

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE NORFLOXACINA POR HPLC EN LECHE  
DE VACAS TRATADAS POR MASTITIS CLÍNICA.

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
PRESENTA

**JESÚS HERNÁNDEZ PORTILLA**

ASESORES.  
MVZ, MSc. Salvador Avila Téllez  
MVZ, MSc. René Rosiles Martínez

México D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

A mis padres, con eterna gratitud y a quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho, porque gracias a su apoyo y consejos, he llegado a realizar una de mis metas en la vida.

A mis hermanas Fabiola y Jessica, quienes han sido un motor de motivación, y a quienes les digo que luchen por lo que quieren, no hay mayor barrera que las que uno se pone; que este trabajo les sirva de motivación para salir adelante.

Stephania y Diego, son una bendición, Dios los cuide y bendiga.

A mis grandes amigos de la prepa: Karina, Carlos, Miguel, Itzell, Leonardo, Marcela, Claudia y Sandra, gracias por hacer que la estancia en la prepa fuera tan agradable sin duda los lo quiero amigos.

A mis grandes amigos de la vida Esmeralda, Lulú, Radharani, Miguel, Rabindranath y Gabriel los quiero mucho.

A Daniel, tú me lo dijiste, ten paciencia y tranquilo, y ve ya está terminada la tesis, gracias amigo.

Y a todos mis profesores y amigos que me acompañaron en esta etapa día a día.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todas las bendiciones recibidas, por todo lo bueno y todo lo malo, por darme la vida y una familia que me apoyo en todo momento.

A mis padres, la Sra. Isabel Portilla y al Sr Aquileo Hernández por darme educación, amor y una familia, gracias a ustedes he cumplido una meta en mi vida.

A mi asesor el Dr. Salvador Avila Téllez, por darme la confianza y la oportunidad de entrar a su equipo de trabajo, en donde confirme conocimientos y adquirí experiencia.

También quiero agradecer al Dr. René Rosiles Martínez, a quien le agradezco la confianza y el apoyo que me brindo para poder llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. Janitzio Bautista, quien amablemente me ayudo en todos los aspectos, a usted la mayor de mis gratitudes, por todo el apoyo en el laboratorio de Toxicología.

Al MVZ Daniel, por ayudarme y apoyarme cuando lo necesite, gracias por tu amistad y por tus consejos.

También agradezco al MVZ Ismael, por ser un amigo, con quien conviví mucho tiempo y con quien compartí alegrías y corajes durante este proyecto.

Agradezco a María de Lourdes y Esmeralda, por su amistad incondicional y por su cariño,

Al Dr. Francisco Silva, quien siempre estuvo dispuesto a ayudarme en lo que se necesitara.

A laboratorios Brovel, por facilitarnos el material para el desarrollo de este proyecto.

A todos los productores que nos abrieron las puertas de sus establos y quienes amablemente nos facilitaron el desarrollo de este trabajo

Por último y no es la menos importante, agradezco a mi “Alma Mater”, porque en sus aulas me forme y vencí muchas barreras de la ignorancia, además de que ahí tuve la suerte de conocer grandes amigos.

# CONTENIDO

|                        | Página |
|------------------------|--------|
| RESUMEN.....           | 1      |
| INTRODUCCIÓN.....      | 2      |
| MATERIAL Y MÉTODO..... | 7      |
| RESULTADOS.....        | 12     |
| DISCUSIÓN.....         | 15     |
| CONCLUSION.....        | 19     |
| REFERENCIAS.....       | 21     |
| CUADROS Y FIGURAS..... | 25     |

## RESUMEN

HERNÁNDEZ PORTILLA JESÚS. Identificación de residuos de Norfloxacin por HPLC en leche de vacas tratadas por mastitis clínica. MVZ, MSc Salvador Avila Téllez, MVZ, MSc René Rosiles Martínez.

Como acción para proteger la salud pública de la presencia de fármacos en los alimentos, se han establecido Límites Máximos de Residuos (LMRs) en ciertas regiones o países. Estos indican las concentraciones máximas permitidas de un medicamento veterinario, admisible en un producto alimenticio, y que no produce daño al consumidor, y así, garantizar que alimentos de origen animal son inocuos. Por lo anterior es importante conocer la cinética de eliminación de la Norfloxacin en leche de vacas tratadas contra mastitis clínica. El método de identificación de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), es aceptado oficialmente en la identificación de residuos de fármacos en leche. El presente estudio se realizó con 64 muestras de leche obtenidas de 8 glándulas mamarias de vacas con mastitis clínica tratadas con 120 mg de Norfloxacin, 2 mg de Dexametasona y un vehículo c. b. p. 16 ml. Las muestras de leche se colectaron dos veces al día con intervalo de 12 horas, por 4 días. Estas se analizaron por HPLC, encontrando al octavo ordeño (96 horas) concentraciones de residuos de Norfloxacin de 27.34  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , y con la formula de cinética de primer orden se estimó un tiempo de retiro de 104 horas (4.3 días) para alcanzar concentraciones de 0.27  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Norfloxacin en leche de vacas con mastitis; cantidad señalada por Japón como la máxima permisible.<sup>13</sup> Asimismo se obtuvo una vida media de 15.71 horas y un coeficiente de eliminación de 0.0192 expresando el tiempo y concentración.

## INTRODUCCIÓN

La leche es la secreción de la glándula mamaria de los mamíferos, que a nivel nutricional es un alimento de valor biológico elevado.<sup>1</sup> El Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios, de la Secretaría de Salud establece, que la leche destinada para consumo directo y la que se emplee como materia prima en procesos para la obtención de derivados de la misma, debe provenir de animales sanos; y ser leche con calidad sanitaria, libre de toda posible contaminación que ponga en riesgo la salud del consumidor. Así mismo la Norma Oficial Mexicana *NOM-184-SSA1-2002* y la Norma Mexicana *NMX-F-700-COFOCALEC-2004*, establecen que la leche que se emplee como materia prima debe ser sometida a una prueba de inhibidores bacterianos con resultado negativo.<sup>1,2,3</sup>

La calidad sanitaria de la leche, está determinada por características físico-químicas y bacteriológicas que determinan la composición de los productos. Una leche con buena calidad debe reunir las siguientes características: adecuada composición de proteína, grasa, sólidos totales, minerales y vitaminas, libre de microorganismos patógenos y libre de sustancias extrañas como inhibidores químicos, además de poseer adecuadas características organolépticas.<sup>4,5</sup>

La evolución que han tenido las unidades de producción ganaderas hacia sistemas industrializados, en los que una elevada concentración de animales en espacios reducidos es habitual, sumado a una producción muy demandante que

representa un reto fisiológico muy grande para el animal nos conlleva a mayores riesgos en la aparición de enfermedades del ganado.<sup>4,5</sup>

Una de las patologías más frecuentes del ganado bovino productor de leche es la mastitis; padecimiento que se define como la inflamación de la glándula mamaria que por lo general se presenta como respuesta a la invasión de microorganismos y se caracteriza por causar daño al epitelio glandular.<sup>6</sup>

Para la producción de leche con calidad hay que aplicar procedimientos clínicos y zootécnicos correctos en el desarrollo de las diferentes prácticas de manejo que se realizan a diario en la cadena de producción; entre estos procedimientos esta la selección y el uso de los medicamentos empleados para el tratamiento del ganado contra diferentes patologías, siendo necesario conocer el tiempo de eliminación del medicamento aplicado para evitar residuos en leche.<sup>7,8</sup>

Es conocido que los residuos de antimicrobianos son un problema económico para los procesos de industrialización de la leche, pero sobre todo por el riesgo que representan para la salud pública. Actualmente el mercado de lácteos es cada vez más exigente en productos libres de residuos, por lo tanto, obtener leche libre de antibióticos es un elemento esencial para la comercialización.<sup>4,5,9,10</sup>

Es importante señalar que algunas de las sustancias farmacológicas presentes en la leche resisten altas temperaturas, por lo que pueden llegar al consumidor aun después de haber sido sometidas a tratamientos térmicos (pasteurización).<sup>10</sup>

Para proteger al consumidor se han establecido Límites Máximos de Residuos (LMRs) para los alimentos de origen animal. El reglamento 2377/90/CEE lo

define como el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario autorizado en la comunidad o reconocido como admisible en un producto alimenticio que no produce daño para el consumidor.<sup>5)</sup>

Los LMRs se basan en el tipo y cantidad de residuos que se considera que no constituye ningún riesgo toxicológico para la población expuesta. A este respecto la EMEA (The European Agency For Evaluation Of Medicinal Products, Veterinary) y el CODEX *Alimentarius* han establecido límites máximos permisibles para algunos antimicrobianos, pero cabe mencionar que para norfloxacin no se han establecido estos límites; lo que no ha sucedido para otras quinolonas como es el caso de la enrofloxacin.<sup>11,12</sup>

Por otra parte Japón es el único país del que se encontró reporte de LMRs de norfloxacin en leche, permitiendo tener concentraciones residuales de 0.27 a 0.31 µg por kilogramo de leche.<sup>13</sup>

Se sabe que la norfloxacin es un potente bactericida que se difunde bien en leche. Actúa sobre la girasa de ADN en bacterias Gram Negativas y la topoisomerasa IV bacteriana en las bacterias Gram positivas, inhibiendo el súper enrollamiento de ADN, mediado por la girasa A; Adams (2002) menciona que los cationes como el Ca<sup>+</sup> se unen al grupo carboxilo del fármaco y hace disminuir significativamente su actividad, al igual que un pH bajo en el medio. Este medicamento tiene una buena absorción, y en plasma el antimicrobiano tiene una vida media de 3 a 5 horas, excretándose por vía renal.<sup>14,15,16,17,18</sup>

Es importante saber que la forma más utilizada para expresar la velocidad en la que se eliminan los medicamentos es mediante el concepto de vida media ( $t_{1/2}$ ), que se define como el tiempo necesario para que se reduzca un 50% una concentración plasmática determinada. A partir de la vida media de un medicamento, es posible predecir de manera aproximada la cantidad de residuos, así como el coeficiente de eliminación.<sup>19</sup>

### CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

Para la detección de antimicrobianos en leche existe un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que detecta la presencia y cantidad de fármaco. El procedimiento requiere de una fase móvil, que actuará como acarreadora del compuesto a detectar y que consiste en un solvente que es inyectado por la bomba y que fluye continuamente a través de la columna. La fase estacionaria se refiere al líquido de mayor densidad y que se adhiere al soporte de la columna en comparación con el de la fase móvil. La separación de los componentes de la muestra inyectada se debe a la afinidad que tiene cada uno de estos por la fase móvil o por la fase estacionaria. La identificación se obtiene por el tiempo que tarda cada compuesto desde que se inyecta hasta ser detectado, y que se puede confirmar por medio de la adición del estándar a la muestra (este tiempo se refiere al tiempo de retención). Los compuestos son identificados por un detector y, enviados a una interfase que permite la graficación de la información en computadora, ya sea por el área o la altura de la señal del compuesto de interés.<sup>20,21</sup>

## **JUSTIFICACION**

Los residuos de norfloxacin en leche pueden traer como consecuencia la aparici3n de microorganismos resistentes a quien consume esta leche; adem1s de problemas en la manufactura de derivados l1cteos. Por lo anterior se justifica el estudio de cin3tica de residuos de este antimicrobiano as3 como la comprobaci3n de un m3todo para su detecci3n por Cromatograf3a L3quida de Alta Resoluci3n (HPLC).

## **HIPOTESIS**

Posterior al 3ltimo tratamiento por v3a intramamaria de norfloxacin, aplicado por el meato del pez3n, se identificar1n los Residuos M1ximos Permisibles de norfloxacin en leche de vacas con mastitis cl3nica mediante Cromatograf3a L3quida de Alta Resoluci3n hasta el tercer d3a; por ser el tiempo fijado por la casa comercializadora de este producto.

## **OBJETIVO**

Determinar el tiempo de eliminaci3n en leche de los residuos de norfloxacin, aplicada por v3a intramamaria en vaca con mastitis cl3nica.

## MATERIAL Y METODO

El estudio para identificar residuos de norfloxacin en leche se realizó en vacas ubicadas en dos unidades de producción, localizadas en la zona centro del país, a 19° 16' latitud Norte, 99° 06' longitud Oeste, a 2240 msnm, en un clima templado, con una temperatura promedio anual de 14 a 16°C y una precipitación pluvial de 700 a 800mm anuales y un clima tipo C (wo) (w) B(I').<sup>22</sup>

El trabajo se llevó a cabo con muestras de leche de 8 glándulas de vacas en producción; haciendo un muestreo basal y 8 muestreos post tratamiento cada 12 horas. Como criterio de inclusión las vacas no recibieron ningún tratamiento previo con antimicrobianos en las últimas dos semanas; Las vacas seleccionadas presentaron signos de inflamación en alguna de las glándulas mamarias, así como posibles alteraciones en la secreción láctea, identificadas en los primeros chorros de leche al inicio del ordeño. Así mismo se hizo el diagnóstico de mastitis clínica, mediante: a) la exploración física de la ubre, b) prueba de tazón de paño negro, c) prueba de California para mastitis (CMT)<sup>23,24</sup>

Para la obtención de las muestras control, la glándula se preparó como se menciona a continuación:

1. Lavado de pezones con agua potable.
2. Secado de los pezones con toallas de papel limpias y desechables.
3. Se realizó la antisepsia en los pezones con torundas impregnadas de alcohol al 70%, iniciando de la porción distal del pezón hacia su base de este en la glándula, siguiendo el procedimiento descrito por Brown *et al*<sup>25</sup>, después, se

obtuvo una muestra de la secreción de aproximadamente 50ml en un frasco estéril para la “posible” identificación de los medicamentos a estudiar (control).

4. Terminado el ordeño, se procedió a la primera aplicación de un preparado comercial, conteniendo norfloxacin 120 mg, dexametasona 2 mg y un vehículo c. b. p. 16 ml, dosis que se aplicó cada 12 horas, por dos ocasiones más, después de la primera aplicación; finalizando esta actividad se procedió a la aplicación de un antiséptico sobre el pezón.

5. Para el siguiente ordeño, con el procedimiento antes descrito se realizó la primera toma de muestra de leche en un frasco estéril de 50 ml de boca ancha, la cual se almacenó en un congelador a menos 28°C hasta que se analizó en el laboratorio de Toxicología de la FMVZ-UNAM. Este procedimiento se repitió durante 8 ocasiones correspondiendo a los ordeños matutino y vespertino.

Para la identificación de norfloxacin en leche por HPLC se siguió la siguiente metodología.<sup>26</sup> Las condiciones cromatográficas para la detección de norfloxacin en leche son: una columna C<sub>18</sub> RF de 250 mm x 4.6 mm y 5 µm. Utilizando un detector de fluorescencia a una longitud de onda de 314nm de emisión y 390nm de excitación. Para la fase móvil, se utilizó una solución de cloruro de calcio al 62% en alcohol etílico grado HPLC. El flujo fue de 1.0 ml/min.<sup>26</sup>

Para la preparación de la fase móvil se pesaron 20 mg de CaCl<sub>2</sub> que se molieron en un mortero para disminuir el tamaño de partícula; mismos que se diluyeron en 480 ml de agua desmineralizada y aforando a 1000 ml con etanol;

posteriormente se hizo pasar la solución en un filtro de borosilicato y esta quedó lista para ser utilizada.<sup>26</sup>

Para la preparación de la solución madre de norfloxacin o estándar se pesaron 0.60 mg de las sales de norfloxacin, diluidos en 100 ml de la fase móvil; con esta solución se hicieron diluciones 1/10, 1/100 y 1/500 (con la fase móvil). De estas soluciones el volumen de inyección del asa del reodine fue de 20  $\mu$ m. Este volumen de inyección contenía 1.2 ng de norfloxacin en la dilución de 1:10 la de 1:100, 0.12 y la de 1:500, 0.024ng. Para la identificación de norfloxacin se procedió a hacer la confirmación por la adición del estándar en muestras control, así; una muestra positiva, se consideró cuando el tiempo de retención de la señal en la muestra, era idéntico al tiempo de retención de la muestra adicionada con el estándar. Se confirmó como positiva cuando el tamaño de la respuesta en el área de la señal era igual a la suma de la cantidad del estándar y la cantidad de norfloxacin en la muestra. Con estas concentraciones y el tamaño de la señal del cromatograma se fabricó una regresión. La “y” de la regresión es el estimado de la concentración de norfloxacin por muestra que se obtuvo al sumar el valor de la intersección (a) mas el valor de la pendiente (b) multiplicado por el valor de la señal (superficie de área). Con estos datos obtenidos se fabrica un cuadro de las concentraciones de norfloxacin por ordeño considerando el promedio, error típico, desviación estándar, varianza de la muestra, máximos y mínimos y total de muestras. Con estos mismos valores se fabricó una curva de eliminación por el sistema estadístico Origin Pro 7.5.

Preparación de la muestra:

1) Se procedió a descongelar las muestras de leche a temperatura ambiente, 2) se depositó la muestra en un tubo de fondo cónico de 50 ml y se centrifugó a 2500 rpm (revoluciones por minuto) durante 20 minutos, con el propósito de separar la grasa de la leche. 3) Se continúa eliminando la grasa que queda en la parte superior del tubo con la ayuda de una espátula. 4) Una vez que se retiró la grasa, de la muestra se obtiene 1 ml de leche que se lleva a un tubo de ensayo, mismo al que se le añaden 2 ml de metanol para precipitar las proteínas, obteniendo un volumen final de 3 ml. 5) Se realiza una segunda centrifugación a 2500 rpm por 25 min con el fin de separar proteínas y obtener el sobrenadante (porción metanol soluble) de la muestra. 6) Enseguida se obtiene el sobrenadante con una pipeta de 1000  $\mu$ l y se lleva a otro tubo de ensayo previamente identificado y midiendo la parte del botón y la parte del sobrenadante. 7) Seguido a esto, se evapora la muestra obtenida a 40°C en baño maría y con un chorro de nitrógeno, esto con el fin de eliminar el metanol de la muestra y evitar cualquier oxidación con el nitrógeno al proveer un ambiente neutro.

Una vez evaporada la muestra se re suspende en 2 ml de la fase móvil y la muestra queda lista para ser inyectada en el HPLC.

Inyección de la muestra. Se inyectaron 20 $\mu$ l del sobrenadante en el reodine con la ayuda de una jeringa de vidrio. De aquí con la ayuda de un sistema de bombas la muestra es arrastrada junto con la fase móvil a una columna donde

se eluyen los compuestos presentes en la muestra. En el otro extremo de la columna por un detector de fluorescencia se identificó el tiempo de retención y el área de la señal de la norfloxacin presente en la muestra, idénticos a la del estándar. Esta señal que registra la presencia de norfloxacin es integrada por un sistema PE NELSON y una interfase serie 500 de PE.

El tiempo de corrida del cromatograma fue de 5 min, tiempo en el que observaron los picos correspondientes a la quinolona a un tiempo de retención de 80 segundos, seguida de la inyección de la muestra, se hacia una inyección de la solución estándar para lavado del mismo.

Los cromatogramas fueron utilizados para identificar y conocer la concentración del fármaco en la muestra, dándonos el área de la superficie de la respuesta y refiriéndolo a nuestros estándares.

Los resultados de las concentraciones se analizaron para la identificación de los parámetros de vida media, coeficiente de eliminación y tiempo de retiro; estos resultados se obtuvieron por medio de la formula de cinética de primer orden ( $C_r = C_i n^{-at}$ ) donde  $C_r$  = concentración residual,  $C_i$  = concentración inicial,  $n$  = logaritmo natural de  $a$  y,  $a$  = constante de eliminación multiplicado por  $t$ , donde  $t$  = tiempo en horas.

## RESULTADOS

Los resultados del análisis para norfloxacin se agruparon por número de ordeño, las concentraciones obtenidas son el resultado de las 64 muestras de leche de las glándulas tratadas por mastitis clínica, cada 12 horas durante 8 ordeños, cuadro 1.

En el primer ordeño pos tratamiento se obtuvo un promedio de 24204.23  $\mu\text{g}$  de norfloxacin por kilo de leche en 8 muestras estudiadas ( $\pm 37963.12$ ), con un mínimo de 1186.88  $\mu\text{g}$  y un máximo de 87231.33  $\mu\text{g}$ .

En el segundo ordeño, 24 horas después del tratamiento se obtuvo un promedio de 1777.10  $\mu\text{g}$  de norfloxacin por kilo de leche en 8 muestras, dando una desviación estándar de  $\pm 769.58$ , con un mínimo de 791.15  $\mu\text{g}$  y un máximo de 3076.47  $\mu\text{g}$ . Con el fin de tener otro valor de apreciación de la reducción de los valores de norfloxacin se recurrió al porcentaje. Se observó que entre el muestreo anterior y el actual se ve un aproximado de reducción de residuos del 12%.

A las 36 horas se obtuvo un promedio de 1009.40  $\mu\text{g}$  con una desviación estándar de  $\pm 424.18$  encontrándose un mínimo de 599.20  $\mu\text{g}$  y un máximo 1986.85  $\mu\text{g}$ .

A las 48 horas post tratamiento se tuvo un promedio de 593.42  $\mu\text{g}$  con una desviación estándar de  $\pm 306.72$ , teniendo un mínimo de 201.98  $\mu\text{g}$  y un máximo de 1228.34  $\mu\text{g}$ .

Al quinto ordeño (60 horas) se obtuvo un promedio de  $411.06 \mu\text{g} \pm 391.21$  con un mínimo de  $22.73 \mu\text{g}$  y un máximo de  $1201.22 \mu\text{g}$ .

Al sexto ordeño (72 horas) el promedio es de  $121.05 \mu\text{g} \pm 61.93$  con un mínimo de  $52.86 \mu\text{g}$  y un máximo de  $253.20 \mu\text{g}$ .

A las 84 horas (séptimo ordeño) el promedio fue de  $67.07 \mu\text{g} \pm 53.99$  con un máximo de  $181.28 \mu\text{g}$  y, a las 96 horas el promedio fue de  $27.34 \mu\text{g} \pm 21.98$  con un máximo de  $68.47 \mu\text{g}$ ; en el séptimo y octavo ordeño ya se encontró una vaca que no elimina el antibiótico (Cuadro 1).

En los ordeños a través del tiempo de exposición se observó una reducción de la concentración de norfloxacin de aproximadamente el 12% entre el ordeño anterior y el actual.

En el cuadro 2 se tienen las concentraciones de las 8 glándulas tratadas agrupadas por ordeño, indicando cómo se comportó cada glándula. Lo que es trascendental es que se presentó una alta variabilidad ya que la vaca 3 al ordeño 7 ya no presentó residuos, contrario a la vaca 2 que fue en la que se detectó la concentración más altas de residuos al octavo ordeño (96 horas).

En la figura 1, curva de eliminación en tiempo y concentración se aprecia cómo se va eliminando la norfloxacin a medida que pasa el tiempo, ya que en el primer ordeño (12 horas post tratamiento) se tiene una media de  $24204.23$ , al cuarto ordeño (48 horas post tratamiento) la media fue de  $593.42$  y al octavo ordeño (96 horas después) la media que se obtuvo fue de  $27.34 \mu\text{g}$  de norfloxacin por kilo de leche.

De los datos obtenidos por medio de la formula de cinética de primer orden se obtuvieron los siguientes resultados; el coeficiente de eliminación ( $\alpha$ ) es de 0.0192 expresado en tiempo y concentración. La vida media es de 15.71 horas. El tiempo de retiro para llegar de la cantidad encontrada en el ultimo muestreo a la concentración permitida (27 $\mu$ g de norfloxacin / kg de leche a 0.27  $\mu$ g de norfloxacin por kg de leche) es de 104.16 horas (4.3 días) esta última es la cantidad señalada por el gobierno Japonés como la máxima permisible.<sup>13</sup>

## DISCUSIÓN

De acuerdo con la Unión Europea la Cromatografía Líquida de Alta Definición (HPLC) se ha establecido como una técnica oficial para la detección de residuos de antimicrobianos por su precisión y sensibilidad. En la literatura han utilizado este método para identificar diversas quinolonas en leche cruda; así pues señalan que norfloxacin se extrae de manera eficiente a partir de la leche.<sup>27,28,29</sup>

Al identificar la cinética de los residuos de norfloxacin por el HPLC, se encontró una eliminación sostenida, con tendencia a la baja después del último tratamiento. Es necesario señalar que la eliminación de los residuos de norfloxacin se identificó en vacas que padecieron mastitis clínica; tomando en cuenta que los parámetros de eliminación de los fármacos en leche de vaca, siempre se han realizado en vacas sanas.

Se obtuvo una diferencia a la baja de las concentraciones de norfloxacin entre el primero y el segundo ordeño, donde las concentraciones obtenidas fueron de 24,204 µg/kg ( $\pm$  37,963) en la primera muestra y de 1,777 µg/kg de leche ( $\pm$  769) para la segunda. Después de este tiempo hasta las 96 horas (4días) de la última muestra, la eliminación residual de la quinolona se observó con un decremento entre ordeños que variaron en un 12%.

La diferencia del porcentaje de eliminación en tiempos antes señalados se puede explicar porque la norfloxacin tiene una cinética de primero orden; lo que implica a mayor concentración del fármaco, la eliminación será proporcionalmente más rápida en relación al tiempo.<sup>16,17,18,30</sup>

Por otra parte el grado de eliminación debe estar condicionado por la cantidad de leche producida y por el grado de severidad de la mastitis, donde la producción de leche se vio disminuida en las glándulas tratadas, dándose cambios macroscópicos en la secreción láctea, cambios que a las 48 horas se modificaron al progresar favorablemente el curso de los casos clínicos, a juzgar por la desaparición de los signos macroscópicos identificados en leche al inicio del ordeño.

Según la ficha técnica del medicamento estudiado, la leche debe ser desechada hasta por 72 horas (3 días) después del último tratamiento aplicado; esto implica que al cuarto día esta leche ya puede ser apta para los fines que decida el ganadero. No obstante en el presente trabajo a este tiempo se identificó 121 µg de norfloxacin por kilogramo de leche; y que hasta después de 4.3 días se encontraron residuos de 0.27 µg/kg de leche (104 horas). Esta cantidad en Japón se sugiere como concentración máxima permisible de residuos de norfloxacin en leche.<sup>13</sup>

Con base en los resultados obtenidos, es válido considerar los tiempos de retiro en leche, según el grado de severidad de la mastitis tratada, así pues el tiempo de eliminación puede variar dependiendo de la severidad del mismo; por otra parte mencionan que vacas con cuadros de mastitis leves a moderadas dejan de liberar residuos en un menor tiempo, contrario a vacas con cuadros de mastitis severos, que liberan el antimicrobiano por tiempo prolongado.<sup>31,32</sup>

Para la Unión Europea y el Codex *ALIMENTARIUM*, no se encontró mención de los Límites Máximos de Residuos de norfloxacin; ya que algunos países no trabajan con esta quinolona en la línea veterinaria; solo la utilizan en la línea humana.<sup>11,12</sup>

En México la Norma Oficial Mexicana *NOM-184-SSA1-2002* y la Norma Mexicana *NMX-F-700-COFOCALEC-2004*, regula la inocuidad de la leche, y mencionan que la leche debe ser libre de inhibidores bacterianos, pero no indican que cantidad del antimicrobiano está permitido.<sup>2,3</sup>

Esperar que la leche y otros alimentos estén libres de todo inhibidor bacteriano, es deseable, pero probablemente difícil de lograr en lo general. No obstante, como Médicos Veterinarios una de nuestras responsabilidades es cuidar la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos que se ofrecen al consumidor, y por ello los resultados de este trabajo son un aporte al conocimiento que podrá ser útil para la producción de leche con inocuidad; y un factor de motivación para que se investigue sobre este tema que es tan importante en salud pública.

## CONCLUSIONES

1) Con el procedimiento aplicado, y los cuadros de mastitis con diferentes grados de severidad inflamatoria, a las 72 horas (3 días) posteriores al último tratamiento, la cantidad de la quinolona identificada en las muestras de leche estudiada fue de 121.05  $\mu\text{g}$  de Norfloxacin por kilo de leche; concentración que no puede ser apta para consumo humano.

2) Se calculó un estimado que a las 104 horas (4.3 días) de aplicado el último tratamiento, la concentración del fármaco identificada fue de 0.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  concentración señalada por Japón como Límite Máximo Permisible (LMR`s) de Norfloxacin en leche, destinada para consumo humano.

3) Con base en los resultados logrados, la leche de vacas tratadas contra mastitis clínica de este estudio, será apta para consumo, después del quinto día de la aplicación de Norfloxacin y considerando como criterio que la vaca se halla recuperado de la mastitis.

## BIBLIOGRAFIA

1. Figueroa MLG. Cuenta de células somáticas en leche de cabra mediante las pruebas diagnosticas, prueba de California, Wisconsin, cuenta microscópica y contador infrarrojo. (tesis de licenciatura). México D.F. FMVZ, UNAM, 2008.
2. Norma Oficial Mexicana, Productos y servicios. Leche, formula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias”. NOM-184-SSA1-2002. (Publicado en el Diario Oficial de la Federación: 10, 23, 2002).
3. “Norma Mexicana Sistema Producto Leche – Alimento – Lácteo – Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, Sanitarias y métodos de prueba”. NMX-F-700-COFOCALEC-2004. (Publicado en el Diario Oficial de la Federación: 23, 06, 2004).
4. Parra TMH, Peláez SL. Los residuos de medicamentos en leche. Problemática y estrategias para su control. Cooperación colombiana de investigación agropecuaria. Neiva 2003.
5. Montero AA. Aplicación de métodos microbiológicos en la detección de residuos de antimicrobianos en la leche (Tesis de maestría) Universidad Politécnica de Valencia 2008.
6. Avila TS, Gutiérrez CAJ. Producción de leche con ganado bovino. 2ª edición. Manual moderno. México 2010

7. Schalm WO; Carrol EJ and Jain NC. Bovine mastitis. Philadelphia: Lea & Febiger. 1971.
8. Gray DM, Schalm OW. The mastitis variable in milk yield as estimated by the California mastitis test. *Am. J. Vet. Res.* 23:541. 1962.
9. "Suhren G. Influence of residues of antimicrobials in milk on commercially applied starter cultures-model trials. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 1996, 49: 131-149.
10. Roca MMI. Termoestabilidad de sustancias antimicrobianas en leche (Tesis Doctoral) Valencia (España). Universidad Politécnica de Valencia, 2008.
11. The european Agency for Evaluation of Medicinal Products, *Veterinary Medicines Evaluation Unit (EMEAMRL/152/96-FINAL)*, 1996.
12. Comisión del Codex Alimentarius. Límites máximos de residuos para medicamentos veterinarios en los alimentos. 2009;02:1-38
13. Shiang CC, Hsien WW. Simultaneous determination of 18 quinolone residues in marine and livestock products by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *Journal of food and drug analysis.* 2010; 18: 87-97.
14. Sumano LH, Gordon WB, Mateos TG. Bases farmacológicas del tratamiento de la mastitis bovina. (estudios recapitulativos). *Revista Veterinaria México*, 1996.
15. Sumano LH. *Farmacología clínica en bovinos.* Edith. Trillas. México. 1996.

16. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Vol. II, 10 ed. Mc Graw Hill. México 2003
17. Adams HR. Farmacología y terapéutica veterinaria 2<sup>a</sup> ed. ACRIBA, S.A. Zaragoza España 2003.
18. Sumano L. H. Quinolonas y fluorquinolonas en medicina veterinaria. (Artículo por invitación). Revista Veterinaria México, 1993.
19. Sumano LHS, Ocampo CL. Farmacología veterinaria, Tercera ed. Mc Graw Hill México 2006.
20. “Angeles M. J. L. Desarrollo y validación del método por cromatografía líquida de alta resolución para la identificación de rifaximina en leche de vacas. (Tesis de licenciatura). México D. F. FMVZ, UNAM, 2008.
21. Willard, HH., *Instrumental Methods of Analysis*, Wadsworth, Inc., U.S.A., 1988. Handbooks of Amersham Pharmacia Biotech: *Ion Exchange Chromatography, Affinity Chromatography, Hydrophobic Interaction Chromatography, Reversed Phase Chromatography*, Sweden, 2002.
22. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kopen. 4<sup>a</sup> ed. UNAM. México, D.F. Instituto de Geografía. 1989.
23. Avila TS. Producción intensiva de ganado lechero. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria. Edith. Continental. México. 1984.

24. Avila TS, Valdivieso NG. Fisiopatología de la glándula mamaria y ordeño. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (libro en CD- ROM). Centro de Cómputo de la FMVZ. UNAM. FMVZ-UNAM; 2001.
25. Brown W R, Morse I G, Newbould S H F. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis. National mastitis council, inc, Washington D.C. 1969.
26. Quintero LJ, Rosiles R. Oral pharmacokinetics and milk residues of decoquinatate in milking cows. J vet. Pharmacol. Therap. 2008;32:403-406.
27. Marazuela MD. Multiresidue determination of fluorquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. Journal of Chromatography A. 2004 [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma).
28. Christodoulou AE, Samanidou FV. Multiresidue HPLC analysis of ten quinolones in milk after solid phase extraction: Validation according to the European Union Decision 2002/657/EC. J. Dairy Sci. 2007;30:2421-2429.
29. Córdoba BM, Córdoba DM. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of norfloxacin and its application to stability studies (photo-stability study of norfloxacin). Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 1999;18: 919-926.
30. Bertram G, Katzung. Farmacología básico y clínica. Decima ed. Manual moderno. México 2007.

31. DSM, texto consolidado producido por la empresa DSM Delvotest. Productos. Detección de fármacos en leche. Disponible en: [http://www.dsm.com/le/nl\\_NL/delvotest/html/home.htm](http://www.dsm.com/le/nl_NL/delvotest/html/home.htm)
32. Gips M, Soback S. Norfloxacin pharmacokinetics in lactating cows with sub-clinical and clinical mastitis. J vet pharmacol. therap. 1999;22:202-208.

## CUADROS

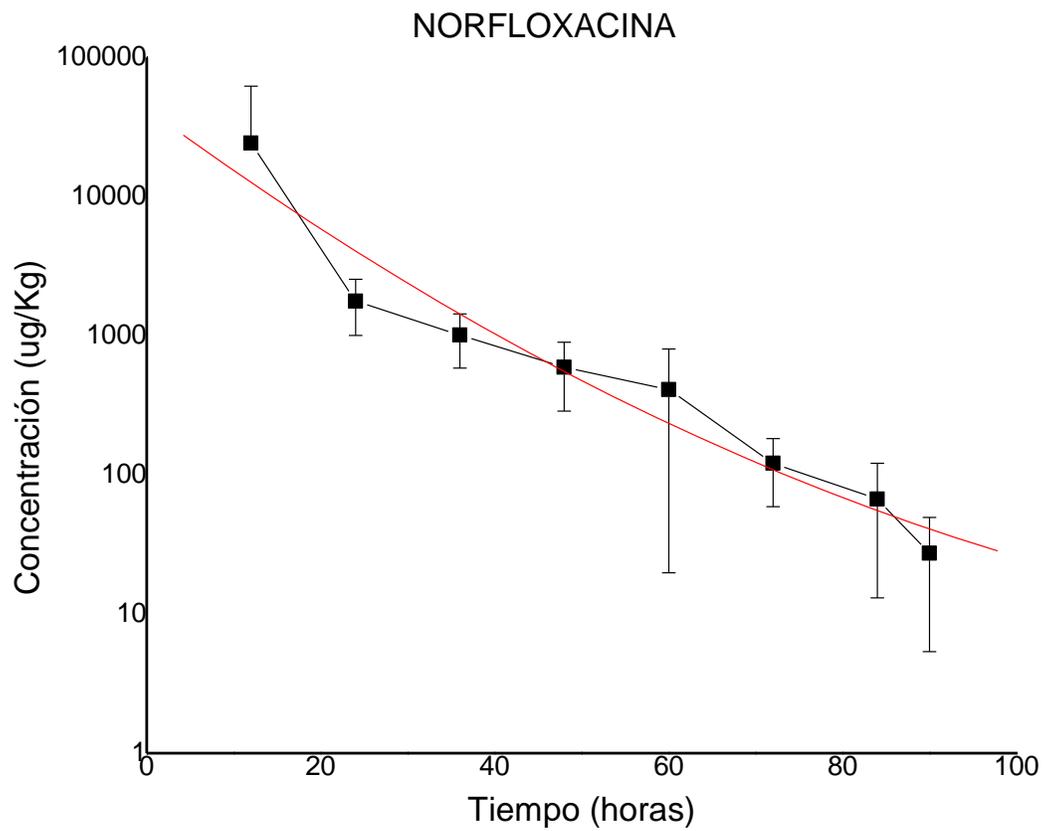
**Cuadro 1.** Estimados estadísticos descriptivos de los residuos de norfloxacin en leche de bovinos pos tratamiento analizadas por HPLC.

| <i>Parámetros estadísticos</i> | <i>1 Ordeño</i> | <i>2 Ordeño</i> | <i>3 Ordeño</i> | <i>4 ordeño</i> | <i>5 ordeño</i> | <i>6 ordeño</i> | <i>7 ordeño</i> | <i>8 ordeño</i> |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Media                          | 24204.23        | 1777.10         | 1009.40         | 593.42          | 411.06          | 121.05          | 67.07           | 27.34           |
| Error típico                   | 13421.99        | 272.08          | 149.97          | 108.44          | 138.31          | 21.89           | 19.09           | 7.77            |
| Desviación estándar            | 37963.12        | 769.58          | 424.18          | 306.72          | 391.21          | 61.93           | 53.99           | 21.98           |
| Varianza de la muestra         | 1441198726      | 592257.50       | 179930.71       | 94078.90        | 153046.98       | 3835.71         | 2915.78         | 483.3           |
| Mínimo                         | 1186.88         | 791.15          | 599.20          | 201.98          | 22.73           | 52.86           | NSD             | NSD             |
| Máximo                         | 87231.33        | 3076.47         | 1986.85         | 1228.34         | 1201.22         | 253.20          | 181.28          | 68.47           |
| Cuenta                         | 8               | 8               | 8               | 8               | 8               | 8               | 8               | 8               |

**Cuadro 2.** Concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$  o  $\text{mg/ml}$ ) de norfloxacin en leche de bovinos pos tratamiento durante 96 horas.

|         | <i>1 Ordeño<br/>12 hrs</i> | <i>2 Ordeño<br/>24 hrs</i> | <i>3 Ordeño<br/>36 hrs</i> | <i>4 Ordeño<br/>48 hrs</i> | <i>5 Ordeño<br/>60 hrs</i> | <i>6 Ordeño<br/>72 hrs</i> | <i>7 Ordeño<br/>84 hrs</i> | <i>8 Ordeño<br/>96 hrs</i> |
|---------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Glánd 1 | 87231.334                  | 1308.309                   | 970.128                    | 543.104                    | 259.511                    | 83.291                     | 29.501                     | 21.358                     |
| Glánd 2 | 4543.816                   | 3076.476                   | 1986.852                   | 1228.349                   | 1201.221                   | 253.207                    | 181.281                    | 68.473                     |
| Glánd 3 | 1625.550                   | 791.150                    | 599.205                    | 435.894                    | 87.108                     | 85.604                     | NSD                        | NSD                        |
| Glánd 4 | 1493.902                   | 1901.569                   | 668.313                    | 643.483                    | 469.665                    | 108.753                    | 49.126                     | 35.284                     |
| Glánd 5 | 1573.708                   | 2590.767                   | 1003.955                   | 777.032                    | 742.035                    | 95.515                     | 94.420                     | 30.780                     |
| Glánd 6 | 1186.884                   | 1115.938                   | 1016.788                   | 493.238                    | 201.154                    | 136.224                    | 61.967                     | 36.971                     |
| Glánd 7 | 83559.596                  | 1984.190                   | 909.820                    | 201.984                    | 22.738                     | 52.863                     | 48.644                     | 25.732                     |
| Glánd 8 | 12419.096                  | 1448.473                   | 920.180                    | 424.324                    | 305.093                    | 152.980                    | 71.663                     | 0.172                      |

## FIGURAS



**Figura 1.** Concentración de residuos de norfloxacin en leche de vacas pos tratamiento con 120 mg de norfloxacin.