µg ml⁻¹ y la cefquinolona con la misma concentración obtiene un promedio de halos de inhibición de 0.0 µg ml⁻¹. A una concentración de 0.13 mg ml⁻¹ la cefquinolona ya llegó a su concentración mínima inhibitoria mientras que enrofloxacin sigue teniendo efectividad a esta concentración contra *Vibrio alginolyticus* (Tabla 2).

Antibacterianos	Diluciones (mg ml ⁻¹)	CMI (µg ml ⁻¹)
Enrofloxacin	0.13	2.4
Cefquinolona	0.13	0.0
Tianfenicol	Susceptible	Susceptible

Tabla. 2. Resultados de la inhibición de Enrofloxacin y Cefquinolona (CQMEPCA) contra *Vibrio alginolyticus* en cinco diferentes diluciones.

En la figura 6, se observa claramente que a medida que la concentración del medicamento es menor la pendiente de la enrofloxacin va bajando poco a poco, mientras que la pendiente de la CQMEPCA desciende mucho más rápidamente.

Se piensa que esto ocurre debido a que la molécula de CQMEPCA esta formada por una fluoroquinolona y una cefquinolona por lo tanto tiende a ser más grande que la molécula de enrofloxacin, por lo tanto la CQMEPCA contrarresta con menor eficacia el crecimiento del *Vibrio alginolyticus*

Promedio de halos de inhibición en dos tratamientos y diluciones dobles seriadas
 $F(4,20)=59.35; p<.0000$

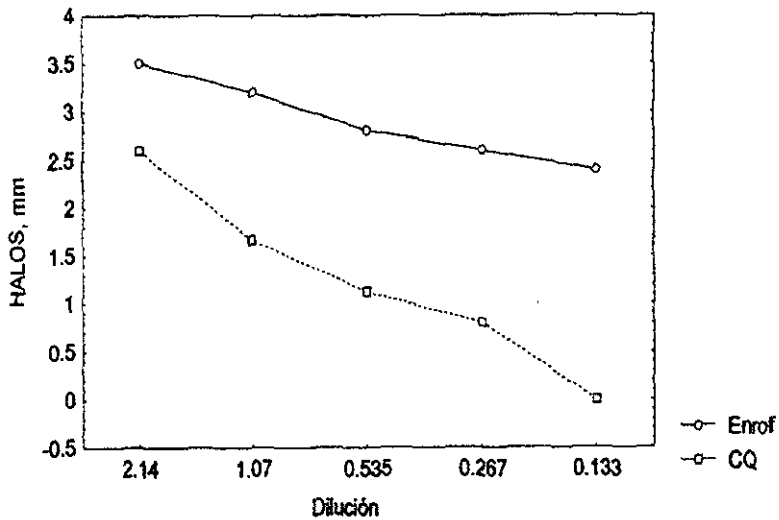


Figura 6. Interacciones existentes entre los medicamentos (enrofloxacin y cefquinolona) en relación a la presencia de *Vibrio alginolyticus*

En la figura 7 se compararon los promedios de los halos de inhibición que se obtuvieron con los dos fármacos a estudiar la enrofloxacin y la cefquinolona con la misma concentración de estos para cada uno, mostrando la diferencia que existe con los promedios de los halos obtenidos.

Se tiene del lado derecho las medias de los halos de inhibición de la enrofloxacin y del lado izquierdo los halos de inhibición de la CQMEPCA, observándose que en el grupo de medias de enrofloxacin si existen diferencias significativas, las cuales están marcadas con letras diferentes y que corresponden a las ultimas tres diluciones que se realizaron, por otro lado si se comparan las concentraciones de cefquinolona, solamente la primera dilución presenta diferencias significativas con respecto de las demás incluyendo las concentraciones de enrofloxacin, esto se corrobora primero con la prueba de Tukey con ($p < 0.05$). En los demás tratamiento no hubo diferencias (Tabla 3).

En la figura 8 se ve a simple vista la diferencia que existe primordialmente entre los dos fármacos con una misma dilución y a medida que la dilución tiende a ser menor la diferencia es mayor de enrofloxacin con respecto a la CQMEPCA en el tamaño del halo de inhibición; y estadísticamente también presenta diferencias significativas (Tabla 3).

Promedio de halos de inhibición entre tratamientos y diluciones de antibióticos

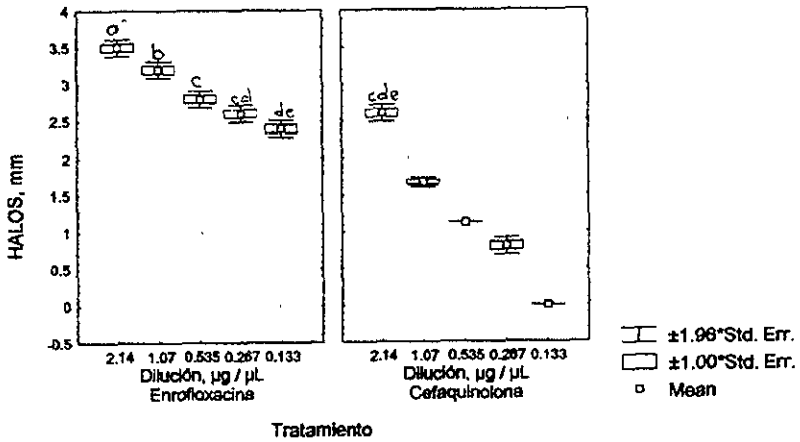


Figura 7. Promedios de los halos de inhibición de enrofloxacina y cefquinolona en presencia de *Vibrio alginolyticus*

STAT. GENERAL MANOVA		Tukey HSD test: variable HALOS (heics2.sta)									
		Probabilities for Post-Hoc Tests									
		INTERACTION: 1 x 2									
TRAT	DILUC	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
		3.500000	3.200000	2.800000	2.600000	2.400000	2.600000	1.666667	1.123333	.800000	0.000000
1	1 (1)		.010395*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*
1	2 (2)	.010395*		.000589*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*
1	3 (3)	.000179*	.000589*		.182074	.000589*	.182074	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*
1	4 (4)	.000179*	.000179*	.182074		.182074	1.000000	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*
1	5 (5)	.000179*	.000179*	.000589*	.182074		.182074	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*
2	1 (6)	.000179*	.000179*	.182074	1.000000	.182074		.000188*	.000179*	.000179*	.000179*
2	2 (7)	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*		.000188*	.000179*	.000179*
2	3 (8)	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000188*		.000179*	.000179*
2	4 (9)	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000188*		.000179*
2	5 (10)	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000179*	.000188*	

Tabla 3. Muestra las diferencias entre los halos de inhibición de enrofloxacin y cefquinolona (CQMEPCA)

Tratamientos 1: Enrofloxacin.
 Tratamiento 2: Cefquinolona.

1, 2, 3, 4, 5,
 6, 7, 8, 9, 10.

Promedios de halos
 de inhibición.

Diluciones.

2.14
 1.07
 0.535
 0.26
 0.13

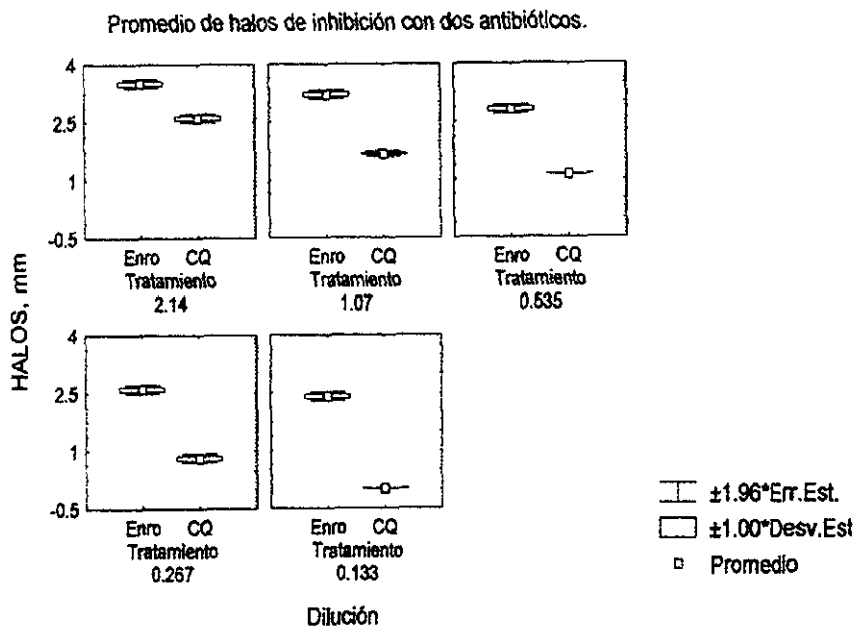


Figura 8. Diferencia de promedios de halos de inhibición entre tratamientos, a distintas diluciones en presencia de *Vibrio alginolyticus*

RESULTADOS

Farmacocinética (residuos)

Obtención del peso de los órganos

Los 70 peces tilapia (*Oreochromis* sp) después de haber sido sacrificados a diferentes tiempos posteriores a la administración de CQEMPCA, se obtuvieron y se pesaron los órganos que interesaron para esta investigación y que en este caso fueron hígado, bazo y riñón (Tabla 4), todos los pesos obtenidos de los órganos hígado, bazo y riñón en estudio no fueron homogéneos entre sí, tampoco dentro de la misma dosificación (5 mg kg^{-1}); lo mismo sucedió con la segunda dosificación (10 mg kg^{-1}) en estudio (Tablas 4 y 5).

Tiempo de sacrificio	Dosis en 5 mg kg^{-1}		
	Peso de órganos de peces en g		
	Hígado	Bazo	Riñón
2 horas	2.29	0.73	0.082
2 horas	2.27	0.23	0.095
4 horas	3.01	0.61	0.136
12 horas	4.51	0.31	0.071
24 horas	1.73	0.71	0.167
48 horas	1.64	0.27	0.042
72 horas	3.31	0.33	0.037

Tabla 4. Peso de los órganos del primer grupo de 35 peces tilapia *Oreochromis* sp. después de la inyección de CQMEPCA.

Tiempo de sacrificio	Dosis 10 mg kg^{-1}		
	Peso de órganos de peces en g		
	Hígado	Bazo	Riñón
1 hora	7.81	0.38	0.062
2 horas	7.43	0.33	0.073
4 horas	5.31	0.86	0.132
12 horas	3.63	0.18	0.085
24 horas	5.81	0.14	0.062
48 horas	4.64	0.39	0.054
72 horas	4.23	0.29	0.046

Tabla 5. Peso de los órganos del segundo grupo de 35 peces tilapia *Oreochromis* sp. después de la inyección de CQMEPCA.

Análisis del Estándar de la CQEMPCA

En el análisis por absorbancia de los precursores se encontró que para enrofloxacina se obtuvo en el corte espectral una absorbancia máxima de 279.0 nm y para el precursor 7-ACA (cefalosporina) una absorbancia de 264.0 nm y para la absorbancia de interés que en este caso fue CQEMPCA se encontró en el corte espectral presenta una absorbancia máxima de 279.0 nm (ver anexo, figura 9)

El análisis del cromatograma se realizó comparado con el pico que se retuvo de CQMEPCA a los 2 77 minutos aproximadamente y con el pico que presenta tiempo de retención de 4 822 minutos (ver anexo, figura 10). Este resultado se comparó con los precursores de la molécula: enrofloxacina (ver anexo, figura 11) y 7-ACA (ácido 7-amino cefalosporánico) (ver anexo, figura 12), con un tiempo de retención de 3.45 minutos y 1 50 minutos respectivamente.

El tiempo utilizado para la lectura completa de la muestra de CQEMPCA y sus precursores fue de 10 minutos. El primer pico que se presenta en el cromatograma de los estándares de CQEMPCA tuvo un tiempo de retención de 2.77 minutos los cuales corresponden a impurezas de la reacción (ver anexo, figura 10), principalmente de enrofloxacina. El pico de interés, que corresponde a la CQEMPCA, se presentó a los 4 822 minutos. Así, la sustancia no reaccionante que corresponde a la enrofloxacina equivale al 2.00%. De esta manera, la pureza del compuesto de interés CQEMPCA, es aproximadamente del 98%.

Determinación de la CQMEPCA por absorbancia (U.V. / visible) en el pool de órganos de peces en estudio hígado, bazo y riñón

La determinación de la CQMEPCA en órganos de peces por absorbancia/U.V. no fue visible ya que en el filtrado libre de proteínas solamente se analizaron tres muestras de los órganos en estudio; una de hígado, una de bazo y una de riñón en las cuales no se detectó CQMEPCA, tampoco se detectaron los dos precursores componentes (enrofloxacina y 7-ACA); en ninguna de las dosis en estudio 5 mg kg⁻¹ y

10 mg kg⁻¹ (ver anexo, figura 13) En todas las muestras de órganos de peces se determinaron proteínas plasmáticas y fueron sometidas a la determinación de absorbancia en las cuales no se detectó CQMEPCA, tampoco se detectaron los dos precursores componentes (enrofloxacin y 7-ACA), en ninguna de las dosis en estudio 5 mg kg⁻¹ (Tabla 6) 10 mg kg⁻¹ (Tabla 7).

HORAS	HIGADO		BAZO		RIÑÓN	
	D = 5 mg kg ⁻¹		D = 5 mg kg ⁻¹		D = 5 mg kg ⁻¹	
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
1	-	+	-	-	-	-
2	-	+	-	-	-	-
4	-	+	-	-	-	-
12	-	+	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-

Tabla 6. Muestra la absorbancia (U.V. visible) y HPLC detectada en órganos de peces hígado, bazo y riñón al ser expuestos a la CQMEPCA a una dosis de 5 mg kg⁻¹, a diferentes tiempos.

HORAS	HIGADO		BAZO		RIÑÓN	
	D = 10 mg kg ⁻¹		D = 10 mg kg ⁻¹		D = 10 mg kg ⁻¹	
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
1	-	-	-	+	-	-
2	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	+	-	-
12	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Muestra la absorbancia (U.V. visible) y HPLC detectada en órganos de peces hígado, bazo y riñón al ser expuestos a la CQMEPCA a una dosis de 10 mg kg⁻¹, a diferentes tiempos

En la figura 14 se muestran varios espectros de absorbancia del hígado del pez el cual fue expuesto a una dosis de 5 mg kg⁻¹ de CQMEPCA a varios tiempos y ninguno de los picos resultantes concuerda con el pico de absorbancia del estándar de CQMEPCA (ver anexo, figura 9). Lo mismo ocurrió con todas las demás muestras del

pez que fueron bazo (ver anexo, figura 15) y riñón (ver anexo, figura 16) las cuales fueron expuestas igual que el hígado a esta concentración, la absorbancia que se muestra en la figura 17 del hígado del pez al igual que la muestra anterior fue expuesta a una concentración de CQMEPCA pero esta fue de 10 mg kg^{-1} y los picos que presenta en los diferentes tiempos no concuerdan con el estándar de la CQMEPCA (ver anexo, figura 9), lo mismo ocurrió con los otros dos órganos en estudio bazo (ver anexo, figura 18) y riñón (ver anexo, figura 19).

Determinación de la CQMEPCA por HPLC en proteínas plasmáticas de las muestras de órganos de peces

En la determinación de CQMEPCA en proteínas plasmáticas por HPLC se observó que en la mezcla obtenida de hígado de los peces expuestos a una concentración de 5 mg kg^{-1} de CQMEPCA, el tiempo de retención de la cefaquinolona esta entre 1, 2, 4 y 12 horas y para las siguientes horas en las cuales el órgano estuvo expuesto al medicamento no se encontraron residuos (ver anexo, figura 20), en esta gráfica solamente se muestra la primera lectura del HPLC que fue a la primera hora, las otras lecturas no se muestran debido a que son similares; en este cromatograma se muestran primeramente dos picos que pueden ser impurezas del medicamento u otros metabolitos, el tercer pico corresponden al precursor del 7-ACA y la siguiente lectura corresponde a la CQMEPCA ya que esta concuerda con el tiempo de retención del estándar de este medicamento. En la tabla 8 se muestran tanto las lecturas del corte

HIGADO = 5 mg kg^{-1}						
HORAS	ACA		ENROFLOXACINA		CQMEPCA	
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
1	+	+	-	-	-	+
2	+	+	-	-	-	+
4	+	+	-	-	-	+
12	+	+	-	-	-	+
24	+	+	-	-	-	-
48	+	+	-	-	-	-
72	+	+	-	-	-	-

Tabla 8 Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de los dos precursores en hígado de peces a una dosificación de 5 mg kg^{-1} , en U.V. visible y HPLC

espectral como del HPLC en hígado a una concentración de 5 mg kg^{-1} en las cuales ACA resultó positivo (presente en la muestra) para U.V y para HPLC, mientras que enrofloxacin resultó negativo (ausente en las muestras) para ambos y para CQMEPCA (cefaquinolona) resultó negativo en el corte espectral y positivo en el HPLC en las primeras cuatro lecturas.

Al realizar la determinación de CQMEPCA en proteínas plasmáticas para la mezcla obtenida del bazo a una concentración de 5 mg kg^{-1} del medicamento, no se obtuvo ninguna pico en el HPLC sobre los residuos de la cefalosporina en estudio a ninguna hora de las lecturas (ver anexo, figura 21), tampoco se observan residuos de los precursores, los picos que se observan en los cromatogramas pueden ser impurezas u otros metabolitos presentes en la muestra en estudio. En la tabla 9 se muestra las lecturas del corte espectral como del HPLC en bazo a una concentración de 5 mg kg^{-1} , en las cuales ACA resultó positivo (presente en la muestra) para U.V y para

BAZO = 5 mg kg^{-1}						
HORAS	ACA		ENROFLOXACINA		CQMEPCA	
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-
48	+	-	-	-	-	-
72	+	-	-	-	-	-

Tabla 9. Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de los dos precursores en bazo de peces a una dosificación de 5 mg kg^{-1} , en U.V. visible y HPLC.

HPLC resultó negativo (ausentes en las muestras), mientras que enrofloxacin y CQMEPCA (cefaquinolona) también resultaron negativos para ambos.

En las lecturas que se realizaron en el HPLC de la mezcla que se obtuvo del riñón de los peces expuestos a la misma concentración del medicamento ocurrió exactamente lo mismo que en el bazo (ver anexo, figura 22) En la tabla 10 se muestra las lecturas del corte espectral como del HPLC en riñón a una concentración de 5 mg kg^{-1} , en las cuales ACA resultó positivo (presente) para U.V. y para HPLC negativo

(ausente), mientras que enrofloxacin y CQMEPCA (cefaquinolona) también resultaron negativos para ambos.

RINON = 5 mg kg ⁻¹						
HORAS	ACA		ENROFLOXACINA		CQMEPCA	
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-
48	+	-	-	-	-	-
72	+	-	-	-	-	-

Tabla 10. Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de los dos precursores en riñón de peces a una dosificación de 5 mg kg⁻¹, en U.V. visible y HPLC.

La determinación mediante HPLC que se realizó en la mezcla que se obtuvo al procesar las muestras de hígado de peces las cuales estuvieron expuestas a una concentración de 10 mg kg⁻¹; no se observó ningún pico correspondiente a los estándares de la CQMEPCA en ninguna de las siete lecturas correspondientes a las horas del sacrificio de los organismos 1, 2, 4, 12, 24, 48, 72 horas, y solamente se observan los picos de 7-ACA (ver anexo, figura 23). En la tabla 11 se muestra las lecturas del corte espectral como del HPLC en hígado a una concentración de 10 mg kg⁻¹, en las cuales ACA resulto positivo (presente) para U.V. y para

HIGADO = 10 mg kg ⁻¹						
HORAS	ACA		ENROFLOXACINA		CQMEPCA	
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
1	+	+	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-
12	+	+	-	-	-	-
24	+	+	-	-	-	-
48	+	+	-	-	-	-
72	+	+	-	-	-	-

Tabla 11. Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de los dos precursores en hígado de peces a una dosificación de 10 mg kg⁻¹, en U.V. visible y HPLC.

HPLC, mientras que enrofloxacin y CQMEPCA (cefaquinolona) resultaron negativos (ausente) para ambos

Al leer en el HPLC las muestras del bazo de peces que estuvieron expuestas a 10 mg kg^{-1} de CQMEPCA se encontró que el tiempo de retención es a 1, 2 y 4 horas y para las siguientes horas en las cuales el órgano estuvo expuesto al medicamento no se encontraron residuos (ver anexo, figura 24), en esta gráfica solamente se muestra la primera lectura del HPLC que fue a la primera hora, las otras lecturas no se muestran debido a que son similares, en este cromatograma se muestran primeramente cinco picos que pueden ser impurezas del medicamento u otros metabolitos que se encuentra presentes en el medicamento en estudio, y la siguiente lectura corresponde a la CQMEPCA ya que esta concuerda con el tiempo de retención del estándar de este medicamento. En la tabla 12 se muestra las lecturas del corte espectral como del HPLC en bazo a una concentración de 10 mg kg^{-1} , en las cuales ACA resulto positivo (presente) para UV y para HPLC negativo (ausente), mientras que enrofloxacin

BAZO = 10 mg kg^{-1}						
HORAS	ACA		ENROFLOXACINA		CQMEPCA	
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
1	+	-	-	-	-	+
2	+	-	-	-	-	+
4	+	-	-	-	-	+
12	+	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-
48	+	-	-	-	-	-
72	+	-	-	-	-	-

Tabla 12. Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de los dos precursores en bazo de peces a una dosificación de 10 mg kg^{-1} , en U.V. visible y HPLC.

resulto negativo en ambos y para CQMEPCA (cefaquinolona) resultó negativo en el corte espectral y positivo en el HPLC en las primeras tres lecturas.

En la figura 25 se muestra una de las primeras lecturas de muestras del riñón de los peces que igual que las anteriores muestras estuvieron expuestos a una concentración de 10 mg kg^{-1} de CQMEPCA, en estas lecturas realizadas no se observa el medicamento en estudio, tampoco ninguno de los precursores del medicamento,

solamente presenta dos picos que pueden ser impurezas u otro metabolitos del medicamento. En la tabla 13 se muestra las lecturas del corte espectral como del HPLC en riñón a una concentración de 10 mg kg^{-1} , en las cuales ACA resulto positivo (presente) para UV y para HPLC negativo (ausente), mientras que enrofloxacin y CQMEPCA (cefaquinolona) también resultaron negativos para ambas lecturas.

RINON = 10 mg kg^{-1}						
HORAS	ACA		ENROFLOXACINA		CQMEPCA	
	UV	HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-
48	+	-	-	-	-	-
72	+	-	-	-	-	-

Tabla 13. Determinación de la presencia de CQMEPCA y residuos de los dos precursores en riñón de peces a una dosificación de 10 mg kg^{-1} , en UV visible y HPLC.

ANÁLISIS

El principal problema al que se enfrentan los productores es sin duda la presencia de bacterias Gram negativo como es el caso de la familia *Vibrionaceae* en sus cultivos, estos microorganismos son saprofitos y además son parte normal de la flora de los intestinos de peces marinos y de aguas dulces

La predisposición de los organismos que se encuentran en cautiverio a una densidad de carga mayor a la que soportan dichos estanques, tienen pobre calidad de agua, desnutrición, mal manejo y además condiciones de estrés; estos son factores que inmediatamente se verán reflejados en la constitución física del pez, y en su conducta ya que todo inicia con una separación del cardumen, existe un nado lento y empiezan a boquear, esto ocurre cuando son infectados por bacterias Gram negativo las cuales son las principales fuentes de enfermedades en los peces, por ejemplo *Vibrio*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*.

Es importante señalar que la familia *Vibrionaceae* como en el caso de *Vibrio cholerae* produce en humanos una enterotoxina que causa diarrea acuosa profusa que puede conducir con rapidez a la deshidratación y muerte (Jawetz et al., 1996). *Vibrio parahaemolyticus* produce gastroenteritis aguda después de su ingestión en productos marinos contaminados como peces o moluscos crudos, *Vibrio vulnificus* puede causar lesiones cutáneas intensas en personas que han manipulado mariscos u otros animales marinos, y en ocasiones producen enteritis bacteriana y muerte en personas ancianas o debilitadas; *Vibrio mimicus* que produce diarreas después de la ingestión de moluscos crudos, en particular ostiones (ostras); *Vibrio alginolyticus* origina infecciones oculares, auditivas o infecciones de las heridas después de la exposición al agua de mar; *Vibrio damsela* produce también infecciones de las heridas (McNeill, 1979; Roberts, 1982; Espinosa y Labarta, 1988).

Debido a la importancia que tienen estos microorganismos en la economía pesquera se han realizado pruebas *in vitro* para poder buscar una concentración adecuada de medicamentos que evite el crecimiento de dichos microorganismos en el medio

acuatico Se han utilizado farmacos como la enrofloxacin que en concentraciones de 0.005 mg ml^{-1} se ha obtenido una CMI en presencia de *Aeromonas salmonicida* de $0.3 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ y en presencia de *Vibrio* sp de $0.8 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Para prueba con cefalosporina se ha utilizado una concentraci3n de 0.005 mg ml^{-1} obteniendo la CMI en presencia de *Aeromonas salmonicida* de $0.8 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ (Inglis y Richards, 1991). Estos dos medicamentos la enrofloxacin y cefalosporina forman el complejo de la mol3cula a estudiar CQMEPCA. La cantidad de medicamento CQMEPCA que se utiliz3 en el presente trabajo fue de 0.13 mg ml^{-1} para poder obtener un CMI de $0.0 \text{ } \mu\text{l ml}^{-1}$ en presencia de *Vibrio alginolyticus*, esto quiere decir que el complejo de la mol3cula CQMEPCA que esta conformado por enrofloxacin y cefalosporina al estar separados estos dos principios activos sus halos de inhibici3n se presentan con menos concentraci3n del medicamento que cuando est3n unidos para formar la CQMEPCA, pero cabe mencionar que el medicamento CQMEPCA es m3s efectivo *in vivo* que *in vitro* con respecto a enrofloxacin (Garcia , 1997).

Aeromonas salmonicida y *Vibrio anguillarum* fueron contrarrestadas con quinolonas antibacteriales como son difloxacin y sarafloxacin *in vitro* de donde se obtuvo un correspondiente CMI Para *Aeromonas salmonicida* $0.06, 0.12 \text{ mg ml}^{-1}$ y para *Vibrio anguillarum* 0.12 y 0.6 mg ml^{-1} respectivamente. Los mutantes seleccionados con quinolonas generalmente mostraron un bajo nivel de resistencia a los quinolonas. Las diluciones que se utilizaron de difloxacin contra *V. anguillarum* son casi similares a las que se usaron en esta investigaci3n con *V. alginolyticus*, ya que en el experimento se utilizaron 0.13 mg ml^{-1} , a esta diluci3n la enrofloxacin presentaba un halo de inhibici3n de $2.4 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ y la CQMEPCA a esta misma diluci3n ya hab3a alcanzado su CMI de $0.0 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ (Stamm, 1989).

La enrofloxacin es uno de los antibi3ticos m3s usados en enfermedades de peces principalmente las que son causadas por bacterias gram (-) ya sea *in vitro* o *in vivo*.

En estudios recientes (García, 1997) se realizaron experimentos con la tilapia *Oreochromis mossambicus* la cual fue infectada experimentalmente con *Vibrio fluorens*, su tratamiento fue con CQMEPCA, los resultados obtenidos fueron comparados con otros estudios realizados con la terapéutica de enrofloxacin observándose que la mortalidad es mayor en los organismos a los cuales se les suministró enrofloxacin con respecto a los que se dosificaron con CQMEPCA, por lo tanto la enrofloxacin es más efectiva in vitro que in vivo con respecto a CQMEPCA.

La industria farmacéutica invierte continuamente gran cantidad de recursos humanos y económicos para presentar un nuevo fármaco al mercado. Los investigadores en conjunto con la industria realizan un esfuerzo muy grande para este tipo de empresas, porque están convencidos que un nuevo medicamento puede erradicar enfermedades infecciosas que incapacitan y matan, de tal manera que aunque este producto ya se encuentre comercialmente disponible, los esfuerzos e investigaciones continúan para mejorar los beneficios que éste ofrece, evalúan la calidad de vida, los resultados económicos y el costo de mantenerlo a la venta (Billstein, 1994).

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

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

Efectos sobre micoplasma en diferentes especies.

Penetración a tejidos de baja perfusión, como abscesos, grasa, sitios con fibrosis.

Capacidad de penetración intracelular para entidades como la mastitis por *Staphylococcus aureus* forma "L".

Evaluación de formas farmacéuticas que favorezcan su penetración, como por ejemplo con el uso de liposomas y ciclodextrinas.

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

La pureza de la molécula en estudio su pureza es del 98% constatada en el laboratorio¹⁶. Los estándares internacionales de pureza de un principio activo permiten una desviación hasta del 5% (Commission of the European Communities). En el caso de un antimicrobiano una pureza del 98% es comparable a la observada en muchos antimicrobianos como la tetraciclina, florfenicol, y muchos aminoglucósidos (The Merck Index, 1990).

En la fase analítica del experimento, para detectar a la CQMEPCA a través de la absorbancia por U.V-visible, no fue posible encontrar resultados positivos en los órganos en estudio de los peces a ninguna de las concentraciones probadas, probablemente debido a una mala aplicación del fármaco en los organismos o extracción del medicamento, ya que presenta un elevado peso molecular la sustancia analizada y alcanza los 630 daltones, que esto permite que este espectro de luz incida sobre la molécula (Sumano et al., 1998).

El procedimiento que se empleó para cuantificar CQMEPCA en el filtrado libre de proteínas determinó que el valor del fármaco en este caso es nulo debido a que no se presentó en ninguna gráfica obtenida (ver anexo, figura 13). Muchas cefalosporinas de tercera generación muestran una elevada unión a proteínas plasmáticas, por ejemplo el ceftiofur en un 97% (Courtin et al., 1996; Brown et al., 1997) y la ceftriaxona en un

¹⁶ Laboratorios Aranda, San Martín de Porres 105 Fraccionamiento Industrial Carrillo Puerto, Querétaro, Querétaro

96% (Thomson et al., 1984). La CQMEPCA muestra un comportamiento similar a las cefalosporinas de tercera generación en cuanto a la afinidad por las proteínas plasmáticas pero en este experimento no se pudieron detectar por U.V-visible en ninguno de los órganos expuestos (ver anexo, figuras 14, 15, 16, 17, 18 y 19). Debido a lo anterior se sugiere realizar estudios dirigidos a evaluar, si la presencia de otros fármacos como la fenilbutazona u otros antiinflamatorios no esteroideos pueden desplazar a la CQMEPCA en sus sitios de unión a las proteínas plasmáticas y aumentar la proporción del fármaco libre, con la consecuente mejoría de su biodisponibilidad y por ende, el efecto antimicrobiano. Esto ya se ha demostrado para el ceftiofur (Courtin et al., 1996; Brown et al., 1997).

Los cromatogramas realizados con las muestras de órganos de hígado, bazo y riñón los cuales estuvieron expuestos a una concentración de 5 mg kg^{-1} nos muestran lo siguiente: en el cromatograma de hígado se observa la presencia de CQMEPCA en 1, 2, 4, y 12 horas, esto quiere decir que después de este tiempo de medicación a los siguientes tiempos 24, 48 y 72 horas ya no existen residuos del medicamento en este órgano (Tabla 8), (ver anexo, figura 20); en los órganos del pez, bazo y riñón no se encontraron residuos del medicamento (Tabla 9 y 10), (ver anexo, figura 16 y 17 respectivamente).

Entonces la eliminación final de residuos de CQMEPCA en el hígado de tilapia *Oreochromis* sp. fue de 12 horas resultando ser menor en la mayoría de las especies de peces ya reportadas con diferentes antimicrobianos como son en peces bagre (*Ictalurus punctatus*) con una eliminación de residuos finales de 15 horas tratados con gentamicina (Rolf et al., 1986), para sulfadimidina en carpas (*Cyprinus carpio*) con un tiempo de retención de 18 horas (Nouws et al., 1986), cloranfenicol en carpas (*Cyprinus carpio*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con un tiempo de retención de 9 y 10 horas (Grondel et al., 1987a, b), enrofloxacin en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con un tiempo de retención de 27.4 horas (Davidson et al., 1986).

Los cromatogramas obtenidos de los órganos de peces hígado, bazo y riñón los cuales estuvieron expuestos a una concentración de 10 mg kg^{-1} nos muestran lo

siguiente. En el cromatograma de hígado no existen residuos del antibiótico probablemente porque al momento de estar procesando la muestra presentaba gran cantidad de grasa y esto pudo haber interferido para poder extraer las proteínas plasmáticas lo cual no ocurrió con la muestra anterior de hígado la cual fue dosificada a 5mg kg^{-1} debido a esto en esta muestra sí se encontraron residuos (Tabla 4), (ver anexo, figura 23). En las muestras que fueron procesadas de bazo y dosificadas a 10 mg kg^{-1} si se encontraron residuos de CQMEPCA a los siguientes tiempos: 1, 2, y 4 horas esto quiere decir que después de este tiempo de medicación a los siguientes tiempos 12, 24, 48 y 72 horas ya no existen residuos del medicamento en este órgano (Tabla 4) (ver anexo, figura 24), probablemente sí se encontraron residuos de la CQMEPCA por que la dosis fue mayor que en la otra muestra analizada; en el último órgano del pez que se analizó fue el riñón expuesto a una concentración de 10 mg kg^{-1} en el cual no se encontraron residuos del medicamento (Tabla 4), (ver anexo, figura 25) No se pudo comparar el valor obtenido de bazo sobre la retención del medicamento debido a que en ninguna literatura se encuentra citado.

Los metabolitos detectado a través del HPLC la mayoría de los cromatogramas (ver anexo, figuras 20, 21, 22, 23, 24, y 25) presentan un tiempo de retención menor al de 4.822 minutos, que sugiere ser un producto de la biotransformación del CQMEPCA y es posible que se encuentre conjugado con otras moléculas, ya que su tiempo de retención fue superior al del residuo de enrofloxacin 3.45 minutos e inferior al tiempo de retención del compuesto progenitor.

Probablemente uno de los factores que afectó considerablemente el experimento fue el que los pools de órganos no eran del mismo peso ni dentro de la misma dosificación (5 mg kg^{-1} y 10 mg kg^{-1}) ni entre las dosificaciones (Tabla 4 y 5).

Es difícil citar desarrollos farmacéuticos de moléculas diseñadas en el país; estos se debe entre otras cosas, a que esta tarea requiere un inversión millonaria y de 6 a 10 años de investigación. Una vez lograda la síntesis y la caracterización de la sustancia en cuestión, se deberán realizar estudios de farmacocinética en todas las especies en las que se pretenda usar el antimicrobiano (Billstein, 1994) En los Estados Unidos de América,

para entrar al mercado farmacéutico, a fin de llenar los requisitos básicos de eficiencia, calidad farmacéutica, inocuidad para los animales, inocuidad medio-ambiente e inocuidad para el hombre (residuos). El apego a estos requisitos, puede explicar la diferencia que existe entre el número y la variedad de fármacos registrados en el país y los disponibles en los otros dos países miembros del Tratado de Libre Comercio (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura, 1994).

Con datos farmacocinéticos obtenidos y en virtud de la potencia antibacteriana de esta molécula, es factible asegurar que, previo a un diseño de farmacia, para encontrar el mejor vehículo, se puede contar ya con el primer antibiótico de diseño y desarrollo completamente mexicano. En este sentido cabe destacar, que a la fecha del presente trabajo, no se ha generado en México ningún antimicrobiano (tanto para medicina humana como medicina veterinaria) que haya alcanzado este nivel de desarrollo. Es entonces, ésta, una oportunidad para que diversas instituciones coparticipen para la realización de la fase clínica en especies animales y mejor aún en la medicina humana.

De no contar con un sistema de evaluación de registro de medicamentos de igual rigor que el de los países mencionados, se corre el peligro de ser invadidos por productos del extranjero, convirtiendo al país en un campo de pruebas preclínicas, con las evidentes consecuencias para la salud pública y animal. Por otro lado la industria farmacéutica misma, puede enfrentarse a crisis severas como se ha comentado en diversos foros. Por ello resulta impostergable, crear un Centro para la evaluación de residuos farmacológicos, preferentemente a nivel universitario, que, en coordinación con las dependencias reguladoras de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, y desarrollo Rural, la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica, y otras dependencias interesadas, presten asistencia técnica para la regulación del uso de los fármacos, así como para generar la información técnica de dichos medicamentos (Soberón et al., 1994; Sumano y Ocampo, 1995)

CONSIDERACIONES

Fase *in vitro*

Se obtuvo la CMI de la CQMEPCA a una dilución de 0.13 mg ml^{-1} , pero a esta concentración la enrofloxacin todavía presentaba halo de inhibición lo que quiere decir que *Vibrio alginolyticus* es más resistente a la CQMEPCA que a la enrofloxacin

La enrofloxacin tiene mejor eficacia de inhibición contra *Vibrio alginolyticus* con respecto de CQMEPCA

La CQMEPCA presenta mayor eficacia *in vivo* contra *Vibrio alginolyticus* que enrofloxacin

El tianfenicol no presentó eficacia de inhibición en ninguna concentración del medicamento estudiado.

Las fluoroquinolonas representan un mayor avance en el tratamiento de infecciones bacteriales en animales. La característica de esos compuestos presentan un amplio espectro de acción también como un gran volumen de distribución y su uso terapéutico no está restringido por efectos adversos severos; mientras que con respecto a las cefalosporinas su campo de investigación todavía es muy restringido en lo que se refiere a la terapéutica piscícola

Farmacocinética (residuos)

Al aplicar la CQMEPCA vía intramuscular en tilapia *Oreochromis* sp. clínicamente sana se obtuvieron los tiempos de retención del medicamento solamente en dos órganos en hígado (5 mg kg^{-1}) y en bazo (10 mg kg^{-1}).

Al aplicar el método de espectrofotometría con arreglos de diodos y HPLC en las muestras de tilapia *Oreochromis* sp. dosificadas con una concentración de 5 mg kg^{-1} , se obtuvo que solamente en el HPLC se obtuvieron lecturas positivas (presencia de la CQMEPCA); pero solamente en hígado

Al aplicar el método de espectrofotometría con arreglos de diodos y HPLC en las muestras de tilapia *Oreochromis* sp dosificadas con una concentración de 10 mg kg^{-1} , se obtuvo que solamente en el HPLC se obtuvieron lecturas positivas (presencia de la CQMEPCA), pero solamente en bazo

La dosis establecida de CQMEPCA es de 5 mg kg^{-1} ya que es la que se encontró en el hígado de la tilapia *Oreochromis* sp. y puede ser aplicada vía intramuscular y además es absorbida en el organismo después de 12 horas. La segunda dosificación de CQMEPCA fue de 10 mg kg^{-1} solamente se encontró en bazo y fue eliminada después de 4 horas de su aplicación, en un estudio reciente se encontró que la dosificación efectiva de la CQ es de 5 mg kg^{-1} en contra de la bacteria *Vibrio fluorences* (García, 1998), por lo tanto se puede sugerir que la dosis efectiva a aplicar es de 5 mg kg^{-1} , ya que es más factible utilizar una dosificación que ya ha sido probada en contra de alguna bacteria que genera infecciones en peces; por otro lado no se encontró literatura para poder comparar el tiempo de retención del bazo

Algunos de los factores que pudieron haber influido para que no se obtuvieran todos los tiempos de retención de los órganos en estudio pudieron ser los siguientes:

La vía de administración pudo no ser la adecuada y volver a intentarlo con administraciones del fármaco vía intravenosa, intraperitoneal y oral.

Las muestras estuvieron en refrigeración por mucho tiempo de ahí que no se puede saber con certeza la cantidad de CQMEPCA presente en cada órgano debido a que puede haber descomposición de la CQMEPCA en el tejido; se sugiere el sacrificio de animales e inmediatamente realizar el estudio farmacocinético.

Se pueden cambiar las variables de integración del HPLC para lograr leer en las muestras a CQMEPCA pero, si y solo si, se trata de muestras frescas.

Se recomienda realizar más estudios sobre la farmacocinética en varias especies de peces para poder tener un poco más de bases para medicar adecuadamente a estos organismos en presencia de alguna infección bacteriana

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Abedini, S, Namdari, R; Law, F C P “**Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in rainbow trout and chinook salmon.**” *Aquaculture.*, 162(1), 1998. pp 23-32.
- Adams, R. (1995) “**Veterinary pharmacology and therapeutics.**” Iowa State University Press USA
- Alavi, F K, Rolf, L. L, Clarke, C. R “**The pharmacokinetics of sulfachlorpyridazine in channel catfish, *Ictalurus punctus.***” *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 16(2), 1993. pp 232-236.
- Albercht, R: “**Development of antibacterial agents of the nalidixic acid type.**” *Prog Drug Res.*, 21, 1977. pp 99-104
- Alper, J. “**Drug discovery on the assembly line.**” *Science*, 264, 1993. pp 1399-1400.
- Ahmed, S.M; Shoreit, A A.M: “**Vibriosis in Tilapia species at Assiut Governorate.**” *Assiut Veterinary Medical Journal.* 31(6), 1994. pp 226 – 237.
- Analytical Profile., (1986) “**Sistem api 20 E.**” ed, Sherwood Medical. New York. pp 13
- Anónimo. Memorias: “**Problemática del uso de antimicrobianos en farmacología veterinaria.**” FMVZ UNAM. 3-6 abril de 1995. Asociación Mexicana de Farmacología Veterinaria. Departamento de Fisiología y Farmacología. 1995.
- Austin, B; Austin, D. A. (1993) “**Bacterial fish pathogens, diseases in farmed and wild fish.**” 2nd edn. Ellis Horwood, London. pp 265-307.
- Austin, B; Stobie, M: “**Vibrio alginolyticus; the cause of gill disease leading to progressive low level mortalities among juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. in a scottish aquarium.**” *J. Fish Diseases.*, 16 (3), 1993. pp 227 – 280.
- Barnes, A. C; Amyes, S. G. B: “**Fluoroquinolones display rapid bactericidal activity and low mutation frequencies against *Aeromonas salmonicida.***” *Journal of Fish Diseases.*, 14 (6), 1991. pp 661-667.
- Baron, E. J; Finegold, S. M. (1990). “**Bailey and Scott’s Diagnostic Microbiology.**” 8th. The C V. Mosby Company USA.
- Beishir, L. (1977). “**Microbiology in practice.**” 2th edition. Canfield Press pp 342.
- Benediktsdóttir, E; Helgason, S, Sigurjónsdóttir, H “**Vibrio spp. isolated from salmonids with shallow skin lesions and reared at low temperature.**” *J Fish Diseases.*, 21, 1998. pp 19-28.

Bennet, J. B, Brodie, J L, Benner, E J; Kirby, W M "Simplified accurate method for antibiotics assay." Clinical specimens. Amer. Soc Of Microb , 14, 1966. pp 170-177.

Bergan, T. (1987). "Quinolones In: antimicrobial annual 2." Edit Elsevier Amsterdam, Holland

Bertoldini, G; Sala, V "Sensitivity *in vitro* of *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* to a new quinolone (enrofloxacin)." Praxis Veterinaria Milano., 10 (4), 1989 pp 15-16.

Billstein, S. A. "How the pharmaceutical industry brings an antibiotic drug to market in the United States." Antimicrobial agents and Chemotherapy., 38(12), 1994. pp 2679-2682.

Booth, H N, Mc Donald, E. L. (1988) "Veterinary pharmacology and therapeutics." Second printing Ed University Press. USA.

Botter, A; Schmid, P; Humke, R: "In vitro efficacy of cefquinome (INN) and other antiinfective drugs against bovine bacterial isolates from Belgium, France, Germany, The Netherlands, and United Kingdom." Zentralbl Veterinarmed Berlin., 42, (1995). pp 377-383.

Bowser, P.R, House, M "In vitro sensitivity of some fish pathogens to the quinolones naladixic acid and oxalinic acid and the fluoroquinolone enrofloxacin." Bulletin of the European Association of fish pathologists., 10 (2), 1990. pp 48-49.

Bowser, R P; Wooster, A. G; Leger, ST J; Babish, G. J: "Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." J. Vet. Pharmacol, Therap., 15(1), 1992. pp 62-71

Brander, C.G, Pugh, M D; Bywater, J. R; Jenkins, W. L (1989) "Veterinary applied, pharmacology and therapeutics." 5th. Ed Bailliere Tindall. London

Brown, S. A; Chester, S. T; Robb, E. J: "Effect of age on the pharmacokinetics of single dose ceftiofur sodium administered intramuscularly or intravenously to cattle." J. Vet. Pharm and Ther., 20(5), 1997

Capril, K. A: "The cephalosporin antimicrobial agents: a comprehensive review." J. Vet. Pharmacol, Therap , 11, 1988. pp 1-32

Chu, D. T. W; Fernández P. B "Structure activity relationship of the fluoroquinolones." Antimicrob Agents Chomother., 33, 1989. pp131-135.

Commission of the European Communities: "The application of chapte 1 of part two of the annex to directive 81/852/EEC with a view of demonstration of the safty of veterinary medical product." 111/3897/88 EN. pp 42

Cottral, E. G. (1986) **"Microbiología veterinaria."** Editorial La Prensa Medica Mexicana, S A de C V. México, D. F. pp 401-409.

Corpi, C. M. A, Ocampo, C. L, Azuara, S. J, Sumano, L. H (1995). **"Desarrollo de una nueva generación de antimicrobianos (Cefquinolona) de diseño nacional."** Premio Criofarma (Dr Alfredo Tellez Girón Rode)

Courtin, F, Craigmill, S. E; Wetzlich, S. E, Gustafson, R. C, Arndt, T. S. **"Pharmacokinetics of ceftiofur and metabolites after single intravenous and intramuscular administration and multiple intramuscular administrations of ceftiofur sodium to dairy goats."** J. Vet. Pharm and Ther, 9(1), 1996

Craigmill, A. L; Sundlof, S. F, Riviere, J. E (1994) **"Handbook of comparative pharmacokinetics and residues of veterinary therapeutic drugs."** CRC press, Boca Raton, Florida.

Crawford, L. M; Franco, D. A. (1994). **"Animal drug and human health."** Technomic. Lancaster, Pennsylvania.

Davidson, J. N; Conzelman, G. M; Baggot, J. D: **"Pharmacokinetics of 1-cyclopropyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(4ethyl-1-piperazinyl)-3-quinoline-carboxylic acid in preruminant and ruminant calves."** Proceedings of the Western Pharmacological Society, 29,1986. pp 129-132.

DiCesare, J. L; Dong, M. W; Ettore, L. S. (1996). **"Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución."** Perkin-Elmer. 1ª edición. España

Elkhaili, H; Linger, L; Monteil, H; Jehl, F: **"High-performance liquid chromatographic assay for cefepime in serum."** Journal of Chromatography B., 690, 1997. pp 181-188.

Espinosa, J. M; Labarta, V. (1998) **"Patología en acuicultura"**. Plan de formación de técnicos superiores. Programa especial de I + D de acuicultura. Comisión asesora de investigación científica y técnica. Editado por Barjan, J. L; Estevez, T. A. **"Enfermedades bacterianas en peces"**. Universidad de Santiago de Compostela. España. pp 474-482.

"Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos." Sexta edición. 1994

Fraser, M.C; Bergeron, A. J, Mays, A; Aiello, E. S. (1991) **"The Merck veterinary manual: a handbook of diagnosis, therapy, and disease prevention and control for the veterinarian."** 7ª. Editorial Board. Rahway, N.J., U.S.A. pp 988-989.

García, R. M. (1997). **"Evaluación del efecto antibacteriano de la cefquinolona (CQEPKA-406 s (L)) contra *Vibrio fluorenses* en tilapia (*Oreochromis mossambicus*)."** (Tesis de licenciatura). ENEP-I. UNAM. Edo. de México

Goodman, G. A. (1986). **"Las bases farmacológicas de la terapéutica."** 7ª edición. Ed Panamericana, Bogotá. pp 1085-1091

Grondel, L. J., Nouws, M. F. J., De Jong, M., Schutte, R. A., Driessens, F. "Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in carp, *Cyprinus carpio* L., following different routes of administration." J. of Fish Diseases., 10(3), 1987a. pp 153-163.

Grondel, L. J., Nouws, M. F. J., De Jong, M., Schutte, R. A., Driessens, F. "The influence of antibiotics on the immune system. IV. Immuno-pharmacokinetic investigation on the primary anti-SRBC response in carp *Cyprinus carpio* after oxytetracycline injection." J. of Fish Diseases., 10, 1987b. pp 35-43

Goodman, L. J. "Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and african catfish (*Clarias gariepinus*)." J. Vet. Pharmacol, Therap., 12(2), 1986. pp 157-162.

Hjeltnes, B., Roberts, R.J. (1993). "Vibriosis. In: Bacterial diseases of fish." Blackwell Scientific Publication, Oxford. pp 109- 121.

Huin, M. H., Gregory, A. W., Bowse, R. P. "Efficacy of enrofloxacin for the treatment of salmonid with bacterial kidney disease, caused by *Renibacterium salmoninarum*." Department of Avian and Aquatic Animal Medicine College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaca, New York. Journal of Aquatic Animal Health., 6, 1994. pp 220-223.

Inglis, V., Richards, P.R. "The *in vitro* susceptibility of *Aeromonas salmonicida* and other fish-pathogenic bacteria to 29 antimicrobial agents." Journal of Fish Diseases., 14(6), 1991. pp 641-650.

Ito, A., Hirai, K., Ivone, M., Koga, H., Suzue, S., Irikure, T., Misahushi, S. "The *in vitro* antibacterial activity of AM-715 a new nalidixic acid analogue." Antimic Agents Chem., 17, 1980. pp 103-108.

Jawetz, M. D. E., Melnick, L. J., Adelberg, E. A. (1996) "Microbiología médica." Editorial El Manual Moderno, S.A de C.V. México D. F. pp 273-276.

Johnson, D.; Erwin, M.; Jones, R. N. "Antimicrobial activity and spectrum of novel cephalosporin- fluoroquinolone dual action compounds (DAC), CQEPCTM-397 and CQEPTM (414)." September 15-18 1996. In American society for Microbiology. Proceeding of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. New Orleans, Louisiana. 1996. 128

Jones, R. N. "Impact of changing pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in the treatment of serious infections in hospitalized patients." American Journal of Medicine., 110, 1996. pp 3S-12S.

Kazuaki, U. "Pharmacokinetic study of oxytetracycline in healthy and vibriosis-infected ayu (*Plecoglossus altivelis*)." Aquaculture., 146(1), 1996. pp 33-42.

Liman, O. R. (1993). "An introduction to statistical methods and data analysis." Edition fourth Duxbury press New York.

Lavilla, P. C. R.; Baticados, M. C. L, Cruz, L. E. R, De la Peña, L. D. "Occurrence of luminous bacterial disease of *Panaeus monodon* larvae in the Philippines." *Aquaculture.*, 91, 1990 pp 1-13.

Lewbart, G; Vaden, S, Deen, J; Manaugh, C; Whitt, D; Doi, A; Smith, T; Flammer, K. "Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration." *J. Vet. Pharmacol, Therap.*, 20(2), 1997. pp 124-128.

Lewis, C. S; Hastings, T. S: "In vitro activities of oxolonic acid, ciprofloxacin and norfloxacin against *Aeromonas salmonicida*." *Journal of Fish Diseases.*, 13 (5), 1990 pp 377-384.

Maniatis, E. K; Sambrook, J (1989) "Molecular cloning a laboratory manual". 2nd ed. Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, N.Y).

Martinsen, B; Oppegaard, H; Wichstrom, R; Muhr, E. "Temperature-dependent in vitro antimicrobial activity of four 4-quinolones and oxytetracycline against bacteria pathogenic to fish." *Journal of fish Disease.*, 8, 1992. pp 1738-1743.

McNeill, S. J. (1979). "Sea microbes." University Press Oxford. New York.

Medina, F. J. L. (1998). "Determinación de la actividad antibacteriana y estudio de la relación estructura-actividad de diterpenos aislados de salvia mexicana." (Tesis de licenciatura). Facultad de Química. UNAM. México, D.F.

Meinertz, R. J; Stehly, R. G; Gingerich, H. W. "Pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after intraarterial dosing." *Aquaculture.*, 148, 1996. pp39-48.

Méndez, L. A. (1996). "Evaluación de la potencia y determinación del espectro antibacteriano de una cefalquinolona de desarrollo nacional." (Tesis de licenciatura). México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM

Nicolet, J. (1985) "Compendio de bacteriología médica veterinaria." Editorial Acribia, S. A. Zaragoza España. pp 39-42.

Nordmo, R; Holth, R. M. J, Varma, J. K; Sutherland, H. I; Brokken, S. E: "Evaluation of florfenicol in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: efficacy against furunculosis due to *Aeromonas salmonicida* and cold water vibriosis due to *Vibrio salmonicida*." *Journal of Fish Diseases*, 21, 1998 pp 289-297.

Nouws, J F M, Vree, T B; Termond, E; Lohuis, J, Van Lith, P, Binkhorst, G J, Breukink, H. J, Van Miert, A. S. J P A M, Grondel, J. L: **“Pharmacokinetics, hydroxylation and acetylation of slphadimidine in man, ruminants, horses, pigs and fish.”** In Comparative Veterinary Pharmacology, Toxicology and Therapy, 3rd EAVPT Congress, Ghent, Belgium. 1986. pp 301-318

Ocampo, C L, Sumano, L H **“Uso de un nuevo antibiótico, la CQMEPCA, para el tratamiento sistemático de la mastitis clínica.”** Memorias del congreso panamericano de control de mastitis y calidad de la leche Mérida, Yucatán, México. 23 al 27 marzo de 1998

Olsson, C. J; Joborn, A; Westerdahl, A, Blomberg, L; Kjelleberg, S; Conway, L. P: **“Is the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*? .”** Journal of Fish Diseases., 19, 1998. pp 225-234.

Olsson, C J; Joborn, A; Westerdahl, A; Blomberg, L; Kjelleberg, S; Conway, L. P: **“Survival, persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine and faeces.”** Journal of Fish Diseases., 21, 1998. pp 1-9.

“Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud.” Codex Alimentarius. Secretaria del Programa Conjunto FAO/OMS, Roma., vol 1-7, 1994.

Ovalle, A. I (1996). **“Farmacocinética de la Cefaquinolona (CQEPCA) en perros.”** (Tesis de licenciatura). México D.F Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.

Paul, R. B, Gregory, A W; Hui, M. H: **“Laboratory efficacy of enrofloxacin for the control of *Aeromona salmonicida* infection in rainbow trout.”** Journal of Aquatic Animal Health., 6, 1994. pp 288-291.

Pelzar, M. J. Jr (1986). **“Microbiology.”** Fifth edition. McGraw-Hill, New York.

“Pharmaceutical Manufacturers Association.” Pocket facts. Pharmaceutical Manufacturers Association, Washington, D.C. 1993

Prescott, J F; Baggott, J. D. (1991). **“Terapéutica antimicrobiana veterinaria.”** Editorial Acribia Zaragoza, España.

Roberts, J. R. (1982). **“Microbial diseases of fish.”** Ed Academic Press. New York. pp 170-181.

Roberts, J R (1989). **“Patología de los peces.”** Ediciones MundiPrensa. Madrid. pp 218-221

Rogstad, A; Homazabal, V; Ellingsen, F. O; Rasmussen, E. K "Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish. I. Absorption, distribution and accumulation in rainbow trout in freshwater." *Aquaculture*, 96(3), 1991. pp 219-226.

Rolf, L L; Setser, M. D; Walker, J. L: "Pharmacokinetics and tissue residues in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) given intracardiac and intramuscular injections of gentamicin sulfate." *Veterinary and Human Toxicology*, 28(Suppl 1), 1986. pp 25-31.

Samuelson, B. O; Lunestad, T. B; Jelmert, A: "Pharmacokinetic and efficacy studies on bath-administering potentiated sulphonamides in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L." *Journal of Fish Diseases*, 20(4), 1997. pp 267-269.

Santamaría, J. A. "Eficacia clínica de un preparado intramamario a base de una cefaquinolona experimental (CQEPCA-600M), para el tratamiento de la mastitis bovina." (Tesis de licenciatura). México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 1997.

Smith, C. M; Reynard, A. M. (1993). "Farmacología." Edit. Medica Panamericana. España

Soberón, G; Martuscelli, J; Quintero, R. "Salud y tratado de libre comercio." *Ciencia y Tecnología*, (20), 1994. pp 14-21.

Sohlberg, S; Martinsen, B; Horsberg, T. E; Soli, N. E: "Evaluation of the dorsal aorta cannulation technique for pharmacokinetic studies in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in sea water." *J. Vet. Pharmacol, Therap.*, 19(6), 1996. pp 460-465.

Stamm, M. J: "In vitro resistance by fish pathogens to aquacultural antibacterials, including the quinolones difloxacin (A-56619) and sarafloxacin (A-56620)." *Journal of Aquatic Animal Health*, 1, 1989. pp 135-141.

Stoffregen, A. D; Wooster, A. G; Bustos, S. P; Bowser, R. P; Babish, G. J: "Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile Atlantic salmon." *J. Vet. Pharmacol, Therap.*, 20(2), 1997. pp 111-123.

Sumano, L. H: "Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria." *Vet Mex.*, 24, 1993 pp 83-92.

Sumano, L. H; Mateos, G; Hevia del Puerto C, Ocampo. L "Pharmacokinetics, tolerance and clinical efficacy of the cephaquinolone, CQEPCA-663, in dogs affected with various respiratory bacterial infections." *J. Vet Med., Israel*. 53(2), 1998.

Sumano, L. H; Ocampo, C. L. "Bases Farmacológicas de la vigilancia de residuos en productos de origen animal." *Vet. Mex.*, 26(3), 1995

Sumano, L. H. Ocampo, C. L. (1997) "Farmacología Veterinaria." 2^{da} edición McGRAW-HILL México. pp 2, 44-50.

Sumano, H, Ocampo, L, Corpi, M. A. "Antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in poultry of a new cephalosporin-fluoroquinolone (CQ) molecule." Journal of Applied Animal Research., 13(1-2), 1998. pp 169-178

"United States Pharmacopeia Drug information for the health care professional." (1995). 15th edition. Vol I.

Sundolf, S. F, Craigmill, A. L; Riviere, J. E. "Food animal residue avoidance databank (FARAD): A pharmacokinetic-based information source." Journal Veterinary Pharmacology Therapeutic., 9, 1986. pp 237-245.

The Merck Index. Eleventh Edition Centennial Edition. Merck & Co., Inc. Rahway, N J. U.S.A. 1990.

Thomson, T. D; Quay, J. F; Webber, J. A. "Cephalosporin group of antimicrobial drugs." JAVMA., 185(10), 1984

Wang, W.S; Chen, M. H; Shu, P; Wang, I. C, Chen, I: "Sensitivities of *Vibrio* isolate from cultured shrimps to fluoroquinolone *in vitro*." Department of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University, Chung Hsing, China, Coa. Fish. Ser., 53, 1995. pp 55-60.

WayShyan, W; MingHui, C; ChinFu, C; Chengl, L; Wang, W. S; Chen, M. H.Cheng, C.F; Liu, C L: "Antibacterial activities of fluoroquinolones *in vitro* against *Vibrio* spp isolated from freshwater and saltwater fish." Taiwan Journal of Veterinary Medicine and Animal Husbandry., 65(1), 1995. pp 27-33.

Yonis, A. A; Amer, M. M. A; Naguib, M; Abdel, A. E.S: "Pharmacokinetics, efficacy and tissue residues of enrofloxacin in *Oreochromis niloticus* infected with *Vibrio anguillarum*." J. Vet. Medical. Giza., 45(1), 1997. pp 75-85.

Laboratorios Aranda S.A. de C.V.
Instrument Serial Number EL 97043194

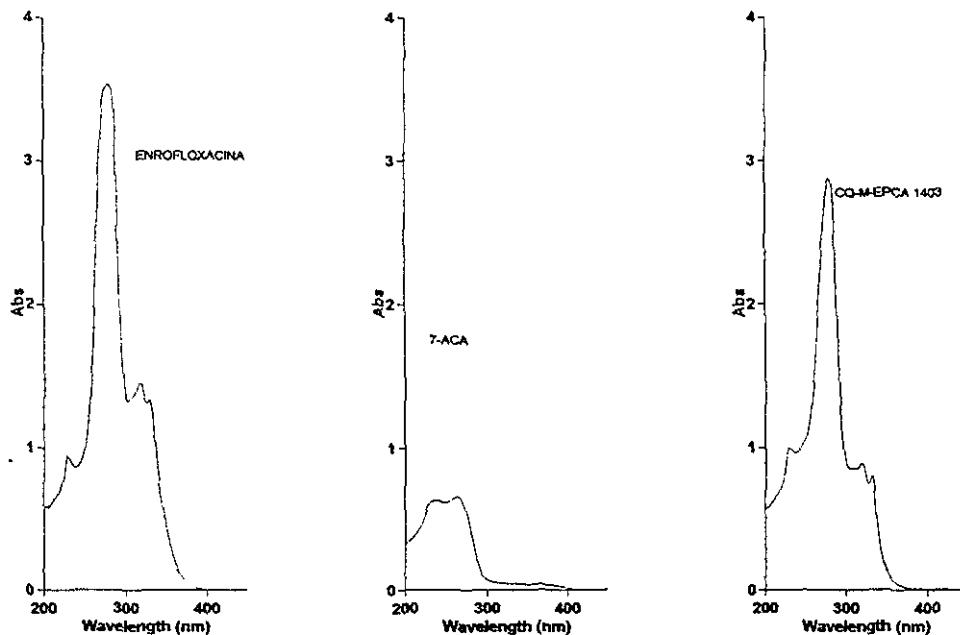


Figura 9 Absorbancia de los estándares de enrofloxacin, 7-ACA y CQMEPCA (cefaquinolona).

Scan Report Mar 24 Ago 04:44:19 PM 1999

Batch:
Software version: 01.00(6)
Operator: QFB. LINA LAURA NAVA MUÑOZ.

Instrument Parameters

Instrument	Cary 100
Instrument Version	7.00
Start (nm)	450.00
Stop (nm)	200.00
X Mode	Nanometers
Y Mode	Abs
UV-Vis Scan Rate (nm/min)	600.000
UV-Vis Data Interval (nm)	1.000
UV-Vis Ave. Time (sec)	0.100
UV-Vis SBW (nm)	2.0
UV-Vis Energy	1.00

Beam Mode Double
Signal-to-noise Mode Off
UV Source On
Vis Source On
Source Changeover (nm) 350.00
Baseline Correction Off
Cycle Mode Off
Comments ENROFLOXACINA ESTANDAR.
7-ACA ESTANDAR.
CQ-M-ECPA 1403 ESTANDAR.

Sample Name: ENROFLOXACINA

Collection Time 24/08/99 4:40:37 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
317.00	1.4487
279.00	3.5324
227.00	0.9412

Sample Name: 7-ACA

Collection Time 24/08/99 4:42:02 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
264.00	0.6538

Sample Name: CQ-M-ECPA 1403

Collection Time 24/08/99 4:43:47 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
332.00	0.8046
318.00	0.8916
279.00	2.8787
229.00	1.0020

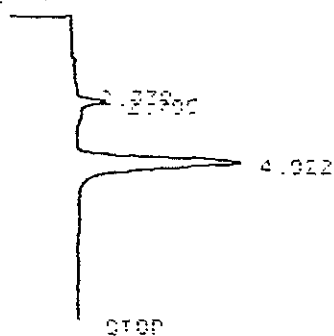
LIST: LIST
 AREA: 0.0000000000000000

LEDS = 0.101007
 C11 = 0
 C12 = 0.0
 C13 = 100000
 C14 = 2
 C15 = 0.01

ANALISIS DE 00 M EPOR EN ORDENOS DE PESES GREYK

000 M EPOR LIBE ESTANDOR SECUNDARIO GREYK

RUN# 7 JAN 1, 1981 02:14:00
 START



RUN# 7 JAN 1, 1981 02:14:00

GREYK

RT	AREA	TYPE	HIBIT	AREA%
2.7300	720003	PS	.210	7.20455
4.012	9171000	PS	.420	92.71546

TOTAL AREA=9.99175E+00
 MUL FACTOR=1.00000E+00

Figura 10 Cromatograma del estándar de CQMEPCA.

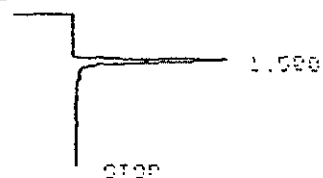
11111111111111111111
 11111111111111111111

LEAD = 0 10 000
 TIME = 0
 LAM = 0.5
 WAVELENGTH = 100000
 WAVELENGTH = 0
 WAVELENGTH = 0 01

ANALISIS DE CO M EDCON EN ORGANICO DE POCO AREA

AREA 7 ESTANDAR BREAK

RUN# 1 JAN 1, 1991 01:01:10
 AREA



RUN# 1 JAN 1, 1991 01:01:10

AREA

RT	AREA	TYPE	WIDTH	PERCENT
1.500	2051700	DU	.140	100.00000

TOTAL AREA=2051700

MUL FACTOR=1.00000E+00

Figura 12. Cromatograma del estándar de uno de los precursores de CQMEPCA, la 7-ACA.

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

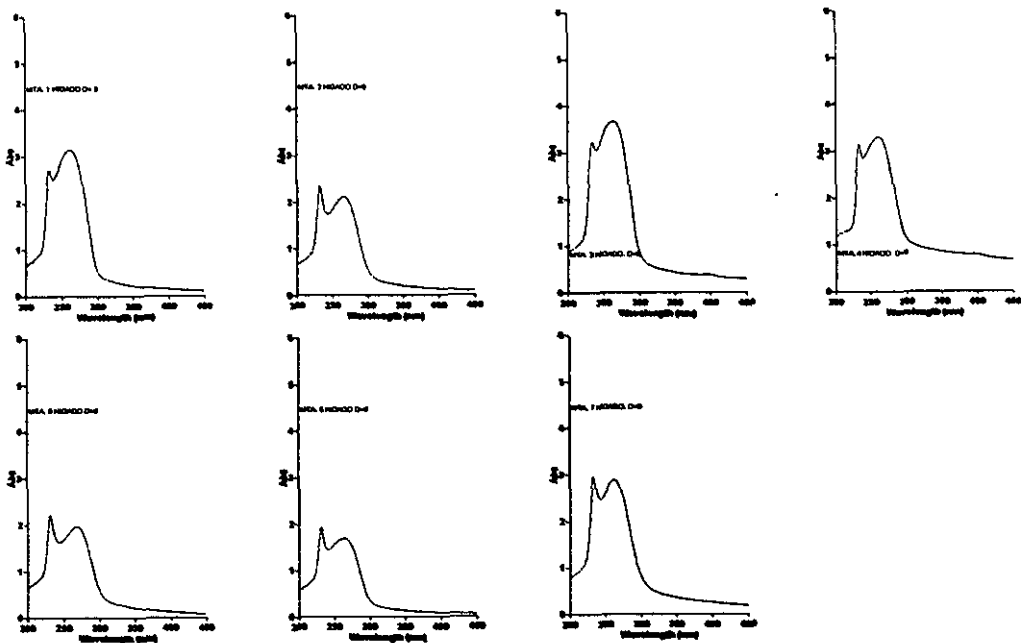


Figura 13. Absorbancias de las muestras de hígado a una concentración de 5 mg/kg, mostrando el filtrado libre de proteínas.

Scan Report Lun 23 Ago 03:57:08 PM 1999

Batch:
Software version: 01.00(6)
Operator: QFB. LINA LAURA NAVA MUÑOZ.

Instrument Parameters

Instrument	Cary 100
Instrument Version	7.00
Start (nm)	450.00
Stop (nm)	200.00
X Mode	Nanometers
Y Mode	Abs
UV-Vis Scan Rate (nm/min)	600.000
UV-Vis Data Interval (nm)	1.000
UV-Vis Ave. Time (sec)	0.100
UV-Vis SBW (nm)	2.0
UV-Vis Energy	1.00

Beam Modu	Double
Signal-to-noise Mode	Off
UV Source	On
Vis Source	On
Source Changeover (nm)	350.00
Baseline Correction	Off
Cycle Mode	Off
Comments	ANALISIS DE CQ-M-EPCA EN ORGANOS DE PECES. ORGANO: HIGADO.FILTRADO LIBRE DE PROTEINAS. DOSIS: 5 MG/KG.

Sample Name: MTA. 1 HIGADO

Collection Time 23/08/99 3:47:35 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
259.00	3.1444
233.00	2.7182

Sample Name: MTA. 2 HIGADO

Collection Time 23/08/99 3:49:12 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
265.00	2.1104
231.00	2.3423

Sample Name: MTA. 3 HIGADO

Collection Time 23/08/99 3:50:34 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
263.00	3.6747
235.00	3.2324

ESTA TESIS NO SALE
DE LA SERIE 110

Sample Name: MTA 4 HIGADO

Collection Time 23/08/99 3:51:54 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
259.00	3.3044
233.00	3.1643

Sample Name: MTA 5 HIGADO

Collection Time 23/08/99 3:53:34 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
267.00	1.9787
231.00	2.2273

Sample Name: MTA 6 HIGADO

Collection Time 23/08/99 3:55:15 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
264.00	1.6890
230.00	1.9227

Sample Name: MTA 7 HIGADO

Collection Time 23/08/99 3:56:36 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
-----------------	-----

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

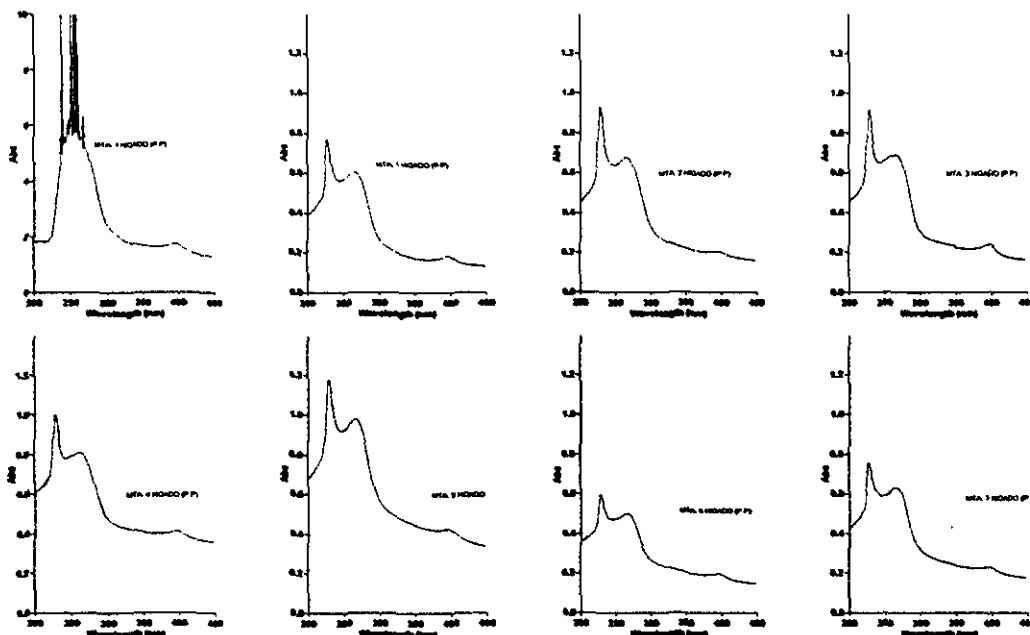


Figura 14 Absorbancia de las muestras de hígado de peces expuestos a la molécula de CQMEPCA a una dosis de 5 mg/kg a diferentes tiempos de medicación.

Scan Report Mar 24 Ago 09:41:17 AM 1999

Batch:
Software version: 01.00(6)
Operator: QFB. LINA LAURA NAVA MUÑOZ.

Instrument Parameters

Instrument	Cary 100
Instrument Version	7.00
Start (nm)	450.00
Stop (nm)	200.00
X Mode	Nanometers
Y Mode	Abs
UV-Vis Scan Rate (nm/min)	600.000
UV-Vis Data Interval (nm)	1.000
UV-Vis Ave. Time (sec)	0.100
UV-Vis SBW (nm)	2.0
UV-Vis Energy	1.00

Beam Mode Double
 Signal-to-noise Mode off
 UV Source On
 Vis Source On
 Source Changeover (nm) 350.00
 Baseline Correction off
 Cycle Mode Off
 Comments ANALISIS DE CQ-M-EPCA EN ORGANOS DE PECES
 PROTEINAS PLASMATICAS. HIGADO.
 DOSIS DE 5 MG/KG.

Sample Name: MTA. 1 HIGADO (P.P)

Collection Time 24/08/99 9:14:15 AM

Peak Table

Peak Type Peaks
 Peak Threshold 0.0200
 Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
396.00	1.7547
272.00	5.2200
269.00	5.6762
267.00	6.3127
264.00	5.5285
262.00	5.8116
259.00	9.9999
257.00	9.9999
255.00	9.9999
253.00	5.8261
251.00	9.9999
248.00	6.2713
246.00	6.0790
242.00	5.6141
238.00	9.9999
207.00	1.8743
203.00	1.8518

Sample Name: MTA.1 HIGADO (P.P)

Collection Time 24/08/99 9:20:21 AM

Peak Table

Peak Type Peaks
 Peak Threshold 0.0200
 Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
265.00	0.6056
228.00	0.7705

Sample Name: MTA.2 HIGADO (P.P)

Collection Time 24/08/99 9:32:12 AM

Peak Table

Peak Type
 Peak Threshold
 Range

Peaks
 0.0200
 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
266.00	0.6783
229.00	0.9323

Sample Name: MTA. 3 HIGADO (P.P)

Collection Time 24/08/99 9:33:43 AM

Peak Table

Peak Type
 Peak Threshold
 Range

Peaks
 0.0200
 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
396.00	0.2415
265.00	0.6921
228.00	0.9215

Sample Name: MTA. 4 HIGADO (P.P)

Collection Time 24/08/99 9:35:55 AM

Peak Table

Peak Type
 Peak Threshold
 Range

Peaks
 0.0200
 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
261.00	0.8091
228.00	1.0012

Sample Name: MTA. 5 HIGADO (P.P)

Collection Time 24/08/99 9:37:33 AM

Peak Table

Peak Type
 Peak Threshold
 Range

Peaks
 0.0200
 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
266.00	0.9784
229.00	1.1822

Sample Name: MTA. 6 HIGADO (P.P)

Collection Time 24/08/99 9:38:57 AM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
266.00	0.5026
227.00	0.5979

Sample Name: MTA. 7 HIGADO (P.P)

Collection Time 24/08/99 9:40:45 AM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
265.00	0.6338
229.00	0.7588

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

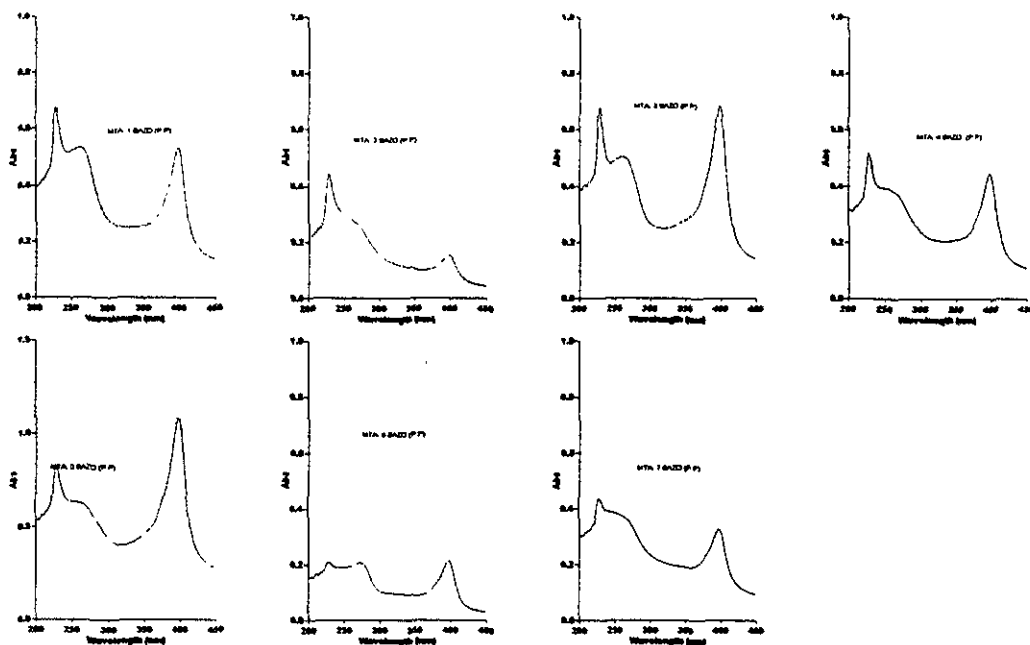


Figura 15. Absorbancia de las muestras de bazo de peces expuestos a la molécula de CQMEPCA a una dosis de 5 mg/kg a diferentes tiempos de medicación.

Scan Report Mar 24 Ago 03:16:33 PM 1999

Batch: C:\Varian\Cary WinUV\MARIBELB.BSW
Software version: 01.00(6)
Operator: QFB. LINA LAURA NAVA MUÑOZ.

Instrument Parameters

Instrument	Cary 100
Instrument Version	7.00
Start (nm)	450.00
Stop (nm)	200.00
X Mode	Nanometers
Y Mode	Abs
UV-Vis Scan Rate (nm/min)	600.000
UV-Vis Data Interval (nm)	1.000
UV-Vis Ave. Time (sec)	0.100
UV-Vis SBW (nm)	2.0
UV-Vis Energy	1.00

Beam Mode Double
 Signal-to-noise Mode Off
 UV Source On
 Vis Source On
 Source Changeover (nm) 350.00
 Baseline Correction Off
 Cycle Mode Off
 Comments ANALISIS DE CQ-M-EPCA EN ORGANOS DE PECES.
 ORGANOS: BAZO. PROTEINAS PLASMATICAS.
 DOSIS: 5 MG/KG.

Sample Name: MTA. 1 BAZO (P.P)

Collection Time 24/08/99 3:06:01 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
 Peak Threshold 0.0200
 Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
397.00	0.5331
228.00	0.6782

Sample Name: MTA. 2 BAZO. (P.P)

Collection Time 24/08/99 3:07:29 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
 Peak Threshold 0.0200
 Range 450.00nm to 202.00nm

Wavelength (nm)	Abs
397.00	0.1552
227.00	0.4438

Sample Name: MTA. 3 BAZO. (P.P)

Collection Time 24/08/99 3:08:55 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
 Peak Threshold 0.0200
 Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
397.00	0.6862
260.00	0.5025
228.00	0.6796

Sample Name: MTA. 4 BAZO (P.P)

Collection Time 24/08/99 3:10:30 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
397.00	0.4485
227.00	0.5186

Sample Name: MTA. 5 BAZO (P.P)

Collection Time 24/08/99 3:11:51 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
397.00	1.0849
228.00	0.9288

Sample Name: MTA. 6 BAZO (P.P)

Collection Time 24/08/99 3:13:47 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
397.00	0.2136
227.00	0.2145

Sample Name: MTA. 7 BAZO (P.P)

Collection Time 24/08/99 3:16:01 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
-----------------	-----

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

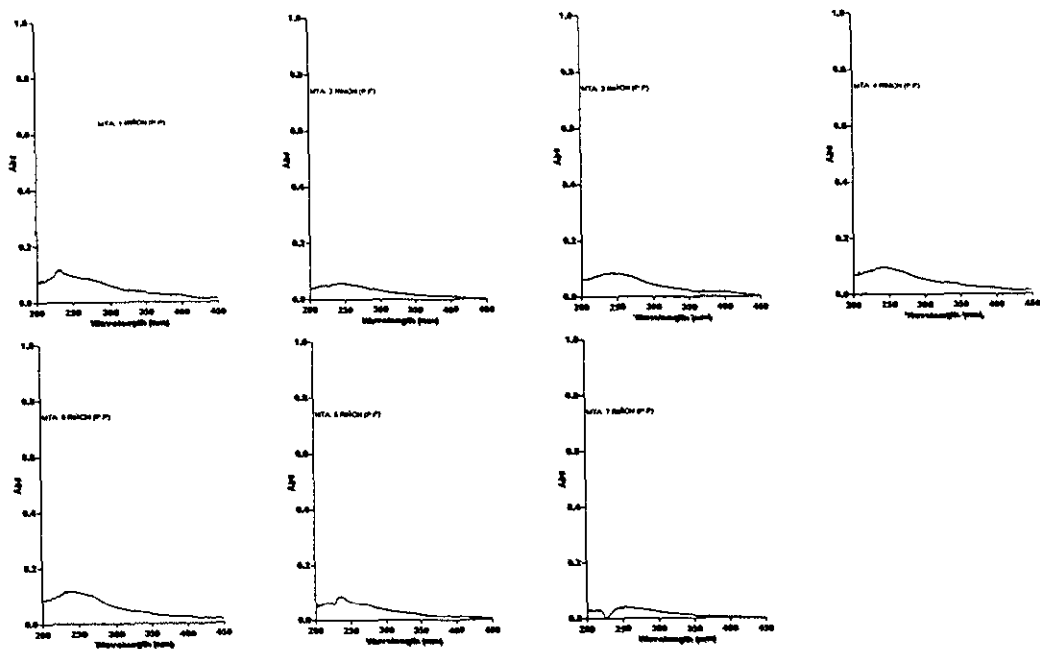


Figura 16. Absorbancia de las muestras de riñón de peces expuestos a la molécula de CQMEPCA a una dosis de 5 mg/kg a diferentes tiempos de medicación.

Scan Report Mar 24 Ago 05:01:25 PM 1999

Batch:
Software version: 01.00(6)
Operator: QFB. LINA LAURA NAVA MUÑOZ.

Instrument Parameters

Instrument	Cary 100
Instrument Version	7.00
Start (nm)	450.00
Stop (nm)	200.00
X Mode	Nanometers
Y Mode	Abs
UV-Vis Scan Rate (nm/min)	600.000
UV-Vis Data Interval (nm)	1.000
UV-Vis Ave. Time (sec)	0.100
UV-Vis SBW (nm)	2.0
UV-Vis Energy	1.00

```

Beam Mode      Double
Signal-to-noise Mode  Off
UV Source      On
Vis Source     On
Source Changeover (nm) 350.00
Baseline Correction Off
Cycle Mode     Off
Comments      ANALISIS DE CO-M-EPCA EN ORGANOS DE PECES.
              ORGANO: RIÑON. PROTEINAS PLASMATICAS.
              DOSIS: 5 MG/KG.

```

Sample Name: MTA. 1 RIÑON. (P.P)

Collection Time 24/08/99 4:51:26 PM

Peak Table

```

Peak Type      Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range          450.00nm to 200.00nm

```

Wavelength (nm)	Abs
232.00	0.1189

Sample Name: MTA. 2 RIÑON (P.P)

Collection Time 24/08/99 4:53:23 PM

Peak Table

```

Peak Type      Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range          450.00nm to 200.00nm

```

Wavelength (nm)	Abs
245.00	0.0590

Sample Name: MTA. 3 RIÑON. (P.P)

Collection Time 24/08/99 4:55:14 PM

Peak Table

```

Peak Type      Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range          450.00nm to 200.00nm

```

Wavelength (nm)	Abs
232.00	0.0875

Sample Name: MTA. 4 RIÑON (P.P)

Collection Time 24/08/99 4:56:31 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
241.00	0.0072

Sample Name: MTA. 5 RIÑON (P.P)

Collection Time 24/08/99 4:58:08 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
232.00	0.1175

Sample Name: MTA. 6 RIÑON (P.P)

Collection Time 24/08/99 4:59:30 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
238.00	0.0886

Sample Name: MTA. 7 RIÑON (P.P)

Collection Time 24/08/99 5:00:53 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
248.00	0.0418

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

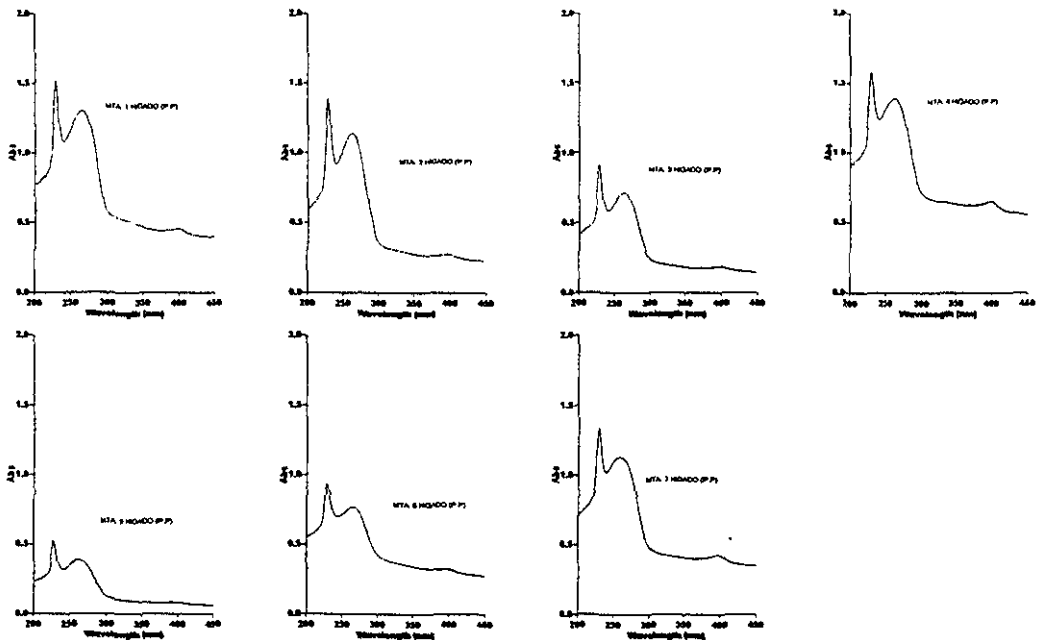


Figura 17. Absorbancia de las muestras de hígado de peces expuestos a la molécula de CQMEPCA a una dosis de 10 mg/kg a diferentes tiempos de medicación.

Scan Report Mié 25 Ago 10:11:19 AM 1999

Batch:
 Software version: 01.00(6)
 Operator: QFB. LINA LAURA NAVA MUÑOZ.

Instrument Parameters

Instrument	Cary 100
Instrument Version	7.00
Start (nm)	450.00
Stop (nm)	200.00
X Mode	Nanometers
Y Mode	Abs
UV-Vis Scan Rate (nm/min)	600.000
UV-Vis Data Interval (nm)	1.000
UV-Vis Ave. Time (sec)	0.100
UV-Vis SBW (nm)	2.0
UV-Vis Energy	1.00

```

Scan Mode           Double
Signal-to-noise Mode Off
UV Source           On
Vis Source          On
Source Changeover (nm) 350.00
Spectral Line Correction Off
Cycle Mode          Off
Comment             ANALISIS DE CQ-M-ETCA EN ORGANOS DE PECES.
                   ORGANO: HIGADO. PROTEINAS PLASMATICAS
                   DOSIS: 10 MG/KG.
    
```

Sample Name: MTA. 1 HIGADO (P.P)

Collection Time 25/08/99 10:01:57 AM

Peak Table

```

Peak Type           Peaks
Peak Threshold      0.0200
Range               450.00nm to 200.00nm
    
```

Wavelength (nm)	Abs
265.00	1.3049
229.00	1.5210

Sample Name: MTA. 2 HIGADO (P.P)

Collection Time 25/08/99 10:03:42 AM

Peak Table

```

Peak Type           Peaks
Peak Threshold      0.0200
Range               450.00nm to 200.00nm
    
```

Wavelength (nm)	Abs
262.00	1.1411
229.00	1.3872

Sample Name: MTA. 3 HIGADO (P.P)

Collection Time 25/08/99 10:05:06 AM

Peak Table

```

Peak Type           Peaks
Peak Threshold      0.0200
Range               450.00nm to 200.00nm
    
```

Wavelength (nm)	Abs
264.00	0.7175
228.00	0.9079

Sample Name: MTA 4 HIGADO (P.P)

Collection Time 25/08/99 10:06:14 AM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
397.00	0.6537
264.00	1.3922
229.00	1.5864

Sample Name: MTA 5 HIGADO (P.P)

Collection Time 25/08/99 10:08:01 AM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
263.00	0.3864
227.00	0.5298

Sample Name: MTA 6 HIGADO (P.P)

Collection Time 25/08/99 10:09:14 AM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
265.00	0.7722
228.00	0.9360

Sample Name: MTA 7 HIGADO (P.P)

Collection Time 25/08/99 10:10:47 AM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wave length (nm)	Abs.
387.00	0.4290
258.00	1.1277
228.00	1.3309

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

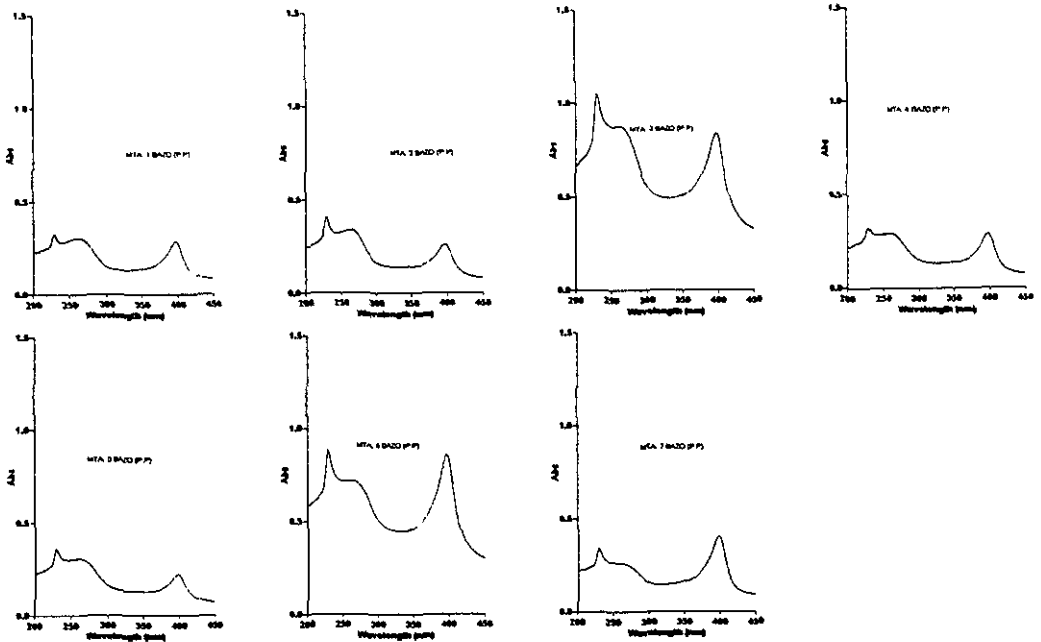


Figura 18 Absorbancia de las muestras de bazo de peces expuestos a la molécula de CQMEPCA a una dosis de 10 mg/kg a diferentes tiempos de medicación.

Scan Report Mié 25 Ago 03:45:59 PM 1999

Batch:
Software version: 01.00(6)
Operator: QFB, LINA LAURA NAVA MUÑOZ.

Instrument Parameters

Instrument	Cary 100
Instrument Version	7.00
Start (nm)	450.00
Stop (nm)	200.00
X Mode	Nanometers
Y Mode	Abs
UV-Vis Scan Rate (nm/min)	600.000
UV-Vis Data Interval (nm)	1.000
UV-Vis Ave. Time (sec)	0.100
UV-Vis SEW (nm)	2.0
UV-Vis Energy	1.00

Beam Mode	Double
Signal-to-noise Mode	Off
UV Source	On
Vis Source	On
Source Changeover (nm)	350.00
Baseline Correction	Off
Cycle Mode	Off
Comments	ANALISIS CQ-M-EPCA EN ORGANOS DE PEZ ORGANO:BAZO. PROTEINAS PLASMATICAS. DOSIS: 10 MG/KG.

Sample Name: MTA. 1 BAZO (P.P)

Collection Time 25/08/99 3:36:12 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
396.00	0.2954
261.00	0.3037
229.00	0.3307

Sample Name: MTA. 2 BAZO (P.P)

Collection Time 25/08/99 3:37:44 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
396.00	0.2637
229.00	0.4130

Sample Name: MTA. 3 BAZO (P.P)

Collection Time 25/08/99 3:39:09 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
396.00	0.8399
229.00	1.0536

Sample Name: MTA. 4 BAZO (P.P)

Collection Time 25/08/99 3:40:35 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
397.00	0.2908
228.00	0.3298

Sample Name: MTA. 5 BAZO (P.P)

Collection Time 25/08/99 3:42:16 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
396.00	0.2227
229.00	0.3634

Sample Name: MTA. 6 BAZO (P.P)

Collection Time 25/08/99 3:43:45 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
397.00	0.8592
229.00	0.8861

Sample Name: MTA. 7 BAZO (P.P)

Collection Time 25/08/99 3:45:27 PM

Peak Table

Peak Type	Peaks
Peak Threshold	0.0200
Range	450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
-----------------	-----

397.00	0.4385
279.00	0.3136

Laboratorios Aranda S.A. de C.V.
Instrument Serial Number EL 97043194

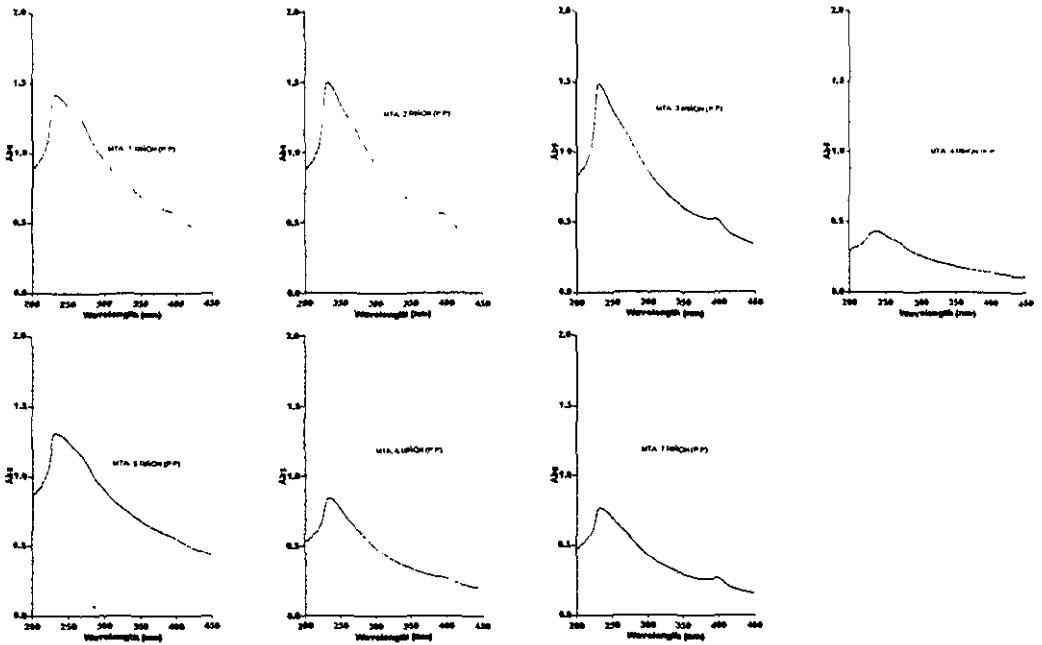


Figura 19. Absorbancia de las muestras de riñón de peces expuestos a la molécula de CQMEPCA a una dosis de 10 mg/kg a diferentes tiempos de medicación.

Scan Report Mié 25 Ago 04:30:52 PM 1999

Batch:
Software version: 01.00(6)
Operator: QFB. LINA LAURA NAVA MUÑOZ.

Instrument Parameters

Instrument	Cary 100
Instrument Version	7.00
Start (nm)	450.00
Stop (nm)	200.00
X Mode	Nanometers
Y Mode	Abs
UV-Vis Scan Rate (nm/min)	600.000
UV-Vis Data Interval (nm)	1.000
UV-Vis Ave. Time (sec)	0.100
UV-Vis SBW (nm)	2.0
UV-Vis Energy	1.00

0 0 0

```

Scan Mode:          Enable
Signal-to-noise Mode:  Off
UV Source:         On
Vis. Source:       On
Source Changeover (nm): 350.00
Baseline Correction:  Off
Cycle Mode:        Off
Comments:          ANALISIS DE CQ-M-EPCA EN ORGANOS DE PEZ.
                   ORGANO:RIÑON. PROTEINAS PLAMATICAS.
                   POSTS. 10 MG/KG.

```

Sample Name: MTA. 1 RIÑON (P.P)

Collection Time 25/08/99 4:21:42 PM

Peak Table

```

Peak Type:          Peaks
Peak Threshold:     0.0200
Range:              450.00nm to 200.00nm

```

Wavelength (nm)	Abs
233.00	1.4222

Sample Name: MTA. 2 RIÑON (P.P)

Collection Time 25/08/99 4:23:21 PM

Peak Table

```

Peak Type:          Peaks
Peak Threshold:     0.0200
Range:              450.00nm to 200.00nm

```

Wavelength (nm)	Abs
233.00	1.5018

Sample Name: MTA. 3 RIÑON (P.P)

Collection Time 25/08/99 4:24:40 PM

Peak Table

```

Peak Type:          Peaks
Peak Threshold:     0.0200
Range:              450.00nm to 200.00nm

```

Wavelength (nm)	Abs
232.00	1.4875

Sample Name: MTA. 4 RIÑON (P.P)

Collection Time 25/08/99 4:26:00 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0100
Range 450.00nm to 700.00nm

Wavelength (nm)	Abs
239.00	0.1353

Sample Name: MTA. 5 RIÑON (P.P)

Collection Time 25/08/99 4:27:24 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
233.00	1.3095

Sample Name: MTA. 6 RIÑON (P.P)

Collection Time 25/08/99 4:28:50 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
233.00	0.8438

Sample Name: MTA. 7 RIÑON (P.P)

Collection Time 25/08/99 4:30:20 PM

Peak Table

Peak Type Peaks
Peak Threshold 0.0200
Range 450.00nm to 200.00nm

Wavelength (nm)	Abs
233.00	0.7701

*APLICACIONES DE MUESTRA EN ORDENOS DE PESOS: 0.0001
 *APROXIMADO PLASMEATOS MUESTROS DE HIGADO TOME 1.0000
 *ADICION DE MUESTRA: 0.0010

* INTC 0.1 0
 * INT 21.0 0
 * INT 00 0 0 0
 * OR 003 10000 0
 * INTC 1 0
 * OR 00 0.1 0
 * LIST LIST
 OPER LOGICITY: 1244

ZERO = 0.40000
 INT 00 = 0
 INT 00 = 0 0
 OR 003 = 10000
 INTC 1 = 4
 OR 00 = 0 40

* RUN # 1 AUG 24, 1990 10:00:00
 START

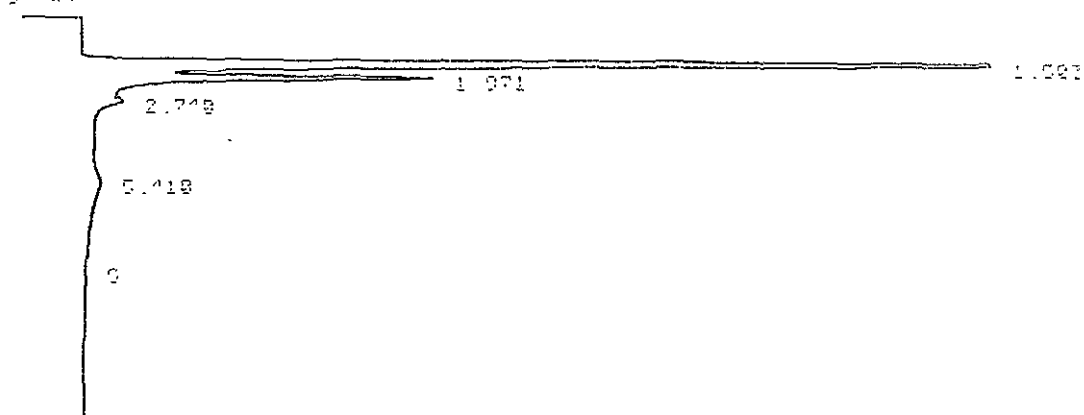


Figura 20. Cromatograma de las muestras de hígado de peces los cuales estuvieron expuestos a una dosis de 5 mg/kg de CQMEPCA a diferentes tiempos, mostrando la primera lectura de siete realizadas.

PLNS 1 AUG 24, 1990 10:00:52

OPER

RT	AREA	TIME	HEIGHT	PERCENT
1.071	11000000	000	1000	94.0014
1.071	11000000	100	1100	11.0130
2.748	1100000	100	110	1.01107
5.418	1100000	100	110	1.00071

10101 000001.001000
 101 000000+1.00000 00

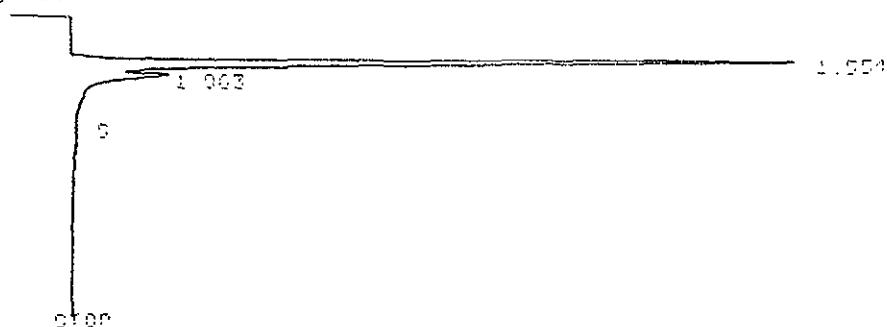
AMUESTRO 1 0020 00010000 01000000 00000000

CONDICIONES DE ANALISIS
 METODO = 0.00 002
 CANTIDAD = 0.0
 CONCENTRACION = 10000
 CANTIDAD = 1
 CANTIDAD = 0.10

AMUESTRO 1 0020 00010000 01000000 00000000

*BASIC 5 MORG. 00000

* RUN# 22 AUG 24, 1999 13:35:11
 C1001



RUN# 22 AUG 24, 1999 13:35:11

00000

RT	AREA	TYPE	HEIGHT	AREA%
1.004	5306624	000	.210	94.71037
1.003	300047	100	.107	1.28964

TOTAL AREA=5607473

MUL FACTOR=1.00000100

Figura 21. Cromatograma de las muestras de bazo de peces los cuales estuvieron expuestos a una dosis de 5 mg/kg de CQMEPCA a diferentes tiempos, mostrando la primera lectura de siete realizadas.

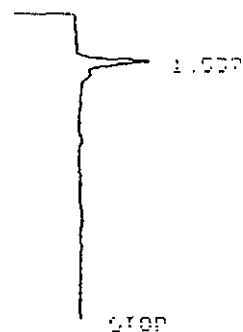
1101 1201
 00000000000000000000

Q100 = 0.10000
 Q11 = 0
 Q12 = 0.5
 Q13 = 10000
 Q14 = 1
 Q15 = 0.01

#MUESTRO 1 RIÑON PROTEINOS PLASMATICOS. BREAK

#00010 0 MG/KG. BREAK

RUN # 30 AUG 21, 1990 10:23:00
 01001



RUN# 30 AUG 21, 1990 10:23:00

AREA#

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
1.537	520001	SN	0.220	100.00000

TOTAL AREA= 520001

MUL FACTOR=1.00000E+00

Figura 22. Cromatograma de las muestras de riñón de peces los cuales estuvieron expuestos a una dosis de 5 mg/kg de CQMEPCA a diferentes tiempos, mostrando la primera lectura de siete realizadas

00:00:00 10 01 1991

00:00:00 10 01 1991 00 10 00

* ICRG 0 0
 * CRT 21 0 0
 * CRT 10 0 0 1
 * OF REL 10000 0
 * THROU 1 0
 * CK MD 0.01 0
 * LIST: LIST
 FROM SECURITY: 1100

ZERO = 0. 10.000
 CRT 20 = 0
 CRT 01 = 0.0
 OF REL = 10000
 THROU = 1
 CK MD = 0.01

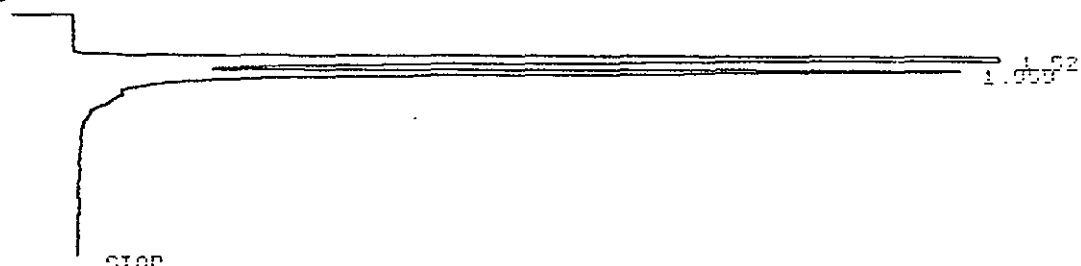
*ANALISIS DE CO H EGCA ENORGANOS DE PEZ. BREAK

*MIGADO TOMA 1 PROTEINAS PLASMATICAS. BREAK

*00010 10 MG/KG. BREAK

* RUN # 1 JAN 1, 1991 00:00:12

START



RUN# 1 JAN 1, 1991 00:00:12

BRENA

RT	AREA	INDE	WIDTH	AREA%
1.052	0080100	00	1.207	61.70507
1.053	0123600	00	1.200	30.29417

TOTAL AREA=1.00200E+07

MUL FACTOR=1.00000E+00

Figura 23. Cromatograma de las muestras de hígado de peces los cuales estuvieron expuestos a una dosis de 10 mg/kg de CQMEPCA a diferentes tiempos, mostrando la primera lectura de siete realizadas.

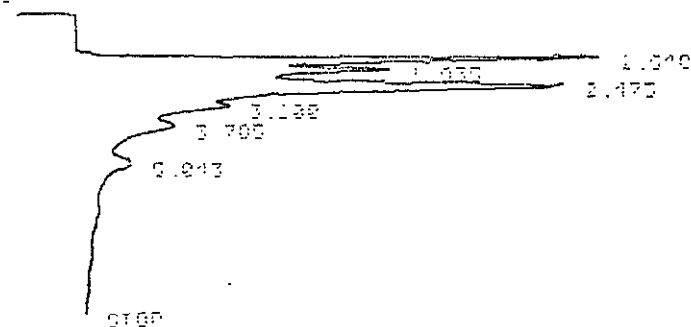
A LIST CELL
 NAME (SAMPLE) = 1111

1.000 = 0.10000
 0.100 = 0
 0.100 = 0.0
 0.100 = 1.0000
 0.100 = 0
 0.100 = 0.100

*FORM 1 DE 0013, PROTEINASE PLASMATICA, 0000

*00010 10 10 10. 01111

* RUN # 10 JAN 1, 1981 12:00:31
 01111



RUN# 10 JAN 1, 1981 12:00:31

NAME

RT	AREA	TIME	WTD W	PERC%
1.000	1000000	00	1000	21.225000
1.030	1000000	00	1000	17.790000
2.170	1000000	00	1000	35.610000
3.130	1000000	00	1000	19.000000
3.700	2000000	00	1700	19.000000
5.813	1000000	00	1000	0.000000

TOTAL AREA = 10000000
 * 01111 10 10 10. 01111

Figura 24. Cromatograma de las muestras de bazo de peces los cuales estuvieron expuestos a una dosis de 10 mg/kg de CQMEPCA a diferentes tiempos, mostrando la primera lectura de siete realizadas.

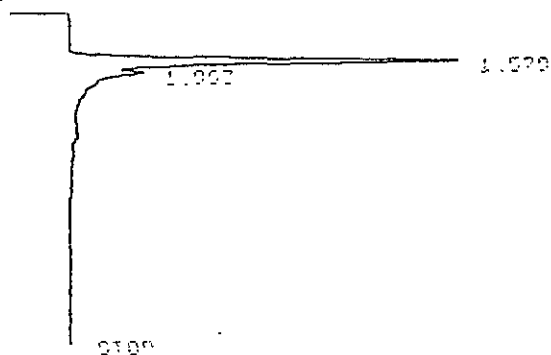
RUN# 20 AUG 21, 1999 14:07:59

ORDER

RT	AREA	TYPE	HIGHT	AREA%
1.063	2000122	PU	1.221	77.56676
1.063	535360	UD	1.357	22.43323

TOTAL ORDER=253538
 MUL FACTOR=1.00000E+00

RUN# 20 AUG 21, 1999 14:10:48
 ORDER



RUN# 20 AUG 21, 1999 14:10:48

ORDER

RT	AREA	TYPE	HIGHT	AREA%
1.070	2000122	PU	1.221	77.56676
1.063	535360	UD	1.357	22.43323

TOTAL ORDER=253538
 MUL FACTOR=1.00000E+00

Figura 25. Cromatograma de las muestras de riñón de peces los cuales estuvieron expuestos a una dosis de 10 mg/kg de CQMEPCA a diferentes tiempos, mostrando la primera lectura de siete realizadas.