



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Maestría en ciencias de la producción y la salud animal

**Desarrollo de una técnica para HPLC para
la detección de decoquinato en leche de vacas
medicadas crónicamente y farmacocinética
del decoquinato vía oral en bovinos.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JULIÁN QUINTERO DE LEONARDO

TUTOR: Héctor Salvador Sumano López.
COMITÉ TUTORAL: René Rosiles Martínez
Norma Gonzáles Monzón

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco los apoyos otorgados por CONACYT mediante el programa de becas en apoyo a la investigación científica, a Pisa Agropecuaria por su apoyo e interés en el proyecto.

A mis padres, que además de su inmenso apoyo les agradezco el haberme enseñado a esforzarme por alcanzar las metas que me propongo, el ejemplo que ustedes me han dado será siempre inigualable.

A mis hermanos Enrique y Emiliano quienes además de la inmensa importancia que tienen para mí me han enseñado que la vida tiene muchas formas de vivirse, gracias pues con sus ejemplos mi visión de la misma se hace mayor.

A mis amigos, con los que he pasado momentos buenos y malos, amigos con los que aprendo y de los que aprendo. Gracias a todos ustedes, son parte también de este logro.

Al Dr. Héctor Sumano por el excelente papel que desarrolló como tutor, por darme la oportunidad de trabajar junto a su excelente equipo de colaboradores.

Al Dr. René Rosiles Martínez por su asesoría y amistad, estoy seguro será duradera.

A Janitzio por enseñarme hasta donde le fue posible del manejo de la cromatografía líquida de alta resolución.

A los doctores de CEPIPSA así como los estudiantes de servicio social que participaron en las ataduras y batallas contra las vacas, gracias a ellas también.

A la UNAM por darme algo de lo que estar orgulloso de mi país.

A los integrantes de mi jurado por sus aportaciones y el tiempo dedicado a este trabajo.

Sin lugar a duda a mi pareja Delary Galindo con quien estoy seguro me falta toda una vida por recorrer. Gracias por tu amor, tu comprensión y por el equilibrio que das a mi vida...

CONTENIDOS	PÁGINA
Resumen	I
Abstract	II
Contenido	III
Agradecimientos	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Descripción de cromatografía líquida de alta resolución.	2
1.2 Panorama actual	2
1.3 Fármacos promotores de producción láctea	6
1.4 Fármacos anticoccidianos como promotores de producción láctea	7
1.5 Ionoforos	7
1.5.1 Monensina	8
1.5.2 Lasalocida	10
1.6 Quinolonas	13
1.6.1 Generación de quinolonas	14
1.6.2 Farmacocinética	14
1.6.3 Toxicidad	15
1.7 Decoquinato	15
1.7.1 Mecanismo de acción	16
1.7.2 Farmacocinética	16
1.7.3 Usos	17
1.7.4 Dosis	19
1.7.5 Residuos	19
1.7.6 Toxicidad	21
1.8 Justificación	21
1.9 Hipótesis	22
1.10 Hipótesis de farmacocinética	22
1.11 Objetivos Generales	23
1.12 Objetivos particulares	23
2 Material y Métodos	24
2.1 Farmacocinética	24
2.2 Concentración de decoquinato en leche	26

2.3. Técnica analítica para la detección de decoquinato	28
2.3.1 Extracción de fase sólida. Características del cartucho sep-pak C18	28
2.4 Implementación de cartuchos Sep-Pak para la extracción de decoquinato de muestras de leche	29
2.5 Procedimiento de extracción de decoquinato en leche	29
2.6 Procedimiento de extracción de decoquinato de suero sanguíneo	30
2.7 Condiciones cromatográficas	30
3. Validación y resultados	31
3.1 Solubilidad	31
3.2 Curva de calibración y Coeficiente de Variación	31
3.3 Repetibilidad	32
3.4 Linealidad	32
3.5 Porcentaje de recuperación	33
3.6 Precisión	33
3.7 Límite de detección de la técnica	33
3.8 Límite de cuantificación	33
3.9 Resultados farmacocinética vía oral del decoquinato	34
3.10 Resultados de concentración de residuos en leche	37
3.11 Cromatogramas	38
4. Discusión y conclusiones	40
5. Literatura citada	42
6. Cuadros y Figuras.	37

Apéndice.

Tabla de niveles máximos de residuos permitidos de fármacos, EMEA, Autoridades sanitarias Canadienses.

Certificado de pureza del estándar de decoquinato.

RESUMEN

DESARROLLO DE UNA TECNICA PARA HPLC PARA LA DETECCIÓN DE DECOQUINATO EN LECHE DE VACAS MEDICADAS CRONICAMENTE Y FARMACOCINETICA DEL DECOQUINATO VIA ORAL EN BOVINOS.

MVZ. Julián Quintero de Leonardo, MVZ PhD Héctor Salvador Sumano López, MVZ MSc René Rosiles Martínez, Dra. Norma Gonzáles Monzón.

El propósito de este estudio fue determinar la farmacocinética del decoquinato en suero sanguíneo el día 1 y al día 21 después de la administración diaria del fármaco a dosis de 10 mg/kg de peso corporal (pc)/día en 10 vacas Holstein-Friesian. Asimismo se determinó la residualidad de decoquinato en leche de vacas medicadas a tres distintas dosis; 2.5 mg/kg pc/día, 5 mg/kg pc/día y 10 mg/kg pc/día durante 21 días consecutivos. Las muestras, tanto de leche como de suero fueron analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El proceso de extracción se desarrolló con base en métodos previos validados en este ensayo y se obtuvo una recuperación de 92% y 97% para leche y suero respectivamente y con un error intra ensayo < 2. La farmacocinética indica que el pequeñas cantidades de decoquinato son encontradas en suero sanguíneo después de su administración oral a dosis de 10 mg/kg pc ($T_{1/2ab} = 1.48$ h) alcanzando su máxima concentración en suero de 0.94 $\mu\text{g/mL}$, 2.33 horas después de la medicación, con un área bajo la curva de concentración vs tiempo de 6.0 $\mu\text{g/mL/h}$. La eliminación puede ser muy rápida con una vida media en suero de 1.61 h. No fue posible detectar decoquinato en suero sanguíneo después de 7 horas posteriores a la medicación. Los valores de la farmacocinética obtenidos el día 1 con respecto a los logrados el día 21 fueron estadísticamente indistinguibles en todas sus variables ($p < 0.001$) lo que indica poca o nula tendencia a acumularse. Las concentraciones de decoquinato en leche siempre estuvieron por debajo de los niveles máximos permitidos por la EMEA, por las autoridades sanitarias canadienses y por la FDA para músculo y vísceras (500 $\mu\text{g/kg}$ y 1-2 ppm respectivamente). Dado su uso empírico como promotor de la producción láctea, estos resultados demuestran que el decoquinato puede representar una alternativa para mejorar la salud de los hatos ganaderos y de esta manera promover un aumento en la producción láctea sin representar aparentemente un riesgo para la salud pública.

Palabras clave: Decoquinato, HPLC, Farmacocinética, residuos, leche y vaca

ABSTRACT

HPLC TECHNIQUE DEVELOPMENT FOR DECOQUINATE MILK DETECTION AFTER ORAL ADMINISTRATION AND ORAL PHARMAKOKINETICS IN MILKING COWS

MVZ Julián Quintero de Leonardo, MVZ PhD. Hector Sumano Lopez, MVZ MSc Rene Rosiles Martínez, Dra. Norma González Monzón.

The aim of this study was to investigate blood serum decoquinat concentration on days 1 and 21 after daily oral administration of the drug at a rate of 10 mg/kg/day in ten Holstein-Friesian healthy milking cows and to define residue profiles of decoquinat in milk after daily oral medication at 2.5 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg during 21 days, in ten cows per group. Milk samples were analyzed weekly for decoquinat by high performance liquid chromatography (HPLC). The extraction process was developed based in previous methods validated in this work. Recovery achieved ranged from 92 to 97% with intra-assay error < 2. Pharmacokinetics (PK) indicate that small quantities of the drug are obtained in blood serum after oral administration of 10 mg/kg with an absorption half life of 1.48 h, a maximum serum concentration of 0.94 µg/mL at 2.33 hours after medication and reaching an area under the curve of concentration vs time of 6.0 µg/mL/h. Elimination from serum appeared to be fast with a half-live of 1.61 h. No decoquinat was found in blood serum 7 h after medication. Oral pharmacokinetic variables obtained on day 1 were not statistically different from those obtained on day 21 in all of variables (p<0.001). Decoquinat concentrations in milk were below the EMEA and FDA accepted maximum residue level (500 µg/kg in viscera and muscle), reaching maximum values on day 7 with the 10 mg/kg dose. Considering the extra-labeled use of this drug as enhancer of milk production, these results may encourage productivity trials of decoquinat in cows with no risk to human health.

Key words: decoquinat, pharmacokinetics, HPLC, residues, milk, cows.

1.- INTRODUCCIÓN.

Desde la aparición de los antibióticos distintas técnicas analíticas se han utilizado con el fin de describir las variables farmacológicas y así determinar el comportamiento de residuos de farmoquímicos. En un principio, estas variables eran exploradas por métodos microbiológicos; sin embargo, estos métodos carecen de la sensibilidad y especificidad requeridas. Desde hace décadas, las técnicas cromatográficas han ido evolucionando desde la cromatografía de capa fina hasta la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés *Hghi Performance Liquid Chromatography*). En la actualidad se cuenta con una amplia gama de detectores, desde el UV hasta el detector de masas. Donde la técnica de HPLC ha sido una herramienta fundamental en la descripción de los procesos farmacológicos y de residuos¹

En la actualidad se tiene como requisito la descripción de la farmacocinética de todo principio activo que se incorpora al quehacer veterinario.

La farmacocinética fue descrita por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a principio de los años 70s como el estudio de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos, sin embargo, hoy en día sería más acertado hablar de la farmacocinética como el destino y proceso completo que ocurre a los fármacos dentro de un organismo vivo². En el cuadro 1 se resumen los objetivos principales que persigue la farmacocinética de manera general.

Cuadro 1. Objetivos de farmacocinética. Domínguez-Hil Hurlé.

Tabla 1
Objetivos de la farmacocinética

- Desarrollar nuevos medicamentos
- Seleccionar la vía de administración
- Diseñar la formulación farmacéutica
- Conocer la capacidad de acceso a órganos y tejidos
- Establecer las vías metabólicas
- Caracterizar los procesos de eliminación
- Diseñar los regímenes de dosificación
- Establecer relaciones con la respuesta
- Mejorar el resultado de los tratamientos farmacológicos

Para llevar a cabo un adecuado control de la cantidad de residuos fármacoquímicos en alimentos de origen animal, las autoridades sanitarias como la EMEA (*European Agency for the Evaluation of Medical Products*) y la FDA (*Food and Drug Administration*) han desarrollado un esquema de residuos máximos permitidos (MRL por sus siglas en inglés Maximum Residue Level) para cada fármaco en específico. Los MRL's son determinados según los niveles de tolerancia del fármaco, concentración activa, tendencias de acumulación, toxicidad y genotoxicidad entre otras variables. Sin embargo, aún hoy en día no existen leyes internacionales que rijan de manera universal los estándares de calidad de todo fármaco. Un ejemplo de esto es la prohibición total de residuos de sulfonamidas en Japón, mientras que la Comunidad Europea permite 0.1 ppm³

1.1 Descripción de cromatografía líquida de alta resolución. (HPLC por sus siglas en inglés).

Los métodos cromatográficos son procesos de separación que se realizan con base en las características físicoquímicas de las distintas moléculas. El principio de la técnica de HPLC es la separación, esto se logra cuando un soluto orgánico o inorgánico se reparte entre una fase móvil líquida y un líquido orgánico adsorbido o enlazado. Al entrar las dos fases en contacto, la mezcla de la muestra con la fase móvil produce una serie de interacciones que llamaremos particiones que se repiten mientras ambas fases se ponen en contacto, dichas interacciones o particiones definen el tiempo de flujo de la muestra, así los componentes separados emergen en el orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retenido es el primero en aparecer mientras que el más fuertemente retenido es el último.

Por otra parte, por fase inversa se entiende a una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar, mientras que la fase normal consiste de una fase móvil no polar y una estacionaria polar.

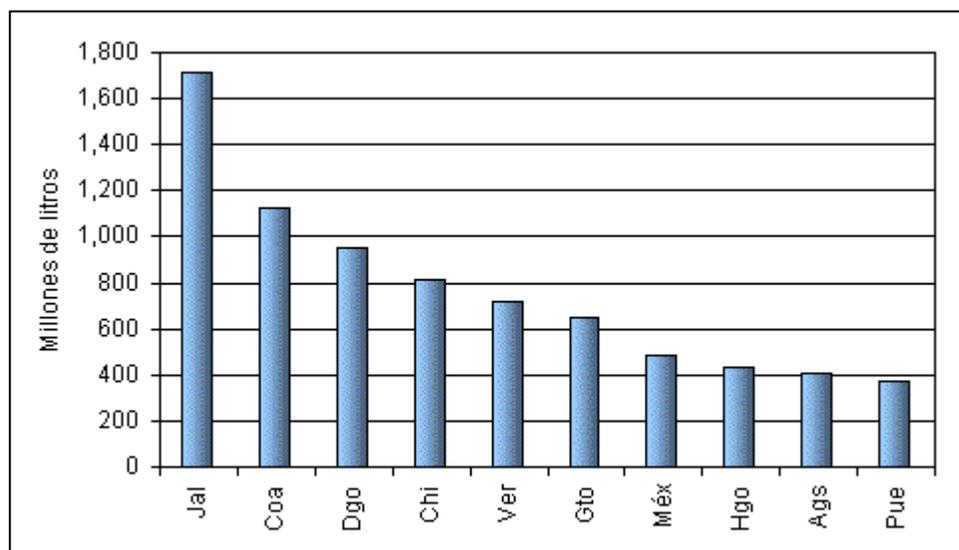
1.2- Panorama actual.

La actividad lechera en México representa la segunda en importancia en el subsector ganadero con 22.8% del valor de la producción y es una de las principales fuentes de

suministro de proteína animal dentro del país. De acuerdo con Mujica y Moura (2003) el consumo *per capita* de leche en el país entre los años 1980 y 1985 fue de 77 kg contra de aproximadamente de 115-120 kg que se consumen hoy en día. Aún así esta cifra es inferior a los 188 kilogramos recomendados por la FAO^a. La SAGARPA estima en sus informes anuales que la producción láctea del país fluctúa entre 7000 y 10 000 millones de litros por año entre 1995 y 2004 respectivamente mientras que el consumo por habitante anual fluctúa entre 70 litros para el año 1990 y 110 litros para el año 2004 (en las figuras 1 – 3 se presentan estos datos de manera resumida). Aunado a la necesidad de mejorar la producción de leche en México se ha tenido un descenso constante anual. Adicionalmente desde 1992 en el precio relativo de la leche, si se le relaciona con el precio del dólar; por ejemplo: el precio de la leche tubo un retroceso del 1.9% en el 2002. En contraste a la situación en México, en países desarrollados como los integrantes de la Comunidad Europea el consumo de leche *per capita* anual es de 320 kg.

Figura 1.-Millones de litros de leche producidas por estado en el 2005.

www.sagrapa.gob.mx



^a http://www.uc.cl/agronomia/2_alumnos/ProyectosTitulos/pdf/AMoura-CMujica.pdf (consultado febrero 2007).

Figura 2.-Millones de Litros producidos por año. 1995-2004

www.sagrpa.gob.mx

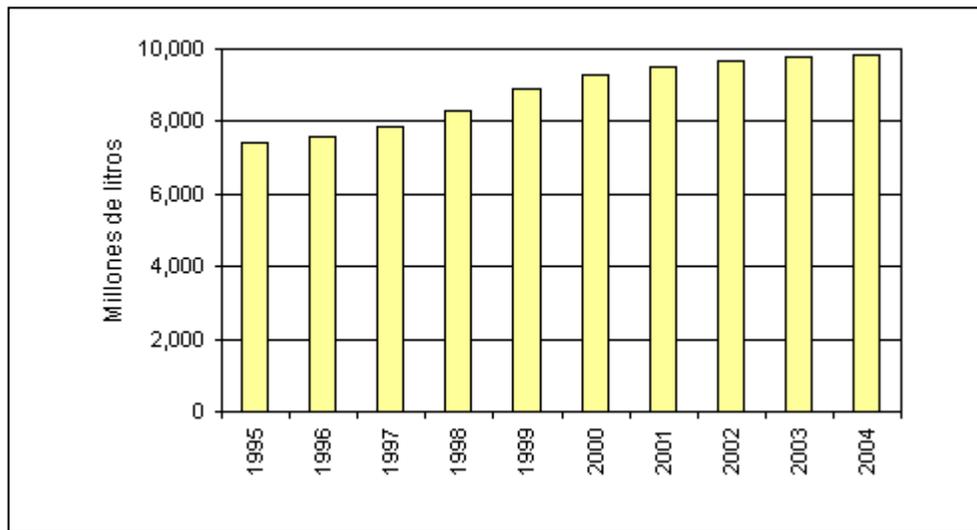
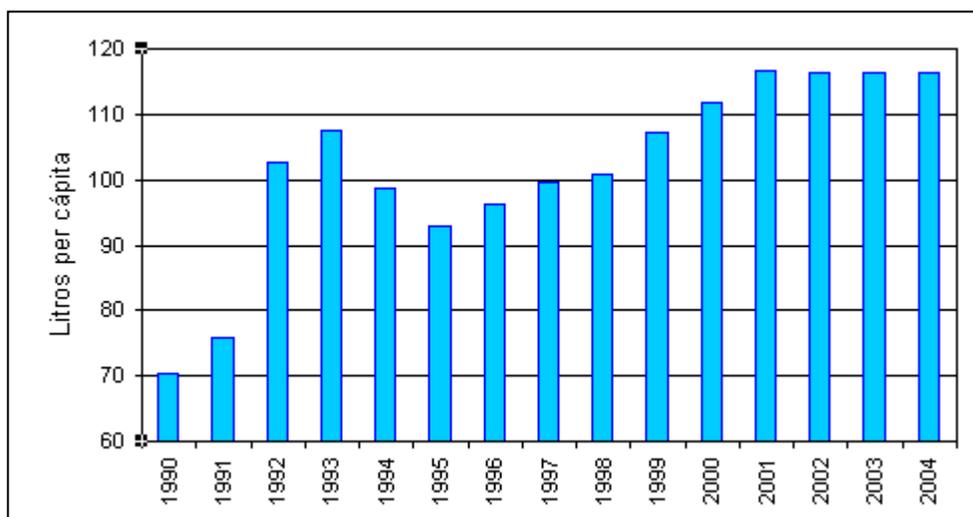


Figura 3.- Millones de litros per capita 1990 - 2004.

www.sagrpa.gob.mx



Ante este panorama, es entendible que en el área de veterinaria una línea de investigación importante es el desarrollo de estrategias para incrementar la producción láctea, encontrándose entre estas la aplicación de fármacos que contemplen distintos mecanismos de inducción. Por ejemplo, la intervención directa de los mismos en el metabolismo del

animal podría lograr dicho propósito; se sabe que al modificar la fermentación ruminal se pueden elevar las cantidades de ácido propiónico, al mismo tiempo que se reduce la deaminación de aminoácidos (AA) en el intestino, aunado a esto es posible reducir la producción de ácido láctico, con lo que se mejora el aprovechamiento energético⁵. Otro enfoque evidente es la reducción de agentes patógenos que, de una u otra forma, merman la salud y con ello, la producción láctea.

Ruiz (2001) menciona que la pérdida de energía en el ganado vacuno sano es de hasta el 50% de la proteína ingerida y que el nitrógeno es eliminado como urea urinaria. Destaca que la falta de aprovechamiento puede verse como objetivo, y buscar así un aumento en la utilización de energía y en la fijación de nitrógeno, hecho que puede ser modificado con el uso de algunos fármacos.

Al respecto, cabe mencionar que en el caso de las aves se cuenta desde hace varias décadas con las quinolonas como coccidiostatos en aves; tal es el caso del buquinolate⁷; y el decoquinato. Las cuales a nivel de campo han sido administrado también como premezcla en campo, particularmente el decoquinato en rumiantes en lactación y se ha estipulado que su administración a dosis de 2.5 mg/kg de alimento da lugar a una mejora en la salud de los animales y por consiguiente en una mejora en la producción de leche. No obstante, la venta no esta autorizada por SAGARPA para el fin descrito. La aplicación inicial de estos fármacos para este fin pudo haber provenido del uso que se le da a la monensina en esta especie como promotor de la producción al modificar la flora bacteriana ruminal y promover cambios en la digestibilidad y disponibilidad de nutrientes^{8,5}. No obstante, esto no se ha demostrado para el decoquinato.

En la especie caprina el decoquinato ha sido probado como promotor de la producción láctea y de crecimiento en cabras, considerando que mejora la salud del rebaño; por ejemplo, la administración de 1 mg/kg de peso corporal a la madre 8 días antes del parto y hasta 30 o 75 días después de este, permitió lograr un mayor peso de los corderos, en comparación de un grupo medicado con sulfadimerazina por tres días: la ganancia de peso fue mayor al séptimo mes siendo 1.4 hasta 4.8 kg, el tratamiento de 35 y 75 días respectivamente, siendo este último aparentemente el mas efectivo existiendo en ambos

esquemas de dosificación un incremento en la ganancia de peso corporal⁹. En cuanto a la producción de leche, el grupo tratado por 75 días después del parto presentó un aumento del 15 y 12% al día 100 y 200 respectivamente, mientras que en el grupo tratado por 35 días no se observó un efecto positivo en la producción láctea. Cabe señalar, que para lograr este efecto la medicación debe ser constante. Por otra parte, en estos estudios no se determinó si el decoquinato aparece en la leche como residuo persistente; en especial debido a que se debe medicar continuamente para lograr el efecto deseado en el aumento de la producción láctea, no existe hasta el momento estudios reportes al respecto.

1.3.- Fármacos promotores de producción láctea.

Los fármacos y nutracéuticos empleados para aumentar la producción láctea se pueden agrupar como sigue:

- Fármacos biotecnológicos: somatotropina bovina recombinante.
- Elementos nutracéuticos (nutrientes), como la urea, los ácidos grasos, melaza, vitaminas, minerales, proteínas y almidones.
- Anticoccidianos y antiparasitarios. Por ejemplo los ionóforos (monensina lasalocida) y recientemente las quinolonas (hoy en día es el caso del decoquinato)
- Hormonales.

De éstos, los anticoccidianos, especialmente los ionóforos son uno de los métodos menos laboriosos y comunes para lograr aumentar la producción láctea; al respecto vale la pena enfocar la atención en el decoquinato, quinolona, que hoy en día de manera empírica está siendo incluido como promotor en bovinos. Deccox® premezcla de Alpharma (decoquinato al 6%) garantiza una mejora en la salud animal y con ello una mejora en la ganancia de peso diaria. En contraste y de manera no aprobada por

SAGARPA se ha popularizado su uso en México para lograr un aumento en la producción láctea^b.

1.4.- Fármacos anticoccidianos como promotores de producción láctea.

Son fármacos antiparasitarios que combaten de manera profiláctica las infecciones por protozoarios del género coccidia^{9,10} y se postula que pueden prevenir abortos producidos por otros protozoarios como la *Neospora sp.*¹². Estos fármacos también han demostrado ser capaces de elevar ciertos índices productivos, se destacan a continuación sus aspectos farmacológicos relevantes.

1.5.- Ionóforos.

Se incorporan al mercado a finales de la década de los 60's para su uso como coccidiostatos en aves y bovinos. Hoy en día, se les utiliza en diversos países, en el ganado lechero como promotores de la producción (ergotrópicos). No obstante, ni en México ni en países como los Estados Unidos su uso no está autorizado con estos fines¹³ (Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine).

Los ionóforos en su uso como ergotrópico poseen diversos mecanismos de acción que aún no están del todo esclarecidos. Una de las explicaciones más aceptadas de su efecto es la modificación a la fermentación ruminal, con la que se obtiene una elevación del ácido propiónico⁸. También se postula que los ionóforos afectan a las bacterias y protozoarios ruminales interrumpiendo el intercambio iónico de la membrana, modificando así los gradientes protónicos y catiónicos^c. Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular más sencilla, por lo que son más susceptibles que las bacterias Gram negativas¹³. Las primeras están relacionadas con procesos de fermentación que dan como resultado importantes cantidades de acetato, butirato y amonio y las segundas están relacionadas con procesos de fermentación que dan como resultado la elevación de los ácidos propiónico y

^b Gerencia salud animal Alpharma.

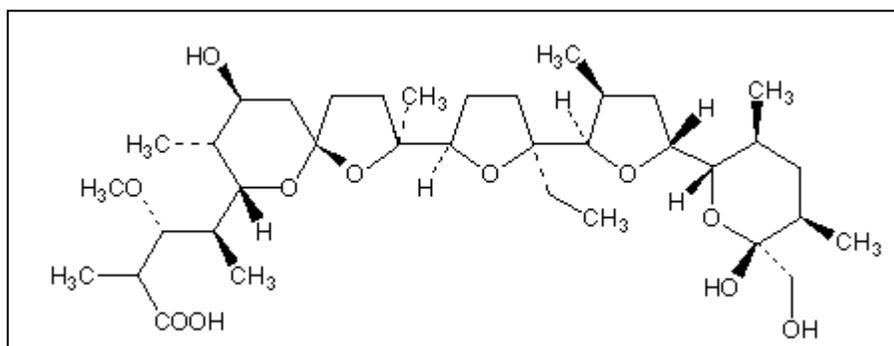
^c www.monografias.com MVZ Adriana Cruz Frias. 2006.

succínico. Adicionalmente, el predominio de gram negativas produce menores cantidades de metano, lo cual redonda en una mejora en la utilización de energía. En resumen, el mayor beneficio de la suplementación de los ionóforos en el ganado lechero, es el cambio en la producción de acetato a propionato y la reducción de la metanogénesis⁵.

1.5.1 Monensina.

Fue el primer ionóforo anticoccidial introducido al mercado en los Estados Unidos en el año de 1971¹⁴. Es producida como producto de la fermentación por el *Streptomyces cinnamomensis*, Su estructura química se ilustran en la figura 4.

Figura 4. Estructura química de la monenisna



Diez años después de su introducción al mercado se publicó el primer reporte acerca de la resistencia generada por los parásitos a la monensina. Según Chapman (1983) la resistencia desarrollada no es un fenómeno estable y se pierde con el tiempo.

Mecanismo de Acción.

Como se mencionó anteriormente, en el ganado bovino tiene una capacidad definida de aumentar la utilización de nitrógeno y de nutrientes como el propionato, efecto que logra a través de la inhibición de las bacterias Gram positivas lo cual altera la fermentación ruminal^{16,6} Se ha demostrado que la administración de monensina en vacas gestantes

incrementa la producción de propionato observando como máximo un aumento hasta de 72% en comparación con un grupo control¹³.

Farmacocinética.

En bovinos, cerca del 40 al 50% de la dosis administrada vía oral se absorbe en el tracto gastrointestinal (GI) misma que es metabolizada en el hígado (metabolismo de primer paso) por oxidasas que le quitan iones de Nitrógeno al ionóforo. La monensina presenta un bajo volumen de distribución, se excreta principalmente en la bilis y en menor cantidad por orina, la porción no absorbida se elimina en heces sin cambio alguno.

Usos.

Además de su efecto antiprotozoario y anticoccidiano se considera como ergotrópico^{d,8}. Según varios autores, inhibe selectivamente las poblaciones de bacterias nocivas, sobre todo las Gram positivas del rumen.

Van der Werf (1998) informa de un aumento en la producción láctea en vacas Holstein y Jersey cuando se les suplementa con 300/mg/vaca de monensina, no detectandose diferencias debidas a la raza de los animales. Se ha documentado que a una dosis de 20 ppm administrada diariamente desde cuatro semanas antes del parto hasta doce semanas posparto eleva la producción láctea en un promedio de 3 kg/día y sin alterar la proporción de proteína de la leche⁵.

En otro estudio llevado a cabo en el Reino Unido se describió que la monensina a dosis de 150, 300 y 450 mg/día no afecta el consumo de materia seca y provoca una elevación de la producción láctea de 2.8 kg/día y 2.5 kg/día respectivamente para las dos primeras dosis. Sin embargo hay una marcada disminución en la cantidad de grasa y proteína dependiendo de la dosis empleada¹⁸.

^d Promotor de crecimiento y/o elevador de índices productivos.

Dosis

Las dosis de monensina varían según su uso, como profiláctico contra infestaciones de *Eimeria bovis* y *Eimeria zuernii* en becerros se emplean entre 100 y 360 mg/becerro /día. En el ganado lechero, la dosis máxima estipulada es de 24 ppm, de acuerdo con las autoridades canadienses¹⁹.

Residualidad.

Es importante resaltar que a dosis de 72, 144 y 240 ppm en el alimento no se han logrado detectar residuos del producto o metabolitos en la leche. Dado que una vaca de 500 kg come 15 kg de alimento seco, equivalente al 3% de su peso corporal, al añadir 150 ppm de monensina en el alimento (150 mg/kg), la exposición del animal al consumir dicho alimento será de 2250 mg/vaca. Esto corresponde a 4.5 mg de monensina por kg de peso corporal. Es importante señalar que la técnica para la identificación de dicho compuesto puede detectar hasta 0.005µg/ml (5 ppb). Es decir, medicar con 240 ppm el alimento equivale a medicar animales de 500 kg a razón de 4865 mg de monensina por día y aun con esos valores no se detectaron residuos¹⁹.

Toxicidad.

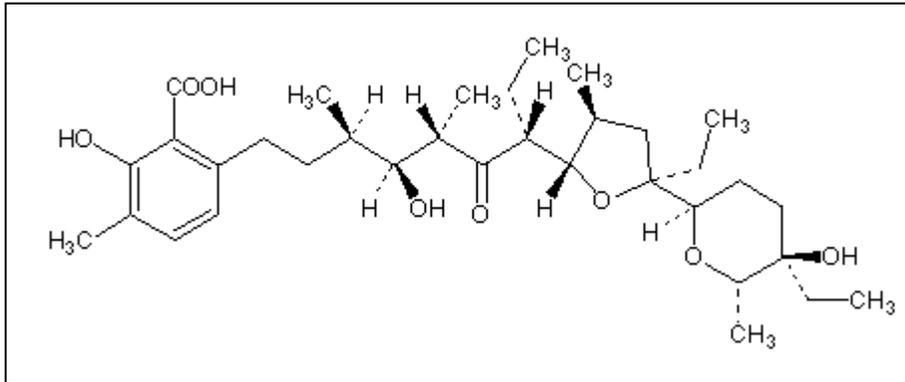
Se ha demostrado toxicidad de la monensina en los bovinos cuando la dosis excede 10 veces la terapéutica. Se representan signos clínicos como letargo, inapetencia y se hace evidente una marcada disminución en la producción láctea. Sin embargo, la intoxicación, aunque común, por errores al momento de realizar las formulaciones o premezclas es reversible en pocos días²⁰.

1.5.2 Lasalocida.

Es un antibiótico del grupo de los ionóforos carboxílicos divalentes, y consiste de una mezcla de sustancias muy parecidas denominadas A, B, C, D, E. Se le utiliza como anticoccidiano y como ergotrópico^{8,21} informándose de su uso en mezcla con decoquinato

para el tratamiento profiláctico de coccidiosis en pequeños rumiantes²². La estructura química de la lasalocida se presenta en la figura 5.

Figura 5. Estructura química de la lasalocida.



Mecanismo de acción.

Su función como promotor de la producción láctea aun no está del todo establecido; al igual que la monensina modifica la fermentación ruminal produciendo un aumento en las proporciones de ácido propiónico¹³. No obstante, la lasalocida difiere de la monensina en la selectividad de transporte de iones en los protozoarios y bacterias, siendo los iones de Ca y Mg los que transporta preferentemente aunque también es capaz de transportar iones de K¹⁹.

Farmacocinética.

No se tienen datos en bovinos, pero en aves es similar a la monensina, absorbiéndose el 40% de la dosis administrada en intestinos, excretándose principalmente por orina. Al igual que la monensina se metaboliza en el hígado¹⁹.

En bovinos lactantes únicamente el 30 % de la energía es capturada en leche y la pérdida de energía es de aproximadamente 30% en heces, 3% en orina, 3% en gases y un 25% en calor¹³ y se postula que la lasalocida puede mejorar dichos valores.

En ratas es rápidamente absorbida cuando se administra oralmente a dosis de 1 mg/kg de peso corporal. Los picos mas altos de concentraciones en sangre se encontraron a las 0.25 horas y fueron de 0.05 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Usos.

Como ergotrópico mejora la ganancia de peso diaria y la conversión alimenticia⁸. Reduce la cantidad de nitrógeno ureico en la leche cuando es comparado su efecto con el grupo control no tratado. Así mismo se demostró que es capaz de inducir una disminución del consumo de materia seca y mejorar la condición corporal y la conversión alimenticia²¹.

Se sabe que reduce la pérdida de peso durante la lactación⁵.

Dosis.

Se utiliza como profiláctico contra coccidiosis en becerros a dosis de 1 mg/kg de peso corporal; según Duffield (2000) la lasalocida administrada a dosis de entre 180 y 360 mg/kg/día no produce cambios estadísticamente significativos en la producción láctea: Sin embargo, a la misma dosis puede reducir la cantidad de grasa presente y aumentar la proteína. En contraste, autores como Erasmus *et al* (1999) han encontrado un aumento en la producción láctea mayor a 3 kg/día en animales tratados con dosis de 10 y 20 ppm diariamente. Por lo que ellos sugieren que la dosis ideal para lograr aumentar la producción láctea es de entre 10 y 20 ppm.

Toxicidad.

Como los demás compuestos de su familia, la lasalocida no debe mezclarse con otros ionóforos ni con antibióticos como la tiamulina, el cloranfenicol la eritromicina y algunas sulfonamidas⁸.

Los efectos tóxicos de la lasalocida no difieren de los mencionados para la monensina. Las dosis tóxicas estipuladas por la EMEA en las distintas especies son: en ratas, administrada vía oral la DL50 es de 122 mg/kg de peso corporal; en aves, administrada vía oral la DL50 es de 84 mg/kg de peso corporal.

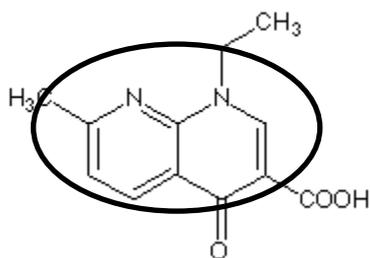
En becerros se han reportado muertes debido a errores de dosificación, conocidos como el error decimal, en el que se dosifica de manera elevada al hacer la premezcla en el concentrado.

1.6 Quinolonas.

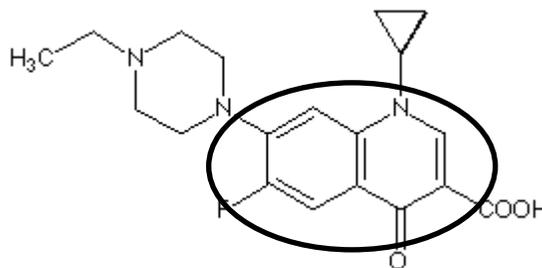
Son compuestos heterocíclicos de escasa o casi nula solubilidad en agua y que desarrollan resistencia bacteriana fácilmente; aún así, continúan en el mercado pues gran número de microorganismos son altamente susceptibles a ellas.

Desde el descubrimiento, en 1962 del núcleo progenitor 1,8 naftinidina, del ácido nalidixico, desarrollado principalmente para el tratamiento de infecciones en vías urinarias producidas por bacterias Gram negativas, las quinolonas han ampliado su margen terapéutico debido a las variaciones en su estructura a partir del mismo núcleo del ácido nalidixico²⁴. Las quinolonas han evolucionando, de compuestos antimicrobianos con limitado margen de acción a los antimicrobianos mas potentes y con mayor margen terapéutico en medicina veterinaria²⁵. Con el paso del tiempo, se han desarrollado modificaciones al núcleo básico con el fin de obtener mejor espectro sin aumentar su toxicidad. No obstante, se reconoce que puede generar fototoxicidad, asociada con la adición de un grupo fluor o un grupo cloro^{24,25}. La evolución de las quinolonas ha seguido básicamente dos caminos paralelos, uno de ellos es del grupo de quinolonas que conserva el núcleo naftahidrón del ácido nalidixico y el otro grupo se refiere a las fluorquinolonas en el cual un átomo de carbono es substituido por un nitrógeno en la posición 8 del núcleo naftahidrón y poseen un grupo fluor en la posición 6 (figura 6).

Figura 6. Anillo naftahidrón de las quinolonas como ejemplo Ac nalidixico y enrofloxacina.



Ac. nalidixico.



Enrofloxacina.

1.6.1 Generaciones de quinolonas.

Se reconoce que las quinolonas de primera generación tienen actividad limitada y suelen ser activas únicamente contra algunas bacterias Gram negativas; sin embargo el espectro se aumenta en la segunda generación, siendo la flumequina la más débil *in vitro* y sin efecto contra micoplasmas y quizá la ciprofloxacina la más potente *in vitro* con importante efecto antimicoplásmico. En el caso de las quinolonas de segunda generación hay actividad importante contra *Pseudomonas* spp, *Legionella* spp, *Pasteurella* spp, *Haemophilus* spp, *Campylobacter* spp, *Mycobacterium* spp, y *Staphylococcus* spp, aunque algunos *Streptococcus* han demostrado cierto grado de resistencia. Indudablemente en la medicina veterinaria las fluorquinolonas de tercera generación son las más importantes como antimicrobianos. Además de ser efectivas contra todas las bacterias mencionadas anteriormente y sin embargo, lo son contra *Brucella* spp, *Coxiella burnetii* y *Plasmodium falciparum*. Su actividad es menor contra *Streptococcus* spp y *Nocardia* spp y casi nula contra anaerobios.

1.6.2 Farmacocinética.

Depende en gran medida de la generación de la que se está hablando, sin embargo existen diversos aspectos compartidos en cuanto a su comportamiento dentro del cuerpo.

Por lo general poseen una farmacocinética similar, sin embargo dichas características puede variar cuando el animal esta lactando²⁶. Por ejemplo en humanos se recomienda la suspensión de la fleroxacin durante la lactancia, dado que se conoce su presencia en leche²⁷. En veterinaria, se ha establecido el paso de danofloxacin, norfloxacin, marbofloxacin y enrofloxacin y ciprofloxacin a la leche de vacas y otras especies^{26, 28, 29} y a menudo a concentraciones terapéuticas³⁰.

1.6.3 Toxicidad.

En ciertos estudios se ha sugerido la posible genotoxicidad de estos agentes antimicrobianos y la ciprofloxacin induce una síntesis aberrante de DNA en linfocitos humanos³¹. Asimismo la ofloxacin y la pefloxacin pueden inducir este mismo efecto mientras que la norfloxacin puede causar toxicidad en hepatocitos de rata *in vitro* a dosis de 400 y 500 µg/ml. Es importante señalar que estas concentraciones no se logran en ningún tejido en dosis terapéuticas y son muchas veces superiores a los MRL establecido para las fluorquinolonas en general.

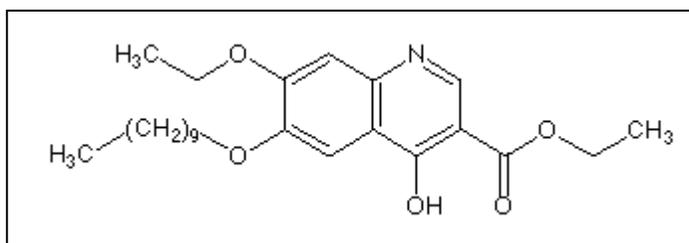
Las quinolonas son sensibles a la luz por lo que pierden su efecto antibacterial, además de generar radicales libres activos. Existe evidencia de que algunas fuorquinolonas tales como enoxacin, lomefloxacin y fleroxacin inducen daño en la membrana celular y al ADN por la fotosensibilización³².

Las quinolonas de primera generación, que carecen de un anillo piperazino, pueden también inducir reacciones de fototoxicidad³³.

1.7 Decoquinato.

Pertenece al grupo de las hidroxiquinolonas también llamadas piridonas. Tiene sabor dulce y en forma pura es un polvo de consistencia cremosa. Como la familia a la que pertenece, es insoluble en agua y solo ligeramente en metanol, acetona, cloroformo y aumenta su solubilidad en etanol. Su estructura química se presenta en la figura 7.

Figura 7. Estructura química del decoquinato.



Fue desarrollado en la década de los 60's como coccidiostato en aves; más tarde, comienza a utilizarse en rumiantes con el mismo fin. En la actualidad existen distintos usos del decoquinato en varias especies, entre los cuales, destaca su uso como promotor de crecimiento y de producción láctea en rumiantes.

1.7.1 Mecanismo de acción.

El mecanismo antimicrobiano no se había podido explicar en detalle, según Ryley (1967) se postula que induce una inhibición de la síntesis de ácido nucleicos de la microbiota indeseable ruminal. Recientemente, mediante técnicas de biología molecular, se postula que el mecanismo de acción se debe en parte a que inhibe la respiración mitocondrial en el parásito y que posiblemente, la resistencia que desarrollan los parásitos a el decoquinato se debe al del desarrollo de una cadena de electrones alterna³⁵. En contraste su mecanismo de inducción láctea no esta del todo esclarecido, de hecho solo está sugerido a nivel pragmático. Con base en las acciones de otros fármacos de efecto similar se puede postular que, al menos en parte, dicha inducción se debe a una disminución de agentes patógenos con lo que mejora la salud de la vaca. No obstante, esto no explica a plenitud la serie de evidencias que parecen apoyar que este fármaco es un promotor del rendimiento.

1.7.2 Farmacocinética.

Dado que no es mucho lo que se sabe del decoquinato en vacas, y que en una búsqueda de información sobre farmacocinética y residuos de decoquinato en bovinos en los principales bancos de datos (VET-CD, Agrícola, AGRIS, MEDLINE, Biological abstracts) no se

encontró estudio alguno (1960 - a la fecha), se presenta un recuento de lo determinado en aves. En esta especie se sabe que el 99% de la dosis administrada puede ser recuperada en heces. Administrado vía oral es absorbido rápidamente, es posible que en menos de una hora³⁵.

Se ha demostrado que administrado en aves de manera crónica el decoquinato no presenta tendencias de acumulación ni residuo en ningún tejido³⁶.

Después de analizar las excretas de aves medicadas con 30 mg /kg /día/ continuamente, el momento en el que la frecuencia de desecho de decoquinato es más alta es al día 14 y se detectan 37 mg / kg (37 ppm) de decoquinato. Los residuos en excretas disminuyen a 2 mg/kg al tercer día de retirar el alimento medicado. Estos residuos son altamente estables aun sometidos a altas temperaturas³⁷ De acuerdo con Craine (1971), en aves se excreta la mayor parte de la dosis consumida de decoquinato en heces.

Utilizando una sola dosis de decoquinato marcado con C₁₄ por vía oral en gallinas se detectó que su excreción urinaria es en cantidades muy pequeñas (0.6 y 1.1% de la dosis). La mayor parte de radiactividad se detectó en heces o permaneció en el intestino a las 24 horas después de su aplicación³⁶. Las concentraciones en bilis fueron hasta treinta veces mayores a las detectadas en orina y en sangre lo que sugiere un importante efecto de primer paso. Como medida de su capacidad de reciclaje en una parvada, al almacenar la excreta contaminada en un cuarto con aves, con luz color roja, las concentraciones del decoquinato variaron, aumentando la concentración de 37 mg/ kg a 45 mg / kg ³⁸.

En aves, los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) no han dado evidencia de la producción de metabolitos³⁹.

1.7.3 Usos.

Se ha demostrado que en bovinos el decoquinato puede ser capaz de evitar el desarrollo de esporozoitos de *Eimeria tenella*, *E. bovis*, *E. zuernii* cuando se administra vía oral en el alimento a dosis de 0.5 mg/kg de peso. Para prevención debe administrarse por al menos 28

días³⁹. También se ha demostrado, en pruebas *in vitro*, que a concentraciones de 0.1 y 0.01 µg / ml es capaz de destruir, los taquizoitos de *Neospora caninum*¹². Por dicha razón se piensa que en campo es capaz de reducir el índice de abortos provocados por dicho parásito.

En cabras jóvenes se ha utilizado para reducir el efecto de diarreas producidas por *Cryptosporidium sp.* y a su vez reduce la liberación de ooquistes⁴⁰. A dosis de 2 mg / kg de peso corporal por día en ovinos puede prevenir abortos por *Toxoplasma sp*¹⁰. En contraste, en aves se ha demostrado que a concentraciones bajas el decoquinato permite a los esporozoitos continuar su desarrollo³⁵ y que administrado al día cero post inoculación puede ser totalmente eficaz en la prevención de los signos clínicos de coccidiosis provocada por *E. tenella*. Sin embargo, cuando se administra en el día 2 o 3 no muestra eficacia ni retardo en la aparición de los signos clínicos. Se concluye que para obtener los mejores resultados se debe administrar 2 o 3 días antes de la inoculación de los ooquistes³⁵. Al parecer su mayor efecto es sobre los esporozoitos y trofozoitos, pero también existe un efecto secundario sobre esquizontes. Los esporozoitos son refractarios a las quinolonas en el lumen intestinal una vez que invaden el epitelio. En contraste se inhibe su desarrollo cuando la medicación fue profiláctica, en otras palabras, si se administra la quinolona después de la infestación coccidiana se desarrollará la enfermedad^{41,42} incluso con consecuencia mortales. Se puede mezclar con ionóforos como lasalocida o monensina para lograr mejores efectos anticoccidianos²².

Recientemente se ha probado al decoquinato como promotor de crecimiento y de la producción láctea en pequeños rumiantes a dosis diaria de 1 mg/ kg/ peso corporal⁹ y más recientemente, en México, se ha indicado para su uso en el ganado bovino a dosis de 1 mg / kg de peso corporal o 100 mg de decoquinato por Kg de alimento (100 ppm) (Deccox® Alfarma). Sin apoyo experimental publicado, pero con el impulso que dan los datos empíricos, se promueve en cuencas lecheras su uso como coccidiostato y promotor de crecimiento. Sin embargo la escasez de literatura formal pone en evidencia que hay aún mucho que estudiar con respecto a su efecto en los rumiantes. No obstante, los clínicos utilizan decoquinato en bovinos de manera casi constante argumentando que reducen la incidencia de aborto por *Neospora sp.*, la infestación de parásitos del género coccidia y

mejora la salud del hato, lo que a su vez se refleja en mejor producción de leche. Como se mencionó anteriormente, el decoquinato ha demostrado ser eficaz contra taquizoitos de *Neospora caninum* en cultivos celulares a concentraciones de 0.1 y 0.01 µg/ml, posee un ligero efecto contra taquizoitos extracelulares mientras que los estados intracelulares son rápidamente destruidos a los 5 minutos a concentraciones de 0.1 µg/ml¹².

1.7.4 Dosis.

Las dosis varían según su uso; como anticoccidiano en aves se utiliza vía oral en premezcla en el alimento a dosis de 40 ppm. En cabras para su uso profiláctico contra coccidiosis se utiliza en rangos que van desde 1 a 4 mg/kg de peso corporal y en becerros se administra desde 0.5 hasta 2 mg/kg de peso corporal. El decoquinato (Decox® de Alpharma) se recomienda en México a una dosis de 1 mg/kg para mejorar la salud del animal y por ende conseguir un aumento en la producción láctea, pero por comunicaciones personales se sabe que el uso difundido es a 2.5 mg/kg. La ausencia de datos al respecto genera entonces el cuestionamiento de si este efecto puede ser dependiente de la dosis y por lo tanto sería conveniente investigar dosis de 2.5, 5 y hasta 10 mg/kg, por que además, las variaciones en el consumo del concentrado medicado para las vacas en producción, puede generar dosis mas elevadas que 2.5 mg/kg.

1.7.5 Residualidad.

La permanencia de los residuos en tejidos de algún fármaco depende obviamente del metabolismo del animal recipiente. Las especies estrechamente relacionadas tienden a metabolizar los fármacos de manera similar. Los estudios que hay del decoquinato han sido realizados principalmente en aves por lo que no es posible aventurar especulaciones y extrapolar las observaciones realizadas a bovinos. De acuerdo con Craine (1971) la acumulación de fármaco no se presenta en ningún tejido en aves cuando son medicadas cada 12 horas con capsulas de 20 mg de decoquinato por tres días. El tiempo estimado de inicio depuración posterior a la inyección IV es a la 1.5 horas en aves y la tasa de recuperación es de 99% y en borrego y del 96%, la mayoría en heces.

En ratas medicadas con decoquinato a dosis de 0.4 mg/kg de peso corporal vía oral en el alimento las concentraciones de residuos en hígado variaron de 0.3 a 0.8 µg/g (ppm), mientras que las concentraciones en músculo fueron de 0.1 a 0.4 µg/g (ppm)²³ lo que hace evidentes las diferencias de biodisponibilidad y depuración entre especies. Así, las diferencias en la tasa de acumulación en tejidos entre aves y ratas pone de manifiesto que no es factible la extrapolación de datos de farmacocinética ni de residualidad del fármaco.

Se ha estipulado que los niveles de residuos permitidos para el decoquinato, según la lista oficial canadiense, publicada el 25 de octubre del 2006 (apéndice 1) son de 1 ppm para músculo y 2 ppm en hígado, riñón, grasa y piel^e. Ferrando (1971) propone un tiempo de retiro en aves medicadas crónicamente de 3 días antes del sacrificio.

En cuanto a bovinos no existen datos de su comportamiento farmacocinético en bovinos y por ende tampoco de su presencia en leche, por lo que es necesario conocer y valorar estos aspectos para su debida legislación y utilización en el mercado nacional como promotor de producción láctea. Lo anterior puede adquirir mayor relevancia si se toma en cuenta que ciertos estudios han demostrado la inducción de genotoxicidad por quinolonas. Por ejemplo al ácido nalidíxico y al ácido oxolínico se le ha descrito como carcinogénicos en roedores⁴⁴. La norfloxacin y la ciprofloxacina han demostrado ser inductoras de daño cromosomal en pruebas *in vitro*⁴⁵. El decoquinato, que comparte características con los demás fármacos de su grupo, como lo es el anillo carboxílico, no ha sido estudiado con respecto a esta variable sin embargo no existen informes publicados de genotoxicidad, teratogenicidad, embriotoxicidad o inducción de tumores. No obstante sería deseable conocer las características de su residualidad en leche.

La EMEA considera al decoquinato como un fármaco de muy baja toxicidad y que no tiende a acumularse. No obstante, para garantizar inocuidad alimentaria, se debe partir del hecho de que si existen limites. Los MRL permitidos por la EMEA en pollos y bovinos en carne, grasa, hígado y riñón son de 500 µg/kg. No existen datos de residualidad del decoquinato en leche de bovinos medicados crónicamente. A este respecto en Canadá, el 25

^e www.emea.com válido hasta julio de 2006.

de octubre del 2006 fue publicado en el *Veterinary Drugs Directorate* la tabla de residuos máximos permitidos (MRL) en Canadá que establece un máximo de residuos en ganado bovino y caprino de 1 ppm en músculo y 2 ppm en hígado, riñón y grasa. El NOEL en perros encontrado fue de 15 mg/kg de peso corporal basado en las observaciones de un estudio en el que se aplicó el fármaco por 12 semanas sin detectar efecto adverso o de otra índole. Por ende, se ha tomado este dato para calcular la ingesta diaria admisible (*Admissible Daily Intake ADI*), con un factor de seguridad de 200^f y se ha llegado a una cifra de ADI = 75 µg/kg (75 ppb) de peso corporal/día para un humano de 60 kg (EMEA). Esto equivale a 4,500 µg/persona. De tal suerte, es factible asumir un MRL de 1 ppm con el consumo diario de 300 g de músculo, 50 g de vísceras 50 g de grasa, 4 huevos y un litro de leche.

1.7.6 Toxicidad.

En el caso de las aves especie este fármaco puede ser administrado hasta 80 veces la dosis indicada sin inducir efectos tóxicos.

Sin embargo después de una larga búsqueda en la literatura, abarcando las bases de datos más importantes, como lo son PubMed, Medline, Agris y Agrícola, no se encontraron reportes de toxicidad del decoquinato. En bovinos, de acuerdo con la EMEA tampoco posee tendencia a acumularse. Uno de los pocos datos que sugieren efecto tóxico moderado es que se le ha relacionado con la reducción en la capacidad migratoria de linfocitos y afectar moderadamente su metabolismo cuando se administra a dosis bajas de 0.5 mg/kg por 25 días, aunque dicho efecto es a un nivel de cuestionable o casi nulo impacto en la salud de los bovinos, según mencionan los propios autores⁴⁶.

1.8 Justificación

El decoquinato es promovido en México para su uso como promotor de la producción láctea en bovinos. La intención de esta investigación es determinar su concentración en

^f Habitualmente el factor de seguridad de la EMEA y la FDA es de 100.

leche administrado vía oral crónicamente y a tres distintas dosis, así mismo conocer su comportamiento farmacológico cuando es administrado por vía oral.

Es bien sabido que quinolonas de otras generaciones llegan a leche en concentraciones significativas al ser administradas incluso con una sola dosificación, por lo que es más importante determinar el comportamiento del decoquinato. Aunado a esto, no existen publicaciones que describan su uso en bovinos administrado de manera crónica y con el fin mencionado. Esto es, no se sabe si su cinética es acumulativa o de primer orden.

Las quinolonas, aunque difieren de generación en generación, comparten estructuras básicas entre ellas. Algunos investigadores han sugerido que estas estructuras pueden provocar efectos tóxicos en distintas especies e incluso genotóxicos. El decoquinato comparte el anillo central de la estructura de su familia y por ello resulta justificable y necesaria la investigación de su farmacocinética bajo un esquema de dosificación diaria y la determinación del comportamiento de los residuos del fármaco en leche de vacas productoras Holstein-Friesian.

1.9 Hipótesis.

Es posible desarrollar un método que permita extraer el decoquinato de la leche, y adecuar una técnica de HPLC para su detección en concentraciones compatibles con los MRL establecidos para el decoquinato. La FDA permite 2 ppm en grasa y vísceras y 1 ppm en músculo, la EMEA permite 500 µg/kg (apéndice 1 y 2).

La baja absorción del decoquinato en el intestino en otras especies, su limitada liposolubilidad y volumen de distribución, permiten postular que aún a dosis elevadas no se rebasan los límites máximos permitidos de este fármaco en leche.

1.10 Hipótesis de farmacocinética.

Por los antecedentes farmacocinéticas en otras especies es factible pensar que el decoquinato tiene una baja biodisponibilidad y rápida depuración en bovinos y que la

tendencia de su farmacocinética no es acumulativa a dosis máxima de 10 mg/kg peso corporal/día vía oral, administrado en el alimento.

De la misma manera es altamente probable que el decoquinato en bovinos se comporte con carácter de un fármaco de primer orden de un compartimento.

1.11 Objetivos Generales.

- Determinar si el decoquinato administrado vía oral a vacas en lactancia, a tres distintas dosis presenta residuos en leche y si estos son menores o mayores que los MRL's permitidos por las instituciones reguladoras.
- Determinar la farmacocinética del decoquinato administrado vía oral con una dosis elevada de 10 mg/kg PC en vacas lecheras al día 1 y después de 21 días de dosificación continua con el fin de determinar si existe acumulación del fármaco.

1.12 Objetivos particulares.

- Desarrollar una técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la detección y cuantificación del decoquinato en plasma y en leche de vacas medicadas crónicamente con el fármaco que tenga un nivel de sensibilidad y de especificidad capaz de detectar niveles de residuos aún menores a los permitidos por las autoridades sanitarias.

2. Material y métodos.

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Estudios, Prácticas e Investigaciones Pecuarias y de Salud Animal (CEPIPSA), ubicado en Topilejo, propiedad de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Este sitio se encuentra ubicado en la Carretera Federal México-Cuernavaca en el Km 28.9 en la Delegación Tlalpan del D.F., en la latitud Norte de 19° 11 y longitud Oeste de 99° 8', a una altura de 2760 nm, con una temperatura promedio de 19° C y una precipitación pluvial de 800 1200 mm.

Con el fin de determinar la presencia de decoquinato en leche de vacas medicadas crónicamente a tres dosis distintas, se utilizaron 30 animales Holstein-Friesian, se dividieron en 3 grupos de 10 animales cada uno quedando de la siguiente manera: al grupo A se le medicó con decoquinato a dosis de 2.5 mg/kg pc /día, al grupo B se le medicó con 5 mg/kg pc/día mientras que al grupo C se le medicó con 10 mg/kg pc/día, todos los grupos continuaron el tratamiento durante 21 días consecutivos. Con el fin de realizar la farmacocinética vía oral del decoquinato en vacas se trabajó únicamente con el grupo C.

2.1 Farmacocinética:

Animales.

Se utilizaron 10 bovinos Holstein-Friesian de 450 kg promedio (\pm 23.5 kg), a los cuales no estaban bajo ningún tratamiento previo al menos durante los últimos 15 días.

Identificación.

Los animales incluidos en la prueba fueron identificados por aretes especiales para ganado de diversos colores con el número del animal y en ocasiones además se contaba con el nombre del animal.

Alimento y agua.

Los animales de la prueba recibieron alimento en buenas condiciones, el cual fue el que

consumieron normalmente antes de la prueba formulado acorde con sus necesidades para desarrollo y producción. El agua que consumieron fue apta para los animales y *ad libitum*. Los animales fueron alojados en un corral especial para vacas en lactación con área de ordeño y manejo adecuadas.

Grupo.

Para realizar el estudio de los valores de la farmacocinética vía oral del decoquinato se trabajo con el grupo C, medicado con 10 mg/kg pc/día.

Método de administración.

Se administró la dosis calculada para cada animal por vía oral mezclándola con agua. Justo después del tratamiento de los animales se observaron y se registraron las reacciones inmediatas. La medicación se llevó a cabo después del ordeño cada mañana durante los 21 días del tratamiento.

Muestreo.

El muestreo de sangre de los 10 animales se realizó por punción en la vena yugular en los siguientes tiempos: hora 0 (antes de la dosificación) y posterior a la medicación en las horas 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 7, 9, 12, 24 del día 1 del tratamiento y del día 21, esto con el fin de determinar patrones de acumulación que podría presentar el decoquinato.

Manejo de las muestras.

Se tomaron 10 ml de muestras de sangre por punción en la vena yugular con tubos sin anticoagulante el día 1 y el día 21 después de medicación diaria, las muestras tomadas se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos con el fin de separar el suero. El suero sanguíneo recuperado se conservó en tubos ependorf y se congelo a -25 °C en las instalaciones del departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Determinación de variables farmacocinéticas.

Se utilizó un programa de computación (PK Analyst, Micromath Scientific Software) para ambos días de muestreos con modelos preestablecidos para establecer el que mejor ajustara a los datos de concentración sérica vs. tiempo, mediante la suma de residuales de acuerdo con los criterios de Akaike. Se eligió el modelo 5 que describe el comportamiento de un fármaco de primer orden de un compartimento ($r \geq 0.92$), cuya ecuación es:

$$\text{Concentración (tiempo)} = \frac{\text{Dosis} \cdot K_{AE} \cdot \text{Tiempo}}{\text{Volumen}} e^{-K_{AE} \cdot \text{Tiempo}}$$

$$\text{Donde } k_{AE} = k_{AB} = k_{elim}$$

Donde: k_{AE} = Constante para la fase de eliminación (β); k_{AB} = Constante de fase de absorción (α); k_{elim} = Constante de eliminación.

Las variables farmacocinéticas obtenidas con el PK analyst fueron AUC = área bajo la curva, AUC_{0-24} área bajo la curva de 0 a 21 h; MRT = tiempo medio de retención; β = constantes para las fases de eliminación; $T_{1/2 \beta}$ = vida media de eliminación $T_{1/2 ab}$ = vida media de absorción, C_{max} , = pico de concentración. T_{max} = Máxima concentración a cero.

Los datos son presentados como media \pm desviación estándar, para las comparación estadística de C_{max} , T_{max} , AUC, MRT y $T_{1/2\beta}$ entre los grupos se utilizó la prueba de ANOVA y t de Bonferroni.

2.2 Concentración de decoquinato en leche:

Animales.

Se utilizaron 30 bovinos Holstein-Friesian de 490 kg promedio (± 24 kg), a los cuales se les confirmó que no estaban bajo ningún tratamiento previo al menos 15 días. Los animales se

dividirán en 3 grupos de 10 animales cada uno. Los animales del grupo A fueron medicados a dosis de 2.5 mg/kg de peso corporal, los del grupo B fueron medicados con 5 mg/kg de peso corporal, mientras que los animales del grupo C fueron tratados con 10 mg/kg de peso corporal.

Identificación.

Los animales incluidos en la prueba fueron identificados por aretes especiales para ganado de diversos colores con el número del animal y en ocasiones también se contaba con el nombre del animal.

Alimento y agua.

Los animales de la prueba recibieron alimento en buenas condiciones, el cual fue el que consumieron normalmente antes de la prueba formulado acorde con sus necesidades para desarrollo y producción. El agua que consumieron fue apta para los animales y *ad libitum*. Cabe mencionar que el grupo medicado con dosis de 10 mg/kg pc/día fue el mismo grupo que se empleó para la farmacocinética oral el día 1 de tratamiento y el día 21 de medicación continua.

Formación de los grupos.

Los animales estuvieron en corrales independientes para cada grupo destinado a las vacas en producción. Se pesaron un día antes del experimento

Método de administración.

Se administró la dosis calculada para cada animal por vía oral mezclándola con agua. Justo después del tratamiento de los animales se observaron y se registraron las reacciones inmediatas.

Muestreo.

Se obtuvieron 100 ml de leche proveniente de los cuatro cuartos de cada vaca al inicio del ordeño, la toma de las muestras se realizó los días 0 (antes de la medicación), 1, 7, 14 y 21 de medicación y los días 1, 2, 4, 8 posteriores a la suspensión de la medicación, a fin de establecer la tasa de excreción de residuos del fármaco en leche y en el caso de que sea detectable se buscará establecer el tiempo en que se vuelve indetectable al detener la dosificación.

Manejo de las muestras.

Las muestras fueron almacenadas en tubos “falcon” y congeladas a -25°C en las instalaciones del laboratorio de toxicología de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia mientras que la técnica de extracción era desarrollada

2.3 Técnica analítica para la extracción del decoquinato.

Se encontraron dos distintos procedimientos de extracción de decoquinato para HPLC^{37,38} dichos procedimientos han sido desarrollados para tejido y para excreta de aves.

Para el desarrollo de dicha técnica de extracción y preparación para inyección en el cromatograma se tomará como base la técnica de extracción utilizada por Hobson-Frohock y Johnson (1983) que se basa en la extracción del fármaco de la matriz utilizando distintos compuestos orgánicos, sin embargo a esta técnica se le hicieron modificaciones como la implementación de una columna de separación sólida (sep-pak) para incrementar la eficacia de la técnica y por ende obtener una mejor recuperación.

2.3.1 Extracción de fase sólida características del cartucho sep pak C18.

Para el procesamiento de la muestra se empleó una técnica de extracción en fase sólida, en la cual la fase estacionaria es de un material de características no polares, mientras que para

la elución de la muestra se utilizan disolventes de diferente polaridad (agua, mezcla de metanol con agua, diclorometano). Los cartuchos empleados fueron de Waters con características C18. La característica C18 se describe como un polímero de 18 carbonos, lo que lo hace no polar.

2.4 Implementación de cartuchos sep-pak para la extracción del decoquinato de la leche.

Para implementar la técnica de extracción se probó la eficiencia de retención de decoquinato de tres distintos tipos de cartuchos de extracción de fases sólida, cada uno de ellos con distinta afinidad por compuestos polares y no polares.

El cartucho elegido fue el cartucho Sep-Pak® Vac 3cc (500mg) C18 de Waters que presentó una retención adecuada del decoquinato.

2.5 Procedimiento de extracción de decoquinato en leche.

A 10 ml de muestra de leche se le adicionaron 10 ml de la solución de extracción que consiste en: etanol- CaCl₂ (2%), 762 ml etanol aforando a 1 litro con cloruro de calcio al 2%. La muestra se agitó vigorosamente durante 5 minutos para posteriormente centrifugar a 2500 rpm (3000 G) durante 5 minutos. Se recuperaron 2 ml del sobrenadante se pasó a través de un cartucho de separación líquida sólida sep pak C18 previamente acondicionado con 2 ml de etanol, seguido por 2ml de agua, el decoquinato retenido fue eluido con 2 ml de etanol, la muestra del disolvente orgánico que funcionó como eluyente del fármaco fue filtrado cuidadosamente en un acrodisco de 0.45 µm de diámetro antes de ser inyectado al cromatograma. Se le realizó una elución mas al cartucho sep-pak con un disolvente orgánico de menor polaridad, en este caso se utilizó diclorometano, al inyectar la solución resultante de esta ultima elución al cromatógrafo el pico resultante de la detección del decoquinato no fue perceptible, lo que indica que la elución del decoquinato del cartucho de extracción sólida con etanol es confiable. Esta técnica brindó un promedio de recuperación de 95 %.

2.6 Procedimiento de extracción de decoquinato del suero sanguíneo de vacas.

La técnica utilizada para la extracción de decoquinato del suero sanguíneo fue muy similar a la establecida para residuos en leche, sin embargo no se utilizaron cartuchos Sep-Pak, por lo que el procedimiento de extracción se detalla a continuación.

Se toma una muestra de 0.5 ml de suero, se le adiciona mezcla 1 ml de etanol con cloruro de calcio (mezcla de extracción), se agita vigorosamente por 5 minutos y se centrifuga por 10 min a 2500 rpm (3000 G), se extrae el sobrenadante y se inyecta la muestra al cromatógrafo previamente filtrado con acrodiscos de 0.45 μm de diámetro para evitar dañar la columna.

2.7 Condiciones cromatográficas

La detección del decoquinato se desarrolló en un aparato Perkin Elmer series 200 equipado con bomba binaria y con un detector de fluorescencia Waters 470 Nillipore utilizando las siguientes longitudes de onda: 314 nm para emisión y 390 nm de excitación. Estas longitudes de onda de su pico máximo de absorción se identificaron mediante un barrido en el espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lamda 2S. El volumen de inyección fue de 30 μl con una velocidad de flujo de 1ml/minuto, la columna utilizada fue una columna C18 de 8 centímetros de longitud y un diámetro interno de 4.6 mm con partículas de 4 μm . El tiempo de retención del decoquinato con estas condiciones fue de 1 minuto. Estos datos se presentan de manera resumida en el cuadro 2.

Cuadro 2. Condiciones cromatográficas.

Fase Móvil	Detector fluorescencia	Vol. de inyección	Columna	Velocidad de flujo	Tr.
EtOH/H₂O ClCa	Em 314 nm Ex 390 nm	30 μl	C18 (25cm) 10 μm tamaño de partícula 3.9 mm diámetro interno	1 ml/min.	\pm 2 min.

3. Validación y Resultados.

3.1 Solubilidad.

Se probó la solubilidad del decoquinato en diferentes medios con el fin de determinar que solventes serían los adecuados para la extracción del decoquinato de ambas matrices. Los resultados de solubilidad se presentan en el cuadro 3. Siendo mayor su solubilidad en etanol.

Cuadro 3. Solubilidad del decoquinato en diferentes disolventes.

	MeOH	EtOH	Agua	ACN
Muy soluble		X		
Soluble	X			
Poco soluble				X
Insoluble			X	

Donde MeOH es metanol, EtOH es etanol y ACN es acetonitrilo.

3.2 Curva de calibración y coeficiente de variación.

Con la finalidad de determinar el coeficiente de correlación y coeficiente de variación (CV) se realizó la curva de calibración para decoquinato en HPLC con tres repeticiones.

Obteniéndose una correlación de: $r > 0.99$. El CV de estas repeticiones fué inferior a 7 %.

La linealidad de respuesta se observó en concentraciones que van de 2 ng / 30µl a 200 ng/30µl.

Los resultados de las inyecciones cromatográficas se presentan en el cuadro 4. Para conocer la respuesta de la concentración de decoquinato se consideró la altura del pico de la concentración del decoquinato.

Cuadro 4. Inyecciones para la curva de calibración

Estándar decoquinato ng/30µl	Altura	Altura	Altura
200	822371	822371	803000
20	86773.9	79742.97	76853.99
2	8001.47	8069.22	8068.46

a	0.34702
r	0.999
b	1.1326

3.3 Repetibilidad

Este parámetro se obtuvo al inyectar en 5 ocasiones tres diferentes concentraciones de decoquinato, el coeficiente de variación de estas respuestas nunca fue mayor de 5 %.

3.4 Linealidad.

Este parámetro se identificó mediante la regresión obtenida con tres diferentes concentraciones de un estándar conocido. Este mismo ensayo se utilizó para la identificación de la concentración en las muestras con la cantidad mínima y máxima utilizadas, cuyo rango siempre incluyó las lecturas de las muestras.

3.5 Porcentaje de recuperación.

La evaluación de este parámetro se realizó con muestras de leches adicionadas con una cantidad conocida de decoquinato, posteriormente se hizo la extracción con el método descrito y se obtuvo una recuperación.

El porcentaje de recuperación obtenido en la extracción de decoquinato de leche fue de 97% mientras que para suero sanguíneo fue de 92%.

3.6 Precisión

Este parámetro se identifica por el CV del Tiempo de retención después de 5 inyecciones de la misma concentración en diferente tiempo. El CV no fue mayor al 3 %.

3.7 Limite de detección de la técnica.

El límite de detección se obtiene incrementando el valor del ruido 3 veces para observar una señal al tiempo de elusión ya determinado. En este caso fue de 5.1 ng/ml. De la misma manera el límite de detección se puede describir como la cantidad del compuesto que se puede detectar mas no cuantificar.

3.8 Límite de cuantificación.

El límite de cuantificación es la concentración mínima identificada, que se obtiene al considerar la cantidad mínima detectable en un volumen conocido, dividido entre el aforo de la muestra y el tamaño de esta; en las pruebas de cuantificación de decoquinato en leche fue de 10.2 ng/ml (ppb). Explicado de otra manera el límite de cuantificación es aquella cantidad del compuesto que como su nombre indica se puede cuantificar, es decir se le puede dar un valor numérico para describir su concentración.

3.9 Resultados de Farmacocinética vía oral

Los resultados obtenidos en las lecturas del decoquinato en suero sanguíneo por HPLC indicaron que la absorción del decoquinato administrado vía oral (VO) en vacas es pobre y que alcanza una concentración máxima en plasma (C_{max}) de $0.94 \mu\text{g/ml}$ a las 2.33 horas posterior a la medicación. El área bajo la curva (AUC) fue de $6 \pm 0.59 \mu\text{g/ml}$ para el día uno y $5.97 \pm 0.52 \mu\text{g/ml}$ para el día 21 a dosis de 10 mg/kg pc/día . De acuerdo con estos datos y posterior a un análisis estadístico, utilizado la prueba de t de Bonferroni, se determinó que no hay acumulación aparente de decoquinato y que su variable de eliminación no muestra una diferencia estadística significativa ($P < 0.001$). Los resultados de las concentraciones de decoquinato administrado vía oral del día 1 y el día 21 se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Media \pm DE de las variables de la farmacocinética en el día 1 y después de 21 días de medicación constante durante 21 días con decoquinato a dosis de 10 mg/kg de peso corporal vía oral.

Variables	Day 1	Day 21
	Mean \pm SD	Mean \pm SD
AUC ($\mu\text{g.h/L}$)	6.0 ± 0.56	5.9 ± 0.6
AUC ₀₋₂₄ ($\mu\text{g.h/L}$)	7.01 ± 0.2	6.95 ± 0.2
AUMC ($\mu\text{g.h/L}$)	28.02 ± 2.5	26.54 ± 2.8
MRT (h)	4.67 ± 0.4	4.49 ± 0.4
β (h^{-1})	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01
$T_{1/2\beta}$ (h)	1.6 ± 0.03	1.6 ± 0.04
$T_{1/2ab}$ (h)	1.48 ± 0.02	1.54 ± 0.1
C_{max} (h^{-1})	0.94 ± 0.2	0.95 ± 0.2
T_{max} (h)	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.3

En las figuras 8 y 9 se representan de manera gráfica las medias \pm desviación estándar de las concentraciones de decoquinato en suero sanguíneo contra tiempo de los días 1 y 21 mientras que en la figura 10 se presentan las concentraciones de decoquinato en suero sanguíneo por individuo en las muestras obtenidas el día 1.

Figura 8.- Concentración de decoquinato en suero sanguíneo vs. tiempo (horas) al día uno de medicación con 10 mg/kg pc.

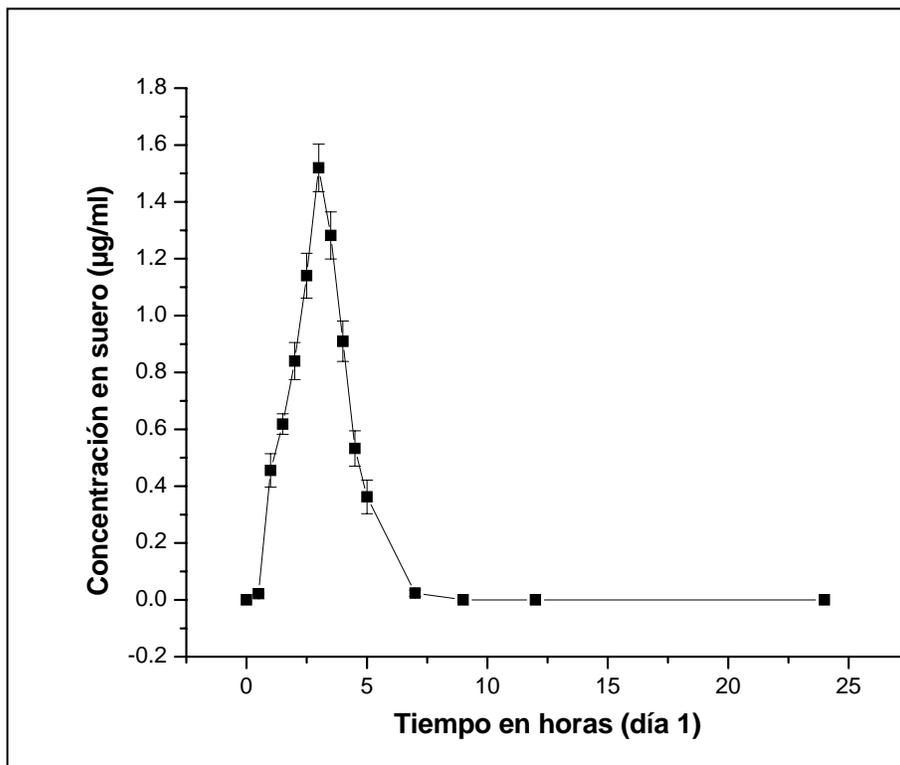


Figura 9.- Concentración de decoquinato en plasma sanguíneo vs. tiempo (horas) al día 21 de medicación diaria con 10 mg/kg pc /día

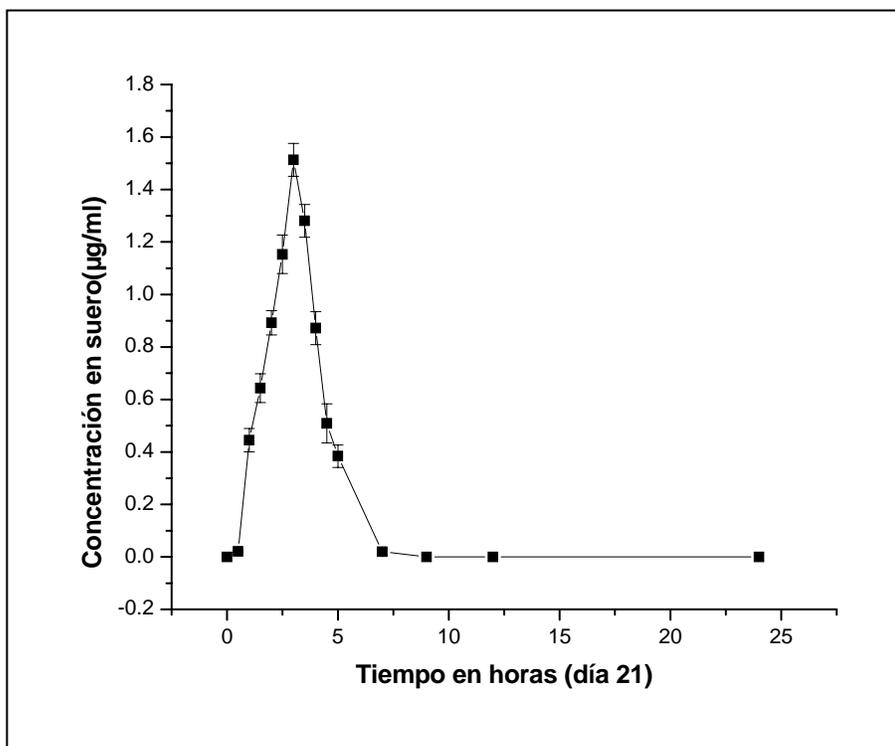
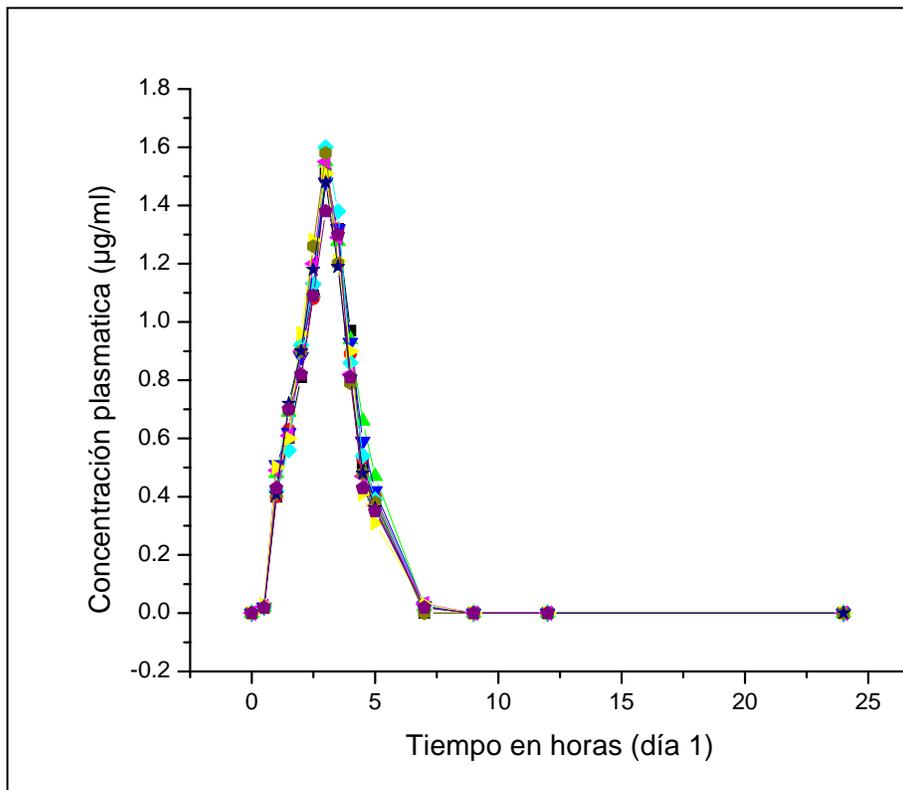


Figura 10.- Concentración plasmática de decoquinato ($\mu\text{g/ml}$) vs. tiempo (horas) por vaca al día 1.



De acuerdo con los resultados obtenidos y analizados mediante el programa mencionado podemos asumir que el decoquinato se comporta como fármaco de primer orden de un compartimento, en la figura 11 se expresan de manera gráfica las características generales de estos fármacos.

Figura 11. Modelo del comportamiento de un fármaco de primero orden de un compartimento.



Donde: K_a es la constante de eliminación, K_e es la constante de eliminación y el 1 describe el compartimento.

3.10 Concentración de residuos en leche.

En el análisis de las muestras de leche colectadas el día 0 (antes de la administración de decoquinato) resultaron negativos.

En el cuadro 6, se presentan las concentraciones de decoquinato identificadas en las muestras de leche de los 3 grupos, siendo evidente que solo fueron detectadas y cuantificadas las concentraciones obtenidas para las muestras del grupo C (10 mg/kg).

Las concentraciones detectadas para el grupo C (medicados con 10 mg/kg pc diario) arrojan una media de 0.012 $\mu\text{g/ml} \pm 0.002$ para el día 7. Para el muestreo del día 14 la media fue de 0.013 $\mu\text{g/ml} \pm 0.004$ y las muestras tomadas el día 21 dieron una media de 0.011 $\mu\text{g/ml} \pm 0.004$. El muestreo del día 1 después de la suspensión de la administración dio resultados negativos para el 100% de las muestras indicando que su coeficiente de eliminación es inferior a 24 horas.

Cuadro 6. Concentraciones de decoquinato en leche de vacas medicadas crónicamente durante 21 días a tres distintas dosis.

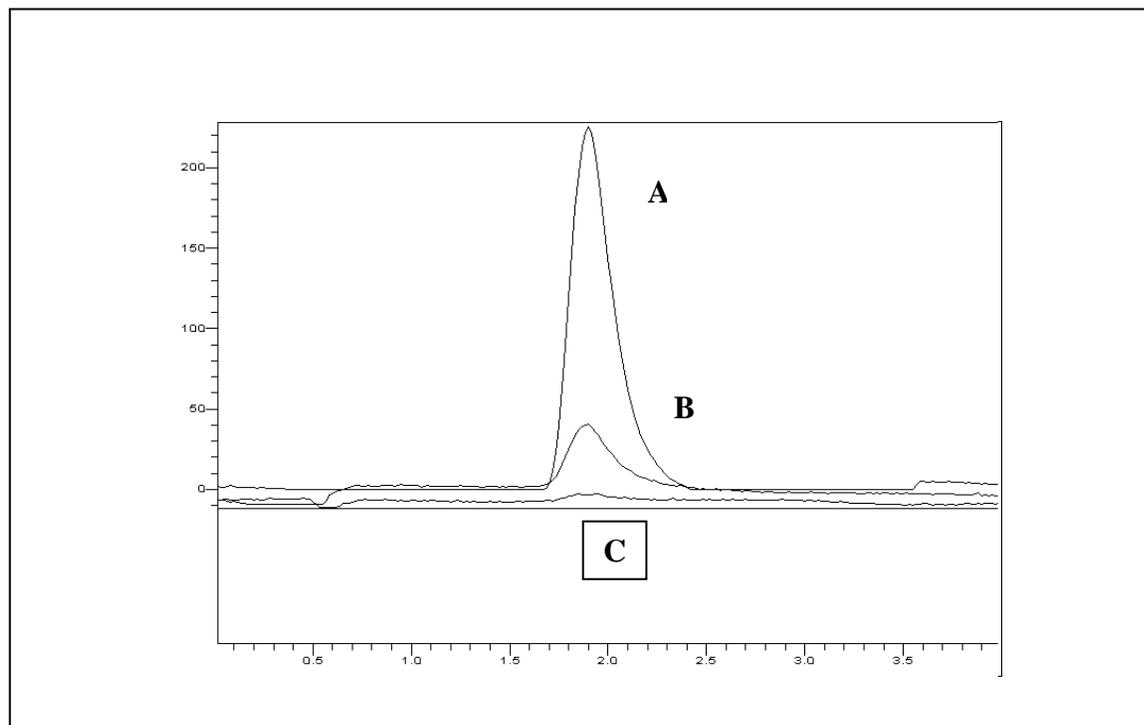
Grupo	Días					
	7		14		21	
	X	± DE	X	± DE	X	± DE
2.5 mg/kg	TNC	-----	TNC	-----	TNC	-----
5 mg/kg	TNC	-----	TNC	-----	TNC	-----
10 mg/kg	0.012	0.02341	0.013	0.00458	0.011	0.00493

Cuadro 6.- Media y Desviación estándar de concentraciones de decoquinato en leche de los tres grupos. (Medicados con 2.5, 5 y 10 mg/kg peso corporal/ día durante 21 días)

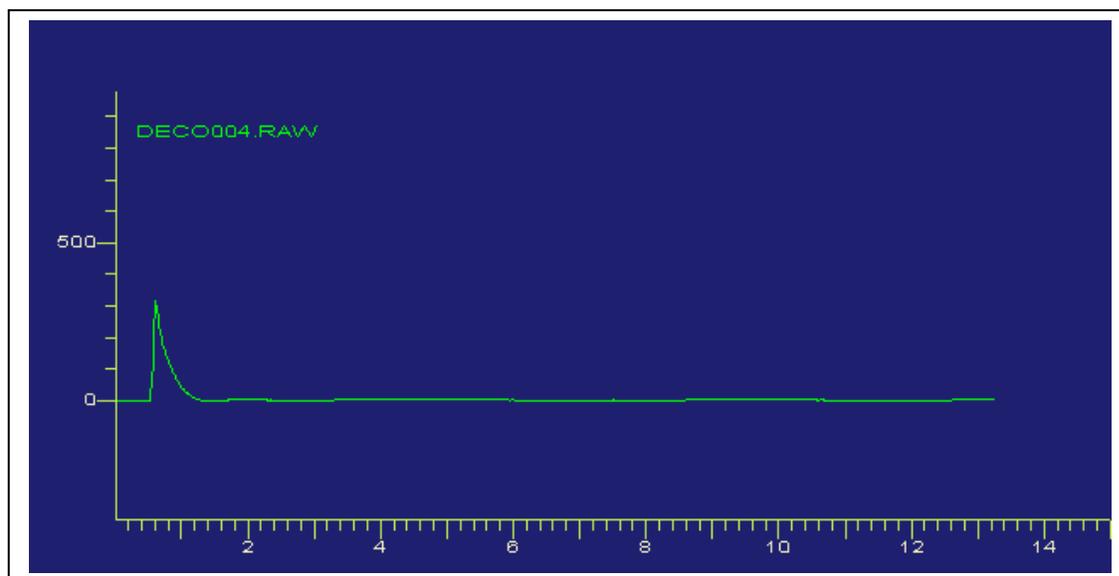
X = media, DE = Desviación Estándar. TNC = Trazas no cuantificables.

3.11 Cromatogramas.

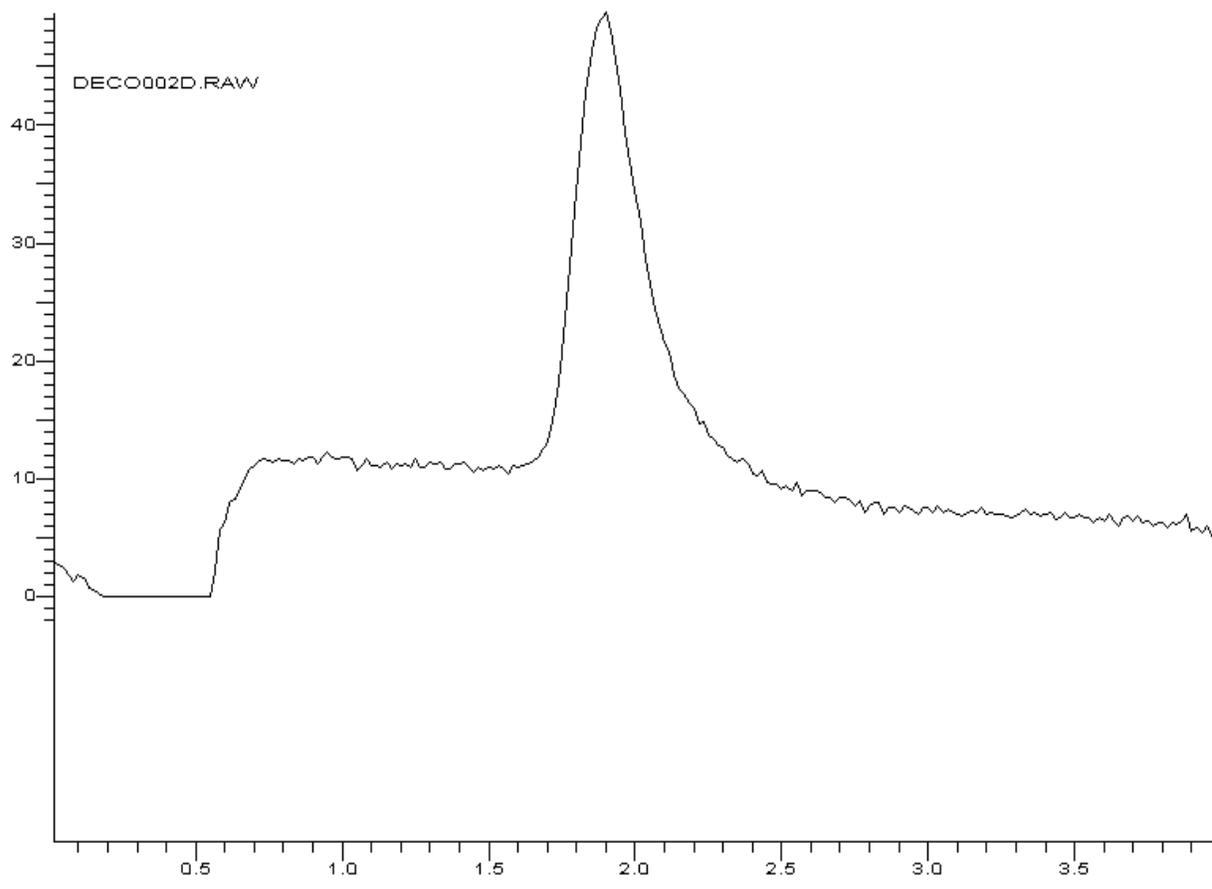
Cromatograma 1. Estándar de decoquinato (A), muestra de leche positiva (C), muestra positiva adicionada (B)



Cromatograma 2. Muestra blanco con tratamiento.



Cromatograma 3. Muestra de leche positiva a decoquinato, grupo C (10 mg/kg/día) tomada día 21.



4. Discusión y conclusiones.

Se desarrolló una técnica de HPLC con el fin de determinar y medir decoquinato en leche cruda y suero sanguíneo, tomando como bases para el desarrollo de la misma la metodología planteada por Hobson-Frohock y Johnson (1983). La extracción de la leche y del suero se realizó utilizando una solución de extracción conformada por etanol en una solución al 62% de CaCl_2 en el caso de la leche seguida inmediatamente por la separación mediante un cartucho C18 sep-Pak de extracción de fases sólida, en el caso del suero se logró sin el uso del cartucho previamente mencionado. La recuperación fue adecuada para ambas matrices, ningún pico adicional fue detectado, lo cual nos permite especular que no hay presencia de metabolitos del decoquinato. Aún así, es necesario realizar estudios profundos para demostrar la presencia o ausencia de metabolitos. Gracias a los estudios realizados, podemos sugerir que el decoquinato medicado vía oral en bovinos resulta en una pequeñísima concentración del compuesto en leche, obteniendo el valor mas alto administrando una dosis de 10 mg/kg pc al día 7. Los valores obtenidos en suero sanguíneo para el día 1 y para el día 21 no presentaron diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$). Este hecho nos indica que el estado estable del decoquinato se alcanza el día 7.

La mayor concentración en leche fue de 0.016 $\mu\text{g/mL}$ (ppm), valor que es permitido por la EMEA y la FDA que aceptan 500 $\mu\text{g/kg}$ 1 -2 ppm para músculo y vísceras respectivamente, sin embargo no existen MRL's determinados para leche. Estos datos sugieren que 1 litro de leche consumida proveniente de vacas medicadas con decoquinato a dosis de 10 mg/kg pc/día crónicamente representa un consumo máximo total de 16 μg , concentración que no representa un riesgo para la salud pública cuando es comparado con la concentración máxima permitida para 300 g de músculo (300 μg). Adicionalmente, la acumulación de decoquinato en leche es inexistente bajo los esquemas de dosificación planteados en este estudio.

Los valores obtenidos en la farmacocinética del decoquinato VO en bovinos indican que la biodisponibilidad y la ausencia de acumulación dentro del organismo, así como la relación entre concentración en suero contra tiempo en el día 1 y el día 21 fueron virtualmente iguales ($P < 0.05$). Con dichos resultados podemos asumir que el uso del decoquinato en

bovinos bajo estos esquemas de dosificación no representa un riesgo para la salud pública. A pesar de esto, es necesario realizar estudios específicos como el uso de marcadores como C14.

En cabras, una dosis diaria de 1 mg/kg de decoquinato administrado diariamente en el alimento ha demostrado aumentar el índice de producción láctea después del día 75 y hasta el día 100 de medicación, de la misma manera ha demostrado mejorar los índices de ganancia de peso en corderos⁹.

Este estudio demostró que la limitada absorción y la rápida eliminación del decoquinato pueden indicar que, si la producción láctea es aumentada, el efecto puede estar basado en un beneficio a las condiciones de salud logrado a partir del control de infestaciones sub clínicas por parásitos del género protozoa en el tracto gastrointestinal *i.e.*¹² o como la monensina, modificando el metabolismo ruminal para mejorar la utilización de energía.

4.1 Conclusiones.

Definitivamente, bajo los esquemas de dosificación y las condiciones en las que se desarrolló este trabajo, podemos asegurar que el decoquinato, administrado vía oral de manera continua en bovinos en lactación, no genera concentraciones en leche que representen un riesgo para la salud pública y dichas concentraciones no rebasan los niveles máximos permitidos por las autoridades sanitarias para músculo, grasa, hígado o riñón.

La adecuación de la técnica fue posible al igual que la extracción del decoquinato de la leche y del plasma, sin embargo es necesario realizar estudios acerca de la posible existencia de metabolitos del compuesto.

En cuanto a la acumulación podemos concluir que el decoquinato no posee tendencias acumulativas y que por ende se podrán establecer esquemas de dosificación constante.

Ahora bien; de esta manera podemos asumir que la administración del decoquinato en vacas en lactación de manera crónica representa una alternativa para buscar incrementar variables productivas en bovinos.

5. Literatura citada.

- 1.-Marzo A, Dal L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotics classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetics applications. *Journal of Chromatography A* 1998;812:17-34.
- 2.- Alfonso Dominguez-Hil Hurlé. Catedrático de la universidad de Salamanca. Capítulo 2 La circulación del medicamento en el organismo. Farmacocinética. Disponible en: <http://mediacsa.no-ip.biz/Descargas/libros/LIBROS/Ciencias/Farmacolog%C3%ADa/La%20circulaci%C3%B3n%20del%20medicamento%20en%20el%20organismo.pdf>
- 3.-Kondo F. Workshop summary: Analytical approaches to detect drugs in animal products. *Veterinary Parasitology* 1996; 64: 139-141.
- 4.- Análisis de las tendencias del mercado nacional e internacional de la leche. Alejandra Moura Vicuña y Constanza Mujica Gleboff
http://www.uc.cl/agronomia/2_alumnos/ProyectosTitulos/pdf/AMoura-CMujica.pdf
- 5.-Erasmus L, Smith I, Muller A. Effect of Lasalocid on Performance of Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 1999;82:1827-1823.
- 6.- Ruiz R, Albrecht G, Todeschi L, Jarvis G, Russell J, Fox D. Effect of the monensin on the performance and Nitrogen Utilization of Lactating Dairy Cows consuming fresh forage. *American Dairy Science Association* 2001; 84: 1717-1727.
- 7.-Spencer C, Engle A Yu c, Finche R, Watson E, Ebetino F Jhonson C. Anticoccidial – activity in a series of alkyl 6,7-dialkoxy-4-hydroxy-3-quinolinecarboxylates. *Journal of medical chemistry* 1966;9:934-936.
- 8.-Butaye P, Deveriese A, Haesebrouck. Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed: Effects of Well Known Antibiotics on Gram- Positive Bacteria. *American Society for Microbiology* 2003;16(2):175-188.
- 9.- P. Moran Fehr, Richard A, Tessier J, Hervieu J. Effects of decoquinatate on the growth and milk performance of young female goats. *Small Ruminant Research* 2002;45:109-114.
- 10.- Buxton D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet. Res.* 1998;29:289-310.
- 11.- Dauschies A, Naugdrowski M. Eimeriosis in Cattle: Current Understanding. *J. Vet. Med.* 2005;B(52);417-427
- 12.- Lindsay DS, Butler, Bayron L, Blagburn. Efficacy of decoquinatate against *Neospora Caninum* tachyzoites in cell cultures. *Veterinary parasitology* 1997;68:35-40.

- 13.- Ipharraguerre I, Clark J. Usefulness of ionophores for lacting dairy cows: a review. *Animal Feed Science and Tecnology* 2003;106:39-57.
- 14.- Ricketts A, Pfefferkorn E. *Toxoplasma gondii*: suceptibiliti and development of resistance to anticoccidial drogs invitro. *Antimicrobial agents teraphy and chemotherapy* 1993. 37 (11): 2553-2363.
- 15.- Chapman HD. *Eimeria Tenella*: experimental development of resistance to monensin in the chicken. *Parasitology*. 1983;89;9-16
- 16.-Castillo A, Kebreab D, Beever D France J. A review of efficiency of Nitrogen utilization in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. *J. Anim. Feed* 2000;9:1-32.
- 17.-Van der W, J H. Jonker J, Oldenbroek. Effect of the monensin on milk production by Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Sciences*. 1998;81:427-433.
- 18.- Duffield T, Bagg R. Use of ionophores in lactating dairy cattle: A review. *Can Vet J*. 2000;41:388-394.
- 19.-Bagg R, Vessie G, Dick P, Duffield T, Wilson J, Aramini J. Milk resiudes and performance of lacting dairy cows administered high doses of monensin. *The Canadian journal of veterinary research* 2004;27:180-185.
- 20.- Gonzales M, Barkema H, Gregory P, Keefe. Monensin toxicosis in dairy herd. *J can. Vet* 2005;46:910-912.
- 21.- Weiss P, Amiet A. Effect of Lasalocid on Performance of dairy Lactaing Dairy Cows. *J of Dairy Science* 1990;73:153-162.
- 22.- Waggoner J, Cecava J, Kazacos K. Efficacy of lasalocid and decoquinate agains coccidiosis in naturally infected dairy calves. *Journal of Dairy Scinence* 1994; 77(1);349-353.
- 23.- Kouba R, Craine E, Ray W. The Presence of Residues in the Tissues of Rats Reciving Decoquinate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1971;19:1234-1237.
- 24.- Ball P. Quinolone generations: Natural history or natural selection?. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 2000;46:17-24.
- 25.- Sumano H. Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Veterinaria México* 1993;24:83-92.
- 26.- Shem-tov M, Rav-On O, Ziv G, Saran A. Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of cows. *J. Vet. Therap*. 1998;21:209-213.

- 27.- Dan M, Weidekamm E, Sagiv R, Portman R, Zakut H. Penetration of fleroxacin in to breast milk and pharmacokinetics in lactating woman. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1993;37 (2):293-296.
- 28.- Shneider M, Vallé M, Woehrlé F, Boisramé. Pharmacokinetics of Marbofloxacin in Lacting Cows Alter Repeted Intramuscular Administration and Pharmacodynamics Against Mastitir Isolated Strains. *Journal of Dairy Science Association* 2004;87:202-211.
- 29.- Soback S, Gips M, Bialer M, Bor A. Effect of lactation on single dose pharmacokinetics of norfloxacin in ewes. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1994;38:2336-2339.
- 30.- Marín P, Cáceres C, Escudero E, Fernandez-Varón Emilio. Pharmacoknetics and milk penetration of ibafloxacin alter intravenous administration to lacting gotas. *The Canadian Journal of Veterinary Research*;2007;71:74-76.
- 31.- McQueen Away M, Queener M, Schluter G, Williams M. Study of potential in Vitro and in vivo Genotoxicity in Hepatocytes of Quinolone antibiotics. *Toxicology and applie pharmacology* 1991; 111: 255-262.
- 32.- Sanchez G, Hidalgo M, Vivanco J, Escobar J. Induced and photoinduced DNA damage by quinolones: ciprofloxacin. ofloxacin and nalidixic acid determined by comet assay. *Memorias del Symposium in print: III ELAFOT, La plata, Argentina 2004. Photochemistry and photobiology* 2005,81: 819-822.
- 33.- Fernandez E, Cárdenas A, Martinez G. Phototoxicity from Nalidixic acid; oxygen dependent photohemolysis. *Fármaco* 1987; 42:681-690.
- 34.- Ryley J. Studies on the mode of action of the quinolone and pyridine coccidiostats. *The journal of the parasitology* 1967;53:1151-1160.
- 35.- Williams RB. The mode of Action of Anticoccidial Quinolones (6-Decyloxy-4-hydroxyquinoline-3 Carboxylates) in Chickens. *International journal for parasitology.* 1997;27(1):101-111
- 36.- Craine E, Kouba R, Ray W. The deposition of decoquinatate -14C administered orally to Chickens. *Journal of agriculture and Food Chemestry* 1971;19:1228-1233.
- 37.- Hobson-Frohock A, Johnson H. Coccidiostat Residues in Poultry Excreta. *Journal of Science and Food and Agriculture* 1983;34:37-44.
- 38.- Hhobson-Frohock A. Determination of decoquinatate in Poultry Feed. *Analyst* 1982;107:1195-1199
- 39.- Fox E. A review, Including Field Safety Studies with Decoquinatate for Prevention. *Modern Veterinary Practice* 1978. *Industry Reports. Bovine coccidiosis:* 599-603.

- 40.- Ferre I, Benito-Peña, García U, Osorno K, Ortega-Mora. Effect of different decoquinat treatments on cryptosporidiosis in naturally infected cashmere goat kids. *The Veterinary Records* 2005;157:261-262.
- 41.- Long P, Millard B. *Eimeria*: effect of the meticlopindol and methyl benzoate on endogenous stages in the chicken. *Experimental parasitology* 1968;23:331-338.
- 42.- Reid W. Efficacy studies of some new anticoccidial drugs. *acta veterinaria*. 1969;38:137-145.
- 43.- Ferrando R, Laurent M, Terlain L, Caude M. Decoquinato: Estimation of Residues in Chicken Tissues before and after cooking. *J. Agr. Food Chem.*, 1971;19:52-54.
- 44.- Charlene 1991
- 45.- Tadashi I, Kunitoshi M, Satomi K, Sasaki Yu F. Genotoxic potencial of quinolone antimicrobials in the invitro comet assay and micronucleus test. 2006;603:135-144.
- 46.- Roth J, Jarvinen J, Frank D, Fox J. Alteration of neutrophil function associated with coccidiosis in cattle: Influence of decoquinat and dexamethasone. *J Vet Res* 1989;50:1250-1253.

Table AIV - continued
Residue Limits for Veterinary Drugs, Food Additives, and Unavoidable Contaminants

Compound	Production Class	Fat (ppm)	Meat (ppm)	Meat By-product (ppm)	Liver (ppm)	Kidney (ppm)	Edible Tissue (ppm)	Reference
Decoquinatate	Cattle	2	1	2	2	2	21 CFR 556.170	
	Goat	2	1	1	1	2		
	Hogs							
	Horse							
	Poultry ⁵	2	1	2	2	2		
	Sheep							
Eggs								
Dichlorvos	Cattle						0.1	21 CFR 556.180
	Goat							
	Hogs							
	Horse							
	Poultry							
	Sheep							
Eggs								
Dihydro-streptomycin	Cattle	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0	21 CFR 556.200	
	Goat	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0		
	Hogs							
	Horse							
	Poultry							
	Sheep							
Eggs								
3,5-Dinitrobenzamide	Cattle						0 ⁵	21 CFR 556.220
	Goat							
	Hogs							
	Horse							
	Poultry							
	Sheep							
Eggs								
Doramectin	Cattle		0.03		0.1		21 CFR 556.225	
	Goat				0.16			
	Hogs							
	Horse							
	Poultry							
	Sheep							
Eggs								
Enrofloxacin	Cattle				0.1 ⁷		21 CFR 556.228	
	Goat							
	Hogs							
	Horse							
	Poultry		0.3 ⁶					
	Sheep							
Eggs								

APPENDIX IV. U.S. RESIDUE LIMITS FOR VETERINARY DRUGS, FOOD ADDITIVES, AND UNAVOIDABLE CONTAMINANTS IN MEAT, POULTRY, AND EGG PRODUCTS

INTRODUCTION

This appendix provides information on the residue limits (tolerances) for veterinary drugs, food additives and unavoidable contaminants in meat, poultry, and egg products, as of March 9, 2001. These tolerances, which are set by the Food and Drug Administration (FDA), are applied by the Food Safety and Inspection Service (FSIS) in its regulatory programs. The official source of these tolerances is Title 21 of the Code of Federal Regulations (CFR): those for animal drugs are found in Title 21, Part 556 (21 CFR 556); those for food additives are found in 21 CFR 172.140; and those for unavoidable contaminants are found in 21 CFR 109.30. This appendix supplies the relevant citation for each tolerance.

FSIS does not permit concentrations of residues in meat and poultry that exceed the tolerances or action levels published in the CFR or the Federal Register. This appendix supplies the relevant citation for each tolerance and action level.

The tolerances and action levels in poultry, meat and egg products by production class are listed alphabetically by compound. These tolerances may be for the parent compound (the original chemical form of the compound given to the animal), or for the compound's metabolites (the chemical forms into which the compound is metabolized by the animal), or for a combination of parent plus metabolites. All tolerances are provided in units of parts per million (ppm) unless otherwise noted. Please note that this appendix has been generated for the convenience of the reader, and if any discrepancies arise between this appendix and the CFR, the values from the latter source should be used.

Unless otherwise indicated, "meat by-products" include kidney and liver.



COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS

DECOQUINATE

SUMMARY REPORT (1)

1. Decoquinatone is a quinolone coccidiostat which can be administered via the feeding stuff at levels up to 1 mg/kg bodyweight/day for up to 28 days for the prevention and treatment of coccidiosis in calves and lambs. It has a long history of use and is an approved feed additive as defined by Directive 70/524/EEC. The substance is used as an in-feed medication as well as a water-soluble medication. Its mode of action is not understood.
2. Decoquinatone is of low acute toxicity by the oral route in a range of avian and mammalian species. It is also of low acute inhalational and contact toxicity.
3. Repeat dose studies of orally administered decoquinatone have been carried out in rats and dogs. Decoquinatone was shown to be a substance of low toxicity, the most severe findings being occasional minor changes in feed consumption, feed conversion, body weight and some organ weights; subdued behaviour was noted in some animals in the 12 week dog study.
4. Decoquinatone is well tolerated by a range of possible target species (cattle, lambs).
5. Reproductive toxicity has been studied in rats and teratology in rats and rabbits. No adverse effects were observed on any of the parameters in the reproductive toxicity study in which the highest dose level was 60 mg/kg bw/day. In the rat teratogenicity studies, there was a slight reduction in foetal weight and a slight increase in the incidence of skeletally retarded foetuses in the high dose group (no effect level 100 mg/kg bw/day), and in the rabbit study there was a decrease in the number of live foetuses in the high dose group (no effect level 60 mg/kg bw/day).
6. Decoquinatone has been tested for mutagenic potential and chromosome aberrations in a variety of bacterial and mammalian cells. It was concluded that decoquinatone was not mutagenic.
7. The 2-year rat study indicates that there was no change in the incidence or type of tumours which developed at the highest dose level of 1000 ppm (roughly 40 mg/kg bw/day).
8. Decoquinatone has not been subjected to any specific tests for immunotoxicity but the findings of the routine toxicity tests do not indicate that decoquinatone is likely to be immunotoxic.
9. Decoquinatone has not been tested specifically with regard to effects on human gut flora and organisms used in the food processing industry. However, it is reported in the open literature that it has no antibacterial action and no effect on protozoa other than coccidia. A study on environmental effects indicated no effects on soil bacteria.
10. The lowest no observed effect level is the 15 mg/kg bw/day based on the subdued behaviour observed in the 12-week dog study and this has been selected for the calculation of the ADI. In recognition of the fact that this study is rather old, a safety factor of 200 has been applied to give an ADI of 75 µg/kg bw/day or 4.5 mg/day for a 60 kg person.

11. Little is known about the absorption of orally administered decoquinatate except that some must be absorbed since residues are found in the tissues. Little is excreted via the urine in all species examined (rat, chicken, cow and sheep). The highest levels of decoquinatate are found in liver and kidney with variable amounts in fat. Only low levels occur in muscle. Of the residue, most appears to be in the form of parent compound with 3 other components occurring in rats; some of these non-decoquinatate compounds also occur in liver and kidney in the target species. The pharmacokinetic studies show that residues have very little tendency to accumulate in the tissues after repeated dosing but no formal residues studies have been carried out using the recommended dosage regime.
12. In the absence of residues studies, but taking into consideration the low toxicity of decoquinatate, the following provisional MRLs (based on decoquinatate as marker residue) have been set for cattle and sheep:

Substance	Marker residue	Animal species	MRLs	Target tissues	Other provisions
Decoquinatate	Decoquinatate	Cattle, sheep	500 µg/kg 500 µg/kg 500 µg/kg 500 µg/kg	Liver Kidney Muscle Fat	Provisional MRLs expire on 1.7.2000

Since there is some evidence that the decoquinatate residues account for at least 50% of the total residue, these MRLs would account for less than 10% of the ADI and the limited residues data which are available indicate that these levels would be reached within hours of drug withdrawal.

13. Several analytical methods are available for the determination of decoquinatate in the tissues of various species. However, most of these are not validated and validation data, preferably for a method which can be used with only minor modifications for different species, are required before the MRLs can be finalised.

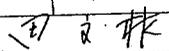
LIST OF QUESTIONS

1. The applicant should provide further information on absorption of orally-administered decoquinatate.
2. The applicant should provide further information on the relationship between the marker residue and total residues.
3. The applicant should conduct residues studies in each species for which an MRL is required a specified in Volume VI of the Rules Governing Medicinal Products in the European Community. If a milk MRL is to be set, these studies should include a milk residues study.
4. The applicant should provide a fully validated method for the analysis of decoquinatate in the tissues of those species for which MRLs are required and this method should be presented in an internationally accepted format.

This information should be provided to the CVMP by 1 July 1999.

AVF CHEMICAL INDUSTRIAL CO.,LTD
 TEL: 0086-531-82350081 FAX: 0086-531-82350085
 E-mail: winnytian@163169.net Website: www.avfchem.com

Certificate of Analysis

NAME		DECOQUINATE	
BATCH NO.	20070302	QUANTITY	10G
EXPIRE	Three years	Packing	BAG
PRODUCTION DATE	MAR.02, 2007	ANALYTICAL DATE	MAR.02, 2007
ITEM		QUALITY STANDARD	RESULT
Identification	IR absorption	Conform	Conform
	UV absorption	Conform	Conform
Residual solvents		Conform	Conform
Aniline compound		Not more than 0.5%	0.25%
Assay		98.0%~101.0%	99.30%
Lose on drying		Not more than 0.5%	0.08%
Melting point		242~245°C	242.4~243.5°C
Sulphated Ash		0.8%~1.2%	0.98%
Single impurity		Not more than 1.0%	0.18%
Total Impurity		Not more than 2.0%	0.25%
Inspector	HAN WANG	Manager	<i>For and on behalf of</i> AVF CHEMICAL INDUSTRIAL CO., LIMITED 

.....
 Authorized Signature(s)