



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFFECTO DE DESINFECTANTES UTILIZADOS EN LAS REDES DE
DISTRIBUCIÓN Y DEPÓSITOS DEL AGUA DE BEBIDA EN LA INDUSTRIA
AVÍCOLA, SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ANTIBIÓTICOS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:

CLAUDIA LEDESMA CARRASCO

TUTORA PRINCIPAL

LILIA GUTIÉRREZ OLVERA (FMVZ-UNAM)

COMITÉ TUTORAL

RAQUEL LÓPEZ ARELLANO (FES-CUAUTITLÁN-UNAM)

CECILIA ROSARIO CORTÉS (FMVZ-UNAM)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, OCTUBRE DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi familia por siempre haber estado ahí cuando los he necesitado.

A mis gatos que me inspiran cada día a aprender algo del ámbito veterinario.

A mi tío Alejandro que me ha dejado una gran reflexión de la vida y que ya descansa en paz.

A Itzcoatl por apoyarme en todas las etapas del doctorado.

AGRADECIMIENTO

A la Dra Lilia Gutiérrez Olvera por su orientación y apoyo durante la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Cecilia Rosario Cortes por su participación como integrante del comité tutorial y por toda la ayuda brindada en el área de aves de producción.

A la Dra. Raquel López Arellano por su participación como integrante del comité tutorial y por su orientación en el área Química.

A la Dra. Graciela Tapia Pérez por su guía para la realización del análisis estadístico.

Al Dr. Héctor Sumano López por su orientación durante la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Luis Ocampo Camberos jefe del departamento de Fisiología y Farmacología por haberme permitido utilizar las instalaciones para realizar mi investigación.

Al Dr. Jorge E. Miranda Calderón por su orientación en la elaboración de las mezclas del fármaco-desinfectante.

Al Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero por su cooperación en la técnica de FT-IR.

Al Ing. Hilario Ortiz Rivera por la donación del carbonato de calcio granulado para la elaboración del alimento de las aves proporcionado en este estudio.

Al Dr. Jorge Gracia Mora por su ayuda en la técnica de HPLC-masas.

Al CONACYT por el apoyo económico que me otorgó para realizar mis estudios de Doctorado.

Al PAPIIT UNAM IN21285 por los recursos asignados para este proyecto de investigación.

A la Sra Feliza por siempre ser tan paciente conmigo.

TRABAJOS GENERADOS A PARTIR DE ESTA TESIS

Artículos en revistas indexadas

Aceptado

Ledesma C; Rosario C; Gracia-Mora J; Tapia G; Sumano H; Gutiérrez L. Influence of chlorine, iodine, and citrate-based water sanitizers on the oral bioavailability of enrofloxacin in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*. Acceptance date: 2017-08-16. DOI: 10.3382/japr/pfx044.

Enviado

Ledesma C; Rosario C; Gracia-Mora J; Tapia G; Gutiérrez L; Sumano H. Antibacterial activity of amoxicillin *in vitro* and its oral bioavailability in broiler chickens under the influence of three water-sanitizers. *Poultry Research*.

CONTENIDO

Página

LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE CUADROS.....	3
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
JUSTIFICACIÓN.....	9
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIONES.....	59
LISTA DE ABREVIATURAS.....	60
REFERENCIAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aplicación de la técnica de isoblograma.....	13
Figura 2. Aves clínicamente sanas utilizadas en el experimento.....	14
Figura 3. Administración individual del tratamiento en el buche.....	18
Figura 4. Obtención de muestra sanguínea de la vena radial.....	18
Figura 5. Técnica de difusión en agar.....	19
Figura 6. Media y DE de la concentración de amoxicilina en suero de los diferentes grupos de aves.....	32
Figura 7. Media y DE de la concentración de amoxicilina en suero de los diferentes grupos de aves.....	34
Figura 8. Media y DE de la concentración de amoxicilina en suero de los diferentes grupos de aves.....	36
Figura 9. Media y DE de la concentración de enrofloxacina en suero de los diferentes grupos de aves.....	38
Figura 10. Media y DE de la concentración de enrofloxacina en suero de los diferentes grupos de aves.....	40
Figura 11. Media y DE de la concentración de enrofloxacina en suero de los diferentes grupos de aves.....	42
Figura 12. Espectro FT-IR de la amoxicilina y de la mezcla de amoxicilina trihidratada-hipoclorito de sodio.....	44
Figura 13. Acercamiento del espectro FT-IR de la amoxicilina y de la mezcla de amoxicilina trihidratada-hipoclorito de sodio.....	44
Figura 14. Espectro FT-IR de la enrofloxacina y de la mezcla de enrofloxacina-hipoclorito de sodio.....	45
Figura 15. Acercamiento del espectro FT-IR de la enrofloxacina y de la mezcla de enrofloxacina-hipoclorito de sodio.....	46
Figura 16. Cromatograma de amoxicilina trihidratada (estándar).....	47
Figura 17. Monómero (364 m/z) y dímero (729 m/z) de amoxicilina trihidratada (estándar).....	47

Figura 18. Cromatograma de la mezcla de amoxicilina-hipoclorito de sodio.....	48
Figura 19. Espectro de masas de la mezcla de amoxicilina-hipoclorito de sodio.....	49
Figura 20. Cromatograma de enrofloxacin base (estándar).....	50
Figura 21. Espectro de masas de enrofloxacin base (estándar).....	50
Figura 22. Cromatograma de la mezcla de enrofloxacin-hipoclorito de sodio.....	50
Figura 23. Espectro de masas de la mezcla enrofloxacin-hipoclorito de sodio.....	51

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Necesidades nutricionales de las aves utilizadas en el desarrollo de la evaluación de biodisponibilidades.....	15
Cuadro 2. Composición de la dieta de las aves (g/kg de alimento) aves utilizadas en el desarrollo de la evaluación de biodisponibilidades.....	15
Cuadro 3. Condiciones en las que se alojaron las aves utilizadas en el desarrollo de la evaluación de biodisponibilidades.....	16
Cuadro 4. Descripción de los grupos en los que se evaluó la actividad antimicrobiana después de la administración oral del producto(s) de la interacción de amoxicilina más un desinfectante.....	17
Cuadro 5. Descripción de los grupos en los que se evaluó la actividad antimicrobiana después de la administración oral del producto(s) de la interacción de enrofloxacina más un desinfectante.....	21
Cuadro 6. Media aritmética de los halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas amoxicilina-sanitizantes-agua resultantes de diferentes horas de interacción.....	24
Cuadro 7. Media aritmética de los halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas enrofloxacina-sanitizantes-agua resultantes de diferentes horas de interacción.....	25
Cuadro 8. Media aritmética de los halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas amoxicilina-cloro-agua.....	26
Cuadro 9. Media aritmética de halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas amoxicilina-iodo-agua.....	27
Cuadro 10. Media aritmética de halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas amoxicilina-desinfectante a base de citratos-agua.....	28
Cuadro 11. Media aritmética de halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas enrofloxacina-cloro-agua.....	29
Cuadro 12. Media aritmética de halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas enrofloxacina-iodo-agua.....	30
Cuadro 13. Media aritmética de halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas enrofloxacina-desinfectante a base de citratos-agua.....	31

Cuadro 14. Parámetros farmacocinéticos (media y DS) de amoxicilina-hipoclorito de sodio-agua en pollos de los diferentes grupos de prueba.....	33
Cuadro 15. Parámetros farmacocinéticos (media y DS) de amoxicilina-iodóforo-agua en pollos de los diferentes grupos de prueba.....	35
Cuadro 16. Parámetros farmacocinéticos (media y DS) de amoxicilina-desinfectante a base de citratos-agua en pollos de los diferentes grupos de prueba.....	37
Cuadro 17. Parámetros farmacocinéticos (media y DS) de enrofloxacina-hipoclorito de sodio-agua en pollos de los diferentes grupos de prueba.....	39
Cuadro 18. Parámetros farmacocinéticos (media y DS) de enrofloxacina-iodóforo-agua en pollos de los diferentes grupos de prueba.....	41
Cuadro 19. Parámetros farmacocinéticos (media y DS) de enrofloxacina-desinfectante a base de citratos-agua en pollos de los diferentes grupos de prueba.....	43
Cuadro 20. Relación PK/PD de los diferentes grupos derivados de amoxicilina-desinfectante-agua y del grupo testigo (A).....	56
Cuadro 21. Relación PK/PD de los diferentes grupos derivados de enrofloxacina-desinfectante-agua y del grupo testigo (E).....	57

RESUMEN

El presente estudio evaluó la interacción de tres sanitizantes de agua comúnmente utilizados en avicultura (hipoclorito de sodio, yodóforo y sanitizante a base de citratos), sobre la amoxicilina trihidratada y enrofloxacina en aves de postura. Se realizaron diluciones de los sanitizantes con los antibióticos amoxicilina-sanitizante (PAS) o enrofloxacina-sanitizante (PES) y sus controles, se evaluó si mantenían su actividad antibacteriana *in vitro* mediante una prueba de actividad-concentración de difusión en agar y evaluaciones *in vivo* de biodisponibilidad relativa (Fr) en ciento ocho aves hembra Isa Brown clínicamente sanas, con una edad de 17 semanas y un peso promedio de $1.5 \text{ kg} \pm 9 \text{ g}$ mediante la administración tipo bolo directo en el buche a razón de 20 mg/kg para amoxicilina y 10 mg/kg para enrofloxacina con sus respectivas diluciones de los desinfectantes, las concentraciones de los antibacterianos en sangre se evaluaron mediante el método microbiológico de actividad/concentración. Los resultados muestran que los PAS derivados del hipoclorito de sodio disminuyen tanto la actividad antimicrobiana de la amoxicilina *in vitro* como su Fr. Lo mismo se aprecia para enrofloxacina cuando las concentraciones de cloro libre son iguales o superiores a 10 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo esto no se repite a concentraciones de 5 $\mu\text{g/mL}$ de hipoclorito en donde se aprecia un aumento en la Fr. Los PAS derivados del yodóforo en bajas concentraciones tuvieron un efecto nulo en la actividad antimicrobiana *in vitro*, no obstante en las 2 mezclas de mayor concentración del yodóforo se observó una disminución de la actividad antibacteriana, mientras que las Fr no se vieron modificadas. Los PES derivados del yodóforo *in vitro* no se vieron modificadas, pero las dos concentraciones más elevadas del sanitizante disminuyeron la Fr. Los PAS y PES con el sanitizante a base de cítricos fueron superiores tanto *in vitro* como en Fr. Con este estudio se hace evidente que existen una gran diversidad de interacciones no evaluadas de los antibacterianos administrados en agua de bebida en aves que pudieran llegar a alterar su efecto.

PALABRAS CLAVE: enrofloxacina, amoxicilina, sanitizante, biodisponibilidad

ABSTRACT

This study evaluated the possible interactions of three water sanitizers (sodium hypochlorite, iodine and citrates) with trihydrated amoxicillin (AMX) and enrofloxacin (ENR) in laying hens. Dilutions of the water sanitizers with the antibiotics (amoxicillin plus sanitizing agent (PAS) or enrofloxacin plus sanitizing agent (PES) and their corresponding controls groups were carried out to assess whether or not they maintained their antibacterial activity *in vitro* as assessed by an agar diffusion activity-concentration test and *in vivo* through evaluations of relative bioavailability (Fr), having a mean weight of 1.5 ± 9 g. AMX or ENR alone and PAS or PES from different dilutions were directly administered into the crop (20 mg/kg for AMX and 10 mg/kg for ENR). Serum concentrations/activities of AMX or ENR were determined by means of the agar diffusion microbiological method. Results show that PAS derived from sodium hypochlorite decrease both the antimicrobial activity of amoxicillin *in vitro* and its Fr. The same is true for enrofloxacin when free chlorine concentrations are equal to or greater than 10 $\mu\text{g/mL}$. However, this is not repeated at concentrations of 5 $\mu\text{g/mL}$ of hypochlorite. Then, an increase in Fr is observed. PAS derived from the iodophore dilutions at low concentrations had a null effect on antimicrobial activity *in vitro*. However, the 2 mixtures with the highest concentrations of iodine showed a decrease in antibacterial activity. Bioavailability was not modified. PES antibacterial activity from iodophore *in vitro* were not modified. Yet, the two highest concentrations of the iodophore based water sanitizer decreased Fr. PAS and PES values assessed with the citrus-based water-sanitizer, were superior both as assessed for *in vitro* antibacterial activity and as far as Fr is concerned. These results reveal that there are many untested interactions of antibacterials with water sanitizers, and that they may modify both their antibacterial activity and bioavailability in poultry.

KEY WORDS: enrofloxacin, amoxicillin, sanitizers, bioavailability

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La administración oral de medicamentos juega un papel preponderante en las terapias antibacterianas en la industria avícola (Vermeulen, 2002). La dosificación en agua de bebida es la más utilizada dada su facilidad de administración, manejo accesible de dosis y bajos costos (Esmail, 1996); sin embargo, sus desventajas son importantes cuando se evalúa terapéuticamente el medicamento, dada la gran variación de biodisponibilidad de los fármacos en cada individuo, así como por todos los factores que la modifican (Bailey, 1999; Ribeiro y *col.*, 2004; Ziaei y *col.*, 2007, 2011) ya sean de la administración del fármaco (Vermeulen, 2002), relacionados a instalaciones y manejo (May y *col.*, 1997; Quilumba y *col.*, 2015) o incluso a la calidad del agua (Bell and Weaver, 2002; Dozier y *col.*, 2002; Fairchild y *col.*, 2006). Este último factor es de los que menos se toma en cuenta, a pesar de que constituye uno de los factores que más influyen en la biodisponibilidad de los antibacterianos; así como los sistemas de purificación y desinfección (Esmail, 1996).

Para la limpieza de la red de distribución y potabilización del agua en los sistemas intensivos y altamente tecnificados se emplean diversos productos, entre ellos los potabilizadores a base de yodo (yodóforos), los cuales son de los más comunes por su actividad contra bacterias, hongos y virus. Aunque, pierden eficacia al estar en contacto con aguas duras y se inactiva fácilmente en presencia de materia orgánica (Kahrs, 1995). Así mismo es común el uso de desinfectantes a base de citratos debido a que son productos biodegradables, eficaces contra bacterias, hongos y algunos virus, no son corrosivos ni tóxicos y son estables; no obstante, el método de mayor uso es la clorinación, debido a que es económica, eficaz contra bacterias, hongos y virus, además de que remueve nitritos y nitratos, entre otras ventajas; a pesar de las cuales, se degrada fácilmente en presencia de materia orgánica y las soluciones de hipoclorito son relativamente inestables e irritantes (Velázquez, 1999).

No obstante que se menciona a nivel clínico y de campo la posible interacción de antibacterianos con residuos de desinfectantes en el agua, la información científica y especializada que existe al respecto es escasa, por ejemplo, se sabe que el cloro es una sustancia reactiva de un gran poder oxidante (Wang y *col.*, 2010), sin embargo, no se ha profundizado en los mecanismos de interacción ni en las consecuencias que se pueden

generar al interaccionar este producto con los antibacterianos de mayor uso en la industria avícola. Las interacciones que se den, tanto a nivel externo como en el ave son inciertas, Aguilera y *col.*, (2007) demostraron que la enrofloxacin y el calcio podían interactuar a diversos niveles, no todos ellos negativos, dependiendo de los tiempos de exposición entre ellos.

La enrofloxacin es uno de los agentes antibacterianos más potentes utilizados en la industria avícola, presenta un amplio espectro de acción incluyendo micoplasmas (Sumano y Gutiérrez, 2008). En general, las fluoroquinolonas presentan en su estructura grupos amino, que las hace susceptible al ataque oxidativo del cloro, lo cual puede resultar en una modificación de la biodisponibilidad (Weinberg, 2004), aunque no se sabe a ciencia cierta si son interacciones positivas o negativas, dado que no existe información al respecto (Wang *col.*, 2010).

La amoxicilina es un antibiótico β -lactámico semisintético perteneciente al grupo de las aminopenicilinas. Es uno de los antibacterianos más utilizado en animales de producción, para el tratamiento y prevención de infecciones originadas por bacterias gram positivas y gram negativas, con la ventaja de tener un bajo costo (Krasucka *col.*, 2015; Sun *col.*, 2016). Dentro de su estructura química posee un anillo aromático y una amina primaria, lo que la hace tener una alta reactividad con el cloro, cambiando sus propiedades fisicoquímicas (Acero *col.*, 2010).

Al desconocer las interacciones que se dan antes de que el ave consuma el antibacteriano, se desconocen los metabolitos (si es que se generan) que está ingiriendo, ya que dicha interacción podría traer como consecuencias la generación de sustancias tóxicas, irritantes, poco biodisponibles o de nula actividad para las aves.

2. JUSTIFICACIÓN

- Las interacciones que se dan en la administración oral de antibacterianos en aves son altamente conocidas, aunque la mayoría de ellas están poco estudiadas y se manejan como información empírica. Se ha evidenciado en algunos estudios; la interacción de los desinfectantes y potabilizadores del agua con algunos fármacos, no obstante no se ha profundizado en los mecanismos de interacción ni en las consecuencias que esta puede generar. Estos mecanismos de interacción pueden llevar a procesos que favorezcan la biodisponibilidad del fármaco o una posible disminución de la misma, trayendo como posibles consecuencias: la generación de resistencias bacterianas, pérdida de recursos por reducción de la eficacia del tratamiento de enfermedades, propagación de las infecciones bacterianas y mortalidad de las aves.
- Al desconocer las interacciones que se dan antes de que el ave consuma el antibacteriano, tampoco se saben los metabolitos que está ingiriendo, ya que dicha interacción podría traer como consecuencias la generación de sustancias tóxicas, irritantes, poco biodisponibles o de nula actividad para las aves.

3. HIPÓTESIS

La biodisponibilidad de los antibióticos (amoxicilina o enrofloxacin) administrados en el agua de bebida, se verá afectada por la presencia de residuos de desinfectantes (iodóforo, hipoclorito de sodio o desinfectante a base de citratos) utilizados habitualmente en las líneas de distribución y almacenaje del agua de bebida en aves de producción.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la biodisponibilidad de antibióticos, comúnmente usados en la industria avícola, resultante de la mezcla fármaco-desinfectante-agua de bebida para evidenciar su repercusión a nivel clínico terapéutico.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- I- Evaluar mediante isobologramas la actividad antibacteriana de las mezclas amoxicilina-hipoclorito de sodio-agua, amoxicilina-iodóforo-agua y amoxicilina-desinfectante a base de citrato-agua para determinar el tipo de interacción que se puede generar.
- II- Evaluar mediante isobologramas la actividad antibacteriana de las mezclas enrofloxacina-hipoclorito de sodio-agua, enrofloxacina-iodóforo-agua y enrofloxacina-desinfectante a base de citrato-agua para establecer el tipo de interacción que se puede generar.
- III- Determinar las características farmacocinéticas de las mezclas amoxicilina-hipoclorito de sodio-agua, amoxicilina-iodóforo-agua y amoxicilina-desinfectante a base de citrato-agua en aves dosificadas individualmente para identificar posibles modificaciones de la biodisponibilidad.
- IV- Establecer las características farmacocinéticas de las mezclas enrofloxacina-hipoclorito de sodio-agua, enrofloxacina-iodóforo-agua y enrofloxacina-desinfectante a base de citrato-agua en aves dosificadas individualmente para identificar posibles modificaciones de la biodisponibilidad.
- V- Analizar mediante espectrometría de FT-IR las mezclas del antibiótico-desinfectante-agua que presenten el mayor cambio en su actividad microbiológica *in vitro* y mayores cambios en sus parámetros farmacocinéticos.
- VI- Analizar mediante HPLC-masas las mezclas antibiótico-desinfectante-agua que presenten el mayor cambio en su actividad microbiológica *in vitro* y mayores cambios en sus parámetros farmacocinéticos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Pruebas microbiológicas

Para llevarse a cabo las pruebas de isobogramas, y poder determinar si existían cambios en el efecto antibacteriano resultantes de la asociación fármaco-desinfectante-agua, se elaboraron mezclas del antibiótico amoxicilina¹ o enrofloxacin² (intervalo de concentración de 0.05-50 µg/mL), desinfectante y agua desionizada. Las sustancias resultantes se consideraron como productos-amoxicilina-sanitizante (PAS) y productos-enrofloxacin-sanitizante (PES). Se realizó la evaluación de la modificación de la actividad antibacteriana de tiempo sobre la interacción del sanitizante-agua-antibiótico por medio de una evaluación de actividad antibacteriana en halos de inhibición en los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 y 24 horas.

Los desinfectantes que se emplearon fueron: hipoclorito de sodio³ (5-40 µg/mL de cloro libre), yodóforo⁴ (8-64 µg/mL de iodo libre) y desinfectante a base de citratos⁵ (2 -16 mg/mL); estos desinfectantes son comúnmente utilizados en la avicultura (Sumano y Gutiérrez, 2008). Cada combinación fue depositada en un pozo formado en el agar. Las concentraciones más elevadas corresponden a 8 veces la dosis máxima recomendada de los desinfectantes en el agua de bebida (Cooperative Extension Service, 1998; Sumano y col., 2015). Los controles consistieron en depositar el antibiótico (0.05-50 µg/mL) y el desinfectante (hipoclorito de sodio o yodóforo o desinfectante a base de citratos), por separado, en 4 pozos a la concentración descrita anteriormente para la elaboración de las mezclas (Pillai y col., 2005). Se utilizó a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como microorganismo de prueba para la amoxicilina y *Escherichia coli* ATCC 10536 como microorganismo de prueba para la enrofloxacin. A ambos microorganismos se les mantuvo bajo las condiciones que recomienda la CLSI (2012). Se realizaron 15 placas (Figura 1) de cada uno de los antibióticos y sus mezclas con los diferentes desinfectantes para obtenerse 15 repeticiones

¹ Amoxi-40®, FIORI, México.

² Enroxil 10®, Senosiain, Guanajuato, México.

³ Hipoclorito de sodio al 13%®; Organización Química de Calidad, Morelos, México.

⁴ Iodosol 50®, Loeffler, México.

⁵ Citrex® 20%; Bio-clean®, Avimex, México.

(n=15) por cada tratamiento o mezcla a evaluarse. El tamaño de muestra fue calculado con el programa G*Power⁶ (efecto del tamaño 0.32, $\alpha = 0.05$ y potencia de 0.8 [$1-\beta = 0.8$]).

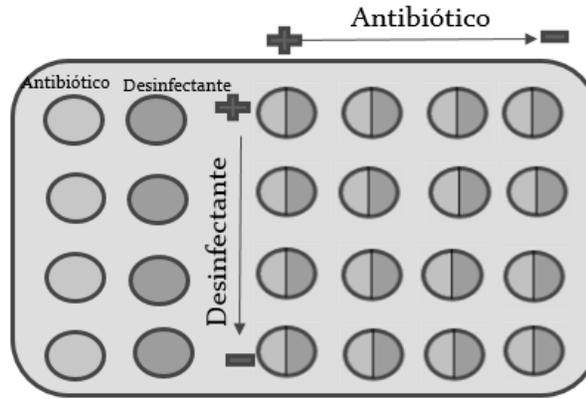


Figura 1. Aplicación de la técnica de isoblograma

6.1.1 Análisis estadístico

El modelo que se utilizó para el análisis de los halos de inhibición fue el modelo lineal generalizado (GzLM) para variable continua expresado de la siguiente forma:

$$\eta_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \beta_3 X_1 X_2$$

Donde:

η_i = es el predictor lineal del halo de inhibición.

β_0 = es la intersección.

$\beta_1 X_1$ = es el coeficiente de regresión para el i-ésimo antibiótico.

$\beta_2 X_2$ = es el coeficiente de regresión para el i-ésimo desinfectante.

β_3 = es el coeficiente de regresión de la interacción entre los distintos niveles de antibiótico y desinfectante.

El modelo se analizó por el método de máxima verosimilitud. Se calcularon las medias marginales de la interacción entre los distintos niveles del antibiótico y cada

⁶ G*Power[®] 3.0.10, Faul y col.(2007), Bonn, Germany.

desinfectante (X_1X_2), con éstas se realizó el análisis de comparaciones múltiples de Bonferroni. El nivel de significancia para declarar diferencias fue de 0.05. Todos los análisis se hicieron con el paquete estadístico IBM SPSS 20 con el procedimiento GzLM⁷.

6.2 Pruebas farmacocinéticas

Este estudio fue aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales experimentales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Ciento ocho aves hembra Isa Brown clínicamente sanas, con una edad de 17 semanas y un peso promedio de $1.5 \text{ kg} \pm 9 \text{ g}$ (Figura 2), se utilizaron para la prueba de actividad antibacteriana en suero sanguíneo expresada como concentración. Previo al experimento, las aves fueron obtenidas de una granja comercial⁸ a partir del primer día de edad. El alojamiento y el alimento administrado a las aves fue preparado según las recomendaciones de la guía comercial de manejo nutricional para aves Isa Brown (ISA, 2010) (Cuadro 1 y 2) y la guía de manejo general de ponedoras comerciales (ISA 2009-10) (Cuadro 3). Las aves no estuvieron expuestas a ningún agente antimicrobiano 3 semanas antes del estudio.



Figura 2. Aves clínicamente sanas utilizadas en el experimento.

⁷ IBM® SPSS® Statistics for Windows. 2011. Version 20.0. IBM Corp. Armonk, NY

⁸ Avícola Velmor. Fresno 87, Col. Valle de los pinos, los Reyes la Paz, Estado de México, México.

Cuadro 1. Necesidades nutricionales de las aves utilizadas en el desarrollo de la evaluación de biodisponibilidades

Dieta	Iniciación	Crecimiento	Desarrollo	Pre-postura
Edad (semanas)	0-4	5-9	10-16	17-1er huevo
Proteína cruda (%)	20.5	18	16	16.5
ME (Kcal/kg)	2950-2975	2850-2875	2750	2750
ME (MJ/kg)	12.3-12.4	11.9-12.0	11.5	11.5
Proteína Cruda (%)	20.5	19	16	16.8
Metionina (%)	0.52	0.45	0.33	0.40
Met + Cys (%)	0.86	0.76	0.60	0.67
Lisina (%)	1.16	0.98	0.74	0.80
Triptófano (%)	0.21	0.19	0.16	0.18
Treonina (%)	0.78	0.66	0.50	0.56
Ca (%)	1.05-1.10	0.90-1.10	0.90-1.10	2-2.10
Fosforo (%)	0.48	0.42	0.36	0.42
Cloro (%)	0.15	0.15	0.14	0.14
Sodio (%)	0.16	0.16	0.15	0.15

Cuadro 2. Composición de la dieta de las aves (g/kg de alimento) aves utilizadas en el desarrollo de la evaluación de biodisponibilidades

Ingrediente	Iniciación 0-6 semanas (2950-2975 Kcal)	Crecimiento 7-12 semanas (2875 Kcal)	Desarrollo 13-17 semanas (2750 Kcal)	Prepostura +17 semanas (2750 Kcal)
Maíz	259.8	317.5	146.0	54.4
Trigo	300	150	270	310
Cebada	---	150	270	310
Salvado de arroz	---	---	---	40
Harina de soya	354.5	320.5	159.2	118.4
Aceite de soya	46.2	23.1	18.2	17.7
Harina de girasol	---	---	100	100
Metionina	2.1	2.0	1.4	0.5
L-lisina	0.1	0.4	1.5	---
L-treonina	1.2	1.1	0.2	0.1
Sepiolita	---	---	---	14
Fosfato dicálcico	8.3	7.1	3.8	3.0
Carbonato de calcio	20.3	21.2	22.6	24.8
Cloruro de sodio	3.5	3.3	3.3	3.3
Premezcla vitamínica	3.8	3.8	3.8	3.8

Cuadro 3. Condiciones en las que se alojaron las aves utilizadas en el desarrollo de la evaluación de biodisponibilidades

Edad	Densidad (m ²)	Temperatura ambiental (°C)	Temperatura criadora (°C)	Humedad (%)
1 semana	80	33-31	35-34	55-60
2 semanas	80	30-28	32	55-60
3 semanas	80	28-26	29	55-60
4 semanas	45	25-21	---	55-65
5 semanas	45	21-19	---	60-70
6-8 semana	12	19-17	---	60-70
9-18 semanas	6-8	19-17	---	60-70

6.2.1 Pruebas farmacocinéticas amoxicilina-desinfectante-agua

Para la evaluación de la biodisponibilidad relativa (Fr) se realizaron cuatro estudios farmacocinéticos para cada PAS con seis repeticiones por grupo, cada grupo se conformó con diversas concentraciones del antibiótico-desinfectante-agua (cuadro 4). También, se realizó un estudio de Fr con seis repeticiones administrando sólo amoxicilina en agua desionizada libre de desinfectantes. Y otro estudio de Fr para el agua con la concentración más alta estudiada del desinfectante con sus seis respectivas repeticiones. El número de unidades experimentales se calculó mediante el programa G*Power (efecto del tamaño 0.20, $\alpha = 0.05$ y potencia de 0.8 [$1-\beta = 0.8$]).

Cada ave se pesó individualmente y se mantuvo en ayuno durante 2 horas antes de recibir uno de los tratamientos en forma de dosis oral en bolo por medio de una cánula de plástico (Insyte⁹, 1,7 mm por 7 cm) unida a una jeringa, dirigida hacia el buche. Una vez asegurada la colocación adecuada de la cánula, se suministró la solución experimental (Figura 3). Se obtuvo un promedio de 1.5 mL de sangre por cada uno de los animales a las 0, 0.5, 1, 3, 6 y 12 horas por tratamiento (Figura 4). Las muestras sanguíneas se depositaron en tubos sin anticoagulante¹⁰ y después de la formación del coágulo se centrifugaron (3 minutos a 4000 g) para obtener suero, el cual se mantuvo en congelación (- 4°C) hasta el momento de su análisis.

⁹ BD Insyte®; USA.

¹⁰ BD Vacutainer ®, RST; USA.

Cuadro 4. Descripción de los grupos en los que se evaluó la actividad antimicrobiana después de la administración oral del producto(s) de la interacción de amoxicilina más un desinfectante

Grupo	Descripción (mg/kg peso corporal)	Porcentaje de inclusión de amoxicilina y desinfectante en el agua
A	Amoxicilina 20 ¹	Amoxicilina 5
Cloro		
ACI+	Amoxicilina 20 más cloro 0.002	Amoxicilina 5 más cloro 0.0005 ²
ACI++	Amoxicilina 20 más cloro 0.004	Amoxicilina 5 más cloro 0.0010
ACI+++	Amoxicilina 20 más cloro 0.008	Amoxicilina 5 más cloro 0.0020
ACI++++	Amoxicilina 20 más cloro 0.016	Amoxicilina 5 más cloro 0.0040
CI++++	Cloro 0.016	Cloro 0.0040
Yodo		
AI+	Amoxicilina 20 más iodo 0.0032	Amoxicilina 5 más iodo 0.0008 ²
AI++	Amoxicilina 20 más iodo 0.0064	Amoxicilina 5 más iodo 0.0016
AI+++	Amoxicilina 20 más iodo 0.0128	Amoxicilina 5 más iodo 0.0032
AI++++	Amoxicilina 20 más iodo 0.0256	Amoxicilina 5 más iodo 0.0064
I++++	Iodo 0.0256	Iodo 0.0064
Citrato		
AC+	Amoxicilina 20 más desinfectante citrato 0.8	Amoxicilina 5 más desinfectante citrato 0.2 ²
AC++	Amoxicilina 20 más desinfectante citrato 1.6	Amoxicilina 5 más desinfectante citrato 0.4
AC+++	Amoxicilina 20 más desinfectante citrato 3.2	Amoxicilina 5 más desinfectante citrato 0.8
AC++++	Amoxicilina 20 más desinfectante citrato 6.4	Amoxicilina 5 más desinfectante citrato 1.6
C++++	Desinfectante citrato 6.4	Desinfectante citrato 1.6

¹ Dosis terapéutica recomendada (Sumano et al., 2015).

² Concentración más alta recomendada.



Figura 3. Administración individual del tratamiento en el buche.



Figura 4. Obtención de muestra sanguínea de la vena radial.

La actividad antimicrobiana de los sueros se determinó mediante la técnica de actividad/concentración de difusión en agar (Figura 5) descrita por Bennet y *col.* (1966), la cual según Souza y *col.* (2004) es tan exacta como el HPLC. En ésta se utilizó *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) como microorganismo para el ensayo. La correlación entre el incremento de la concentración de amoxicilina vs diámetro de los halos de inhibición se expresó como actividad antibacteriana de la concentración en $\mu\text{g/mL}$. El límite de cuantificación fue de $0.05 \mu\text{g/mL}$, que fue identificado por medio de muestras de suero fortificadas con amoxicilina, que corresponde a 6.0 mm de halo de inhibición medido por un vernier digital. Este valor corresponde al límite inferior de la línea de calibración, cuyo coeficiente de correlación de la solución estándar de amoxicilina fue de $r = 0.965$ mediante

regresión lineal por el software de Origin 6.0. Intra-ensayo e inter-ensayo con coeficientes de variación (4% y 5.5% respectivamente) se calcularon a partir de cinco repeticiones.



Figura 5. Técnica de difusión en agar.

6.2.2 Pruebas farmacocinéticas enrofloxacin-desinfectante-agua

Para la evaluación de Fr se realizaron cuatro estudios farmacocinéticos para cada PES con seis repeticiones por grupo, cada grupo fue constituido con diversas concentraciones del antibiótico-desinfectante-agua (cuadro 5). También; se realizó un estudio de Fr con seis repeticiones administrando sólo enrofloxacin en agua desionizada libre de desinfectantes. Y otro estudio de Fr para el agua con la concentración más alta estudiada del desinfectante con sus seis respectivas repeticiones. El número de unidades experimentales también se calculó mediante el programa G*Power (efecto del tamaño 0.20, $\alpha = 0.05$ y potencia de 0.8 [$1-\beta = 0.8$]).

Cada ave se pesó individualmente y se mantuvo en ayuno durante 2 horas antes de recibir uno de los tratamientos en forma de dosis oral en bolo por medio de una cánula de plástico (Insyte®, 1,7 mm por 7 cm) unida a una jeringa, dirigida hacia el buche. Una vez asegurada la colocación adecuada de la cánula, se suministró la solución experimental. Se obtuvo un promedio de 1.5 mL de sangre por cada uno de los animales a las 0, 1, 3, 6, 12 y 24 horas por tratamiento, las muestras se centrifugaron 3 minutos a 4000 g para obtener el suero, el cual se mantuvo en congelación (-4°C) hasta el momento de su análisis.

Se determinó la actividad antimicrobiana de los sueros mediante la técnica de actividad/concentración de difusión en agar descrita por Bennet y *col.* (1966) Se utilizó

Escherichia coli (ATCC 10536) como microorganismo para el ensayo. La correlación entre el incremento de la concentración de enrofloxacin vs diámetro de los halos de inhibición se expresó como actividad antibacteriana de la concentración en $\mu\text{g/mL}$. El límite de cuantificación fue de $0.04 \mu\text{g/mL}$, que fue identificado por medio de muestras de suero fortificadas con enrofloxacin, que corresponde a 6.5 mm de halo de inhibición medido por un vernier digital. Este valor corresponde al límite inferior de la línea de calibración, cuyo coeficiente de correlación de la solución estándar de enrofloxacin fue de $r = 0.965$ mediante regresión lineal por el software de Origin 6.0. Intra-ensayo e inter-ensayo con coeficientes de variación (3% y 4.5% respectivamente) se calcularon a partir de cinco repeticiones.

6.2.3 Análisis de datos

Las concentraciones en suero de amoxicilina y enrofloxacin de los diferentes tiempos fueron analizadas usando el software PKAnalyst² modelo 5 ($r < 0.95$). Este programa reporta los siguientes parámetros farmacocinéticos: área bajo la curva (AUC), vida media de eliminación ($T_{1/2\beta}$), tiempo de residencia (MRT), concentración sérica máxima (C_{max}), tiempo para alcanzar la C_{max} (T_{max}) y área bajo la curva en el primer momento (AUMC). El área bajo la curva fue confirmada usando el método trapezoidal usando Microsoft-EXCEL.

Los valores de los parámetros farmacocinéticos fueron sometidos a pruebas de Shapiro-Wilk³ para comprobar que poseían distribución normal. Los parámetros farmacocinéticos con distribución normal se analizaron con un modelo lineal general de la siguiente forma:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = es el valor del parámetro farmacocinético individual en la i -ésima dilución del desinfectante

μ = es la media general

D_i = es la i ésima dilución del desinfectante ($i=1, 2, 3, 4, 5$)

e_{ij} = es el error estándar aleatorio $N(\mu, \sigma_e^2)$

² MicroMath® PKAnalyst® for Windows®. 1995. Version 1.1. MicroMath Inc., St. Louis, MO, USA.

³ Shapiro, S., and Wilk, M. 1965. An Analysis of Variance Test for Normality. Biometrika 52:591–611.

Cuadro 5. Descripción de los grupos en los que se evaluó la actividad antimicrobiana después de la administración oral del producto(s) de la interacción de enrofloxacin más un desinfectante

Grupo	Descripción (mg/kg peso corporal)	Porcentaje de inclusión de enrofloxacin y desinfectante en el agua
E	Enrofloxacin 10 ¹	Enrofloxacin 2.5
Cloro		
ECl+	Enrofloxacin 10 más cloro 0.002	Enrofloxacin 2.5 más cloro 0.0005 ²
ECl++	Enrofloxacin 10 más cloro 0.004	Enrofloxacin 2.5 más cloro 0.0010
ECl+++	Enrofloxacin 10 más cloro 0.008	Enrofloxacin 2.5 más cloro 0.0020
ECl++++	Enrofloxacin 10 más cloro 0.016	Enrofloxacin 2.5 más cloro 0.0040
Cl++++	Cloro 0.016	Cloro 0.0040
Yodo		
EI+	Enrofloxacin 10 más iodo 0.0032	Enrofloxacin 2.5 más iodo 0.0008 ²
EI++	Enrofloxacin 10 más iodo 0.0064	Enrofloxacin 2.5 más iodo 0.0016
EI+++	Enrofloxacin 10 más iodo 0.0128	Enrofloxacin 2.5 más iodo 0.0032
EI++++	Enrofloxacin 10 más iodo 0.0256	Enrofloxacin 2.5 más iodo 0.0064
I++++	Iodo 0.0256	Iodo 0.0064
Citrato		
EC+	Enrofloxacin 10 más desinfectante citrato 0.8	Enrofloxacin 2.5 más desinfectante citrato 0.2 ²
EC++	Enrofloxacin 10 más desinfectante citrato 1.6	Enrofloxacin 2.5 más desinfectante citrato 0.4
EC+++	Enrofloxacin 10 más desinfectante citrato 3.2	Enrofloxacin 2.5 más desinfectante citrato 0.8
EC++++	Enrofloxacin 10 más desinfectante citrato 6.4	Enrofloxacin 2.5 más desinfectante citrato 1.6
C++++	Desinfectante citrato 6.4	Desinfectante citrato 1.6

¹ Dosis terapéutica recomendada (Sumano et al., 2015).

² Concentración más alta recomendada.

Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, para la cual se consideraron las medias marginales y errores estándar ajustados por el modelo. El nivel de significancia para declarar diferencias fue de 0.05. Este modelo se analizó por el método de cuadrados mínimos. Todos los análisis se hicieron con el paquete estadístico IBM SPSS 20 con el procedimiento (GLM).

6.3 Análisis mediante espectroscopia infrarroja (FT-IR)

La mezcla de amoxicilina-desinfectante y enrofloxacina-desinfectante que presentó mayor cambio en su actividad antimicrobiana y en sus parámetros farmacocinéticos se analizó mediante el espectrómetro de FT-IR, marca Perkin Elmer®, modelo Spectrum GX® con un sistema ATR acoplado, marca Sens IR Technologies®, modelo DuraSampl IR II®. Se utilizó el software Spectrum® versión 5.02, 2004, Perkin Elmer Inc.

Las condiciones de adquisición de los espectros fueron:

Resolución: 4.0 cm^{-1}

Escaneos: 30

Apodización: fuerte, velocidad OPD 0.5 cm/s y resolución: 8.00 cm^{-1}

Región del espectro de utilizado para el análisis: 600-4000 cm^{-1}

La mezcla que presentó más modificaciones *in vitro* e *in vivo* fue la de amoxicilina-hipoclorito de sodio, por lo que se preparó una mezcla con amoxicilina 5mM e hipoclorito de sodio 40mM y agua desionizada cbp 20 mL y se dejó 30 minutos interactuar obteniéndose un precipitado. El precipitado y la amoxicilina (estándar) sin presencia del desinfectante se sometieron al análisis de FTIR.

La mezcla que presentó mayor cambio en su efecto antimicrobiano *in vitro* e *in vivo* de las mezclas enrofloxacina-desinfectantes fue la conformada por la enrofloxacina y el hipoclorito de sodio; por lo que se preparó una mezcla de enrofloxacina 5 mM e hipoclorito de sodio 40 mM y agua cbp 20 mL y se obtuvo también el FT-IR del precipitado resultante de la mezcla y de la enrofloxacina (estándar).

6.4 Análisis mediante HPLC masas (HPLC-MS)

Las mezclas que se analizaron por medio de FT-IR también se sometieron a análisis de HPLC-masas. Para el análisis de HPLC-MS, se utilizó un cromatógrafo de líquidos, modelo Series 1200, Marca Agilent® (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), con una columna extend C18, 5 μm 4.6 x 150 mm Agilent® y un detector de masas ESI. Las

fases móviles consistieron en: agua conteniendo 0.1% de ácido fórmico (A) y 100% acetonitrilo (B). El programa de gradiente de elución usado fue:

0-2 min; 95% A y 5% B

2-5 min; 90% A y 10% B

5-19 min; 10% A y 90% B

19-20 min; 95% A y 5% B

La temperatura de la columna fue de 25 °C y el flujo se mantuvo a 0.5 µL/ min. Los cromatogramas fueron registrados usando un espectrómetro de masas, modelo G6410 LCMS Triple Cuadrupole, Marca Agilent® con una fuente de ionización por electrospray (ESI). La fase ESI fue utilizada en modo de “ionización negativa”. Se utilizaron los siguientes parámetros en los instrumentos:

Temperatura gas 350 °C

Flujo de gas 8 l/min

Nebulización 30 psi

Capilaridad 4000 V

7. RESULTADOS

7.1 Pruebas microbiológicas

Al determinar las modificaciones microbiológicas generadas por el tiempo de contacto entre los antibióticos, sanitizantes y agua en diferentes tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 y 24 horas, se eligió el último tiempo donde existieron cambios estadísticamente significativos en el tamaño de halo de inhibición para usarse en las pruebas de isobologramas. El tiempo de contacto entre el sanitizante, antibiótico y agua fue establecido en 0.5 horas, debido a que en los demás tiempos no existió diferencia estadísticamente significativa entre halos de inhibición ($P < 0.05$) (Cuadros 6 y 7).

Cuadro 6. Media aritmética de los halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas amoxicilina-sanitizantes-agua resultantes de diferentes horas de interacción

Hora	Tratamiento							
	Amoxicilina ¹		ACI++++ ²		AI++++ ³		AC++++ ⁴	
	X	±DE	X	±DE	X	±DE	X	±DE
	Halos de inhibición (mm)							
0	36.6 ^a	0.1	4.6 ^a	0.3	34.1 ^a	0.2	39.2 ^a	0.4
0.5	36.6 ^b	0.1	4.0 ^b	0.1	33.8 ^b	0	38.7 ^b	0.3
1	36.6 ^b	0.2	4.0 ^b	0.1	33.8 ^b	0.3	38.7 ^b	0.3
2	36.6 ^b	0.2	4.0 ^b	0.4	33.8 ^b	0.2	38.7 ^b	0.1
3	36.6 ^b	0.1	4.0 ^b	0.1	33.8 ^b	0.4	38.7 ^b	0.5
4	36.6 ^b	0.2	4.0 ^b	0.2	33.8 ^b	0.1	38.7 ^b	0.1
5	36.6 ^b	0.1	4.0 ^b	0.3	33.8 ^b	0.2	38.7 ^b	0.1
6	36.6 ^b	0.3	4.0 ^b	0.1	33.8 ^b	0.1	38.7 ^b	0.2
12	35.8 ^b	0.1	3.9 ^b	0.1	33.6 ^b	0.2	38.5 ^b	0.3
24	35.6 ^b	0.3	3.9 ^b	0.2	33.6 ^b	0.3	38.5 ^b	0.1

¹ Amoxicilina 50 µg/mL.

² Amoxicilina 50 µg/mL e hipoclorito de sodio 40 µg/mL

³ Amoxicilina 50 µg/mL y yodo 64 µg/mL.

⁴ Amoxicilina 50 µg/mL y citrato 16 µg/mL.

^{a-c} Diferentes literales en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$), la prueba de comparaciones múltiples fue Bonferroni.

Cuadro 7. Media aritmética de los halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas enrofloxacina-sanitizantes-agua resultantes de diferentes horas de interacción

Hora	Tratamientos							
	Enrofloxacina ¹		ECl++++ ²		EI++++ ³		EC++++ ⁴	
	Halos de inhibición (mm)							
	X	±DE	X	±DE	X	±DE	X	±DE
0	29.3 ^a	0.3	20.9 ^a	0.5	26.6 ^a	0.7	33.5 ^a	0.4
0.5	29.1 ^b	0.1	19.8 ^b	0.1	25.5 ^b	0.2	34.2 ^b	0.6
1	29.5 ^b	0.6	19.7 ^b	0.3	25.3 ^b	0.0	34.5 ^b	0.4
2	29.3 ^b	0.1	19.8 ^b	0.5	25.0 ^b	0.7	34.1 ^b	0.2
3	29.1 ^b	0.1	19.4 ^b	0.6	25.7 ^b	0.1	34.3 ^b	0.1
4	29.6 ^b	0.2	19.7 ^b	0.3	25.6 ^b	0.3	34.6 ^b	0.5
5	29.1 ^b	0.7	19.3 ^b	0.6	25.1 ^b	0.6	33.8 ^b	0.2
6	29.0 ^b	0.5	19.8 ^b	0.1	25.4 ^b	0.2	34.1 ^b	0.4
12	29.2 ^b	0.3	19.5 ^b	0.4	25.8 ^b	0.3	34.5 ^b	0.5
24	29.5 ^b	0.2	19.6 ^b	0.5	25.7 ^b	0.4	33.7 ^b	0.7

¹ Enrofloxacina 50 µg/mL.

² Enrofloxacina 50 µg/mL e hipoclorito de sodio 40 µg/mL

³ Enrofloxacina 50 µg/mL y yodo 64 µg/mL.

⁴ Enrofloxacina 50 µg/mL y citrato 16 µg/mL.

^{a-c} Diferentes literales en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$), la prueba de comparaciones múltiples fue Bonferroni.

7.1.1 Amoxicilina-hipoclorito de sodio-agua

En el cuadro 8 se muestran los cambios sobre el efecto antibacteriano sufridos por la amoxicilina-hipoclorito de sodio-agua en sus diversas concentraciones evaluadas, en todas ellas se obtuvo una disminución de la actividad antibacteriana ($P < 0.05$) con respecto al efecto de la mezcla amoxicilina-agua.

Cuadro 8. Media aritmética de los halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas amoxicilina-cloro-agua

Amoxicilina	Inhibición (mm)									
	50 µg/mL		5 µg/mL		0.5 µg/mL		0.05 µg/mL		0.00 µg/mL	
Cloro	MED	±DE	MED	±DE	MED	±DE	MED	±DE	MED	±DE
0 µg/mL	36.4 ^a	0.6	28.2 ^a	0.3	22.7 ^a	0.8	15.9 ^a	0.2	0.0 ^a	0.0
5 µg/mL	6.9 ^b	0.3	4.78 ^b	0.6	4.6 ^b	0.6	4.5 ^b	0.7	10.0 ^b	0.8
10 µg/mL	6.3 ^{bc}	0.4	4.3 ^{bcd}	0.4	3.5 ^{bcd}	0.3	3.0 ^{cde}	0.5	14.1 ^c	0.4
20 µg/mL	5.7 ^c	0.3	4.0 ^{bd}	0.2	3.4 ^c	0.5	2.5 ^{de}	0.4	17.4 ^d	0.8
40 µg/mL	4.4 ^d	0.2	3.4 ^{cd}	0.4	2.9 ^{cd}	0.0	2.4 ^e	0.6	22.1 ^e	0.4

^{a-e} Diferentes literales en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Nota: La prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni se realizó con las medias marginales y error estándar ajustados por el modelo.

7.1.2 Amoxicilina-iodóforo-agua

En el cuadro 9 se presenta el efecto del iodóforo (iodo libre) sobre la amoxicilina, puede observarse que el efecto del desinfectante sobre los halos de inhibición del antibiótico fue nulo en las diversas concentraciones que se evaluaron, con excepción de las 2 mezclas que estuvieron conformadas por la mayor concentración de iodo (64 µg/mL) y las concentraciones mayores de amoxicilina (50 y 5 µg/mL) ($P < 0.05$).

Cuadro 9. Media aritmética de halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas amoxicilina-iodo-agua

Inhibición (mm)										
Amoxicilina	50 µg/mL		5 µg/mL		0.5 µg/mL		0.05 µg/mL		0.00 µg/mL	
Iodo	MED	±DE								
0 µg/mL	35.2 ^a	0.5	28.2 ^a	0.8	22.7 ^a	0.5	15.9 ^a	0.2	0.0 ^a	0.0
8 µg/mL	35.2 ^a	0.2	28.3 ^a	0.3	23.5 ^a	0.4	16.1 ^a	0.3	14.2 ^b	0.2
16 µg/mL	35.1 ^a	0.6	28.3 ^a	0.2	23.1 ^a	0.5	15.8 ^a	0.5	15.5 ^c	0.6
32 µg/mL	34.9 ^a	0.6	28.4 ^a	0.4	22.6 ^a	0.4	15.7 ^a	0.4	16.9 ^d	0.4
64 µg/mL	33.7 ^b	0.4	26.9 ^b	0.5	22.4 ^a	0.3	15.6 ^a	0.7	19.2 ^c	0.3

^{a-c} Diferentes literales en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Nota: La prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni se realizó con las medias marginales y error estándar ajustados por el modelo.

7.1.3 Amoxicilina-desinfectante a base de citratos-agua

En el cuadro 10 se muestran las consecuencias de la mezcla amoxicilina-desinfectante a base de citratos-agua, en donde se hace notar que el efecto antibacteriano de la amoxicilina a la concentración de 50 µg/mL se vio favorecido por la presencia del desinfectante en todas sus diluciones ($P < 0.05$). También se observa que a la concentración de 5 µg/mL de amoxicilina en conjunto con las concentraciones de 8 y 16 mg/mL del desinfectante a base de citratos presenta un aumento en su efecto antimicrobiano ($P < 0.05$).

Cuadro 10. Media aritmética de halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas amoxicilina-desinfectante a base de citratos-agua

Inhibición (mm)										
Amoxicilina	50 µg/mL		5 µg/mL		0.5 µg/mL		0.05 µg/mL		0.00 µg/mL	
	Citrato	MED ±DE	MED ±DE	MED ±DE	MED ±DE	MED ±DE	MED ±DE	MED ±DE	MED ±DE	MED ±DE
0 mg/mL		35.2 ^a 0.2	28.2 ^a 0.4	22.7 ^a 0.7	15.9 ^a 1.0	0.0 ^a 0.0				
2 mg/mL		36.0 ^b 0.6	28.9 ^{ad} 0.6	21.6 ^a 0.6	14.8 ^{abc} 0.4	8.7 ^b 0.5				
4 mg/mL		37.2 ^c 0.4	29.2 ^{ad} 0.7	21.9 ^a 0.6	14.9 ^{ab} 0.1	13.6 ^c 0.6				
8 mg/mL		37.6 ^c 0.4	29.3 ^{bd} 0.3	22.0 ^a 0.4	15.6 ^{abc} 0.6	15.2 ^d 0.3				
16 mg/mL		38.4 ^c 0.5	30.8 ^c 0.6	22.7 ^a 0.5	16.7 ^a 0.6	17.1 ^e 0.4				

^{a-c} Diferentes literales en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Nota: La prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni se realizó con las medias marginales y error estándar ajustados por el modelo.

7.1.4 Enrofloxacin-a-hipoclorito de sodio-agua

En el cuadro 11 se presenta el resultado del efecto del desinfectante sobre la enrofloxacin-a, a la concentración más baja del hipoclorito (5 µg/mL de cloro libre) con las concentraciones de 50, 5, 0.5 µg/mL de enrofloxacin-a aumenta la actividad antibacteriana ($P < 0.05$) y conforme se aumentan las concentraciones del desinfectante se ve disminuido dicho efecto para las mismas mezclas de enrofloxacin-a ($P < 0.05$).

Cuadro 11. Media aritmética de halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas enrofloxacina-cloro-agua

Inhibición (mm)										
Enrofloxacina	50 µg/mL		5 µg/mL		0.5 µg/mL		0.05 µg/mL		0.00 µg/mL	
	Cloro	MED	DE	MED	±DE	MED	±DE	MED	±DE	MED
0 µg/mL	29.3 ^a	0.5	21.5 ^a	0.3	9.9 ^a	±0.5	0.0 ^a	±0.0	0.0 ^a	±0.0
5 µg/mL	31.0 ^b	0.4	23.1 ^b	0.3	11.7 ^b	±0.4	8.1 ^b	±0.4	9.0 ^b	±0.5
10 µg/mL	24.2 ^c	0.5	14.8 ^{bd}	0.4	8.5 ^c	±0.5	9.8 ^{ce}	±0.4	10.8 ^c	±0.5
20 µg/mL	21.0 ^{bc}	0.6	13.6 ^{bcd}	0.4	7.6 ^{bcd}	±0.2	16.9 ^{def}	±0.6	19.7 ^d	±0.1
40 µg/mL	19.7 ^d	0.6	10.5 ^{cd}	0.5	7.4 ^{cd}	±0.3	11.8 ^{ef}	±0.2	25.3 ^e	±0.2

^{a-f} Diferentes literales en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Nota: La prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni se realizó con las medias marginales y error estándar ajustados por el modelo.

7.1.5 Enrofloxacina-iodóforo-agua

En el cuadro 12 se presentan los efectos del desinfectante sobre la actividad antimicrobiana de la enrofloxacina, a la concentración de 64 µg/mL de iodo libre con 50 µg/mL de enrofloxacina se observa una disminución del efecto antibacteriano ($P < 0.05$) y en las otras mezclas donde la concentración de enrofloxacina fue de 50, 5 y 0.5 se observa un efecto indiferente con las diferentes concentraciones de iodo ($P < 0.05$).

Cuadro 12. Media aritmética de halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas enrofloxacina-iodo-agua

Inhibición (mm)											
Enrofloxacina	50 µg/mL		5 µg/mL		0.5 µg/mL		0.05 µg/mL		0.00 µg/mL		
	Iodo	MED	±DE	MED	±DE	MED	±DE	MED	±DE	MED	±DE
0 µg/mL	29.3 ^a	0.4		21.8 ^a	0.7	9.9 ^a	0.2	0.0 ^a	0.0	0.0 ^a	0.0
8 µg/mL	28.8 ^a	0.5		22.1 ^a	0.6	10.9 ^{ab}	0.6	7.5 ^b	1.1	7.3 ^b	0.3
16 µg/mL	29.0 ^a	0.6		22.5 ^a	0.4	9.0 ^{ac}	0.1	8.5 ^{bc}	0.6	7.5 ^{bc}	0.5
32 µg/mL	28.8 ^a	0.6		21.6 ^a	0.3	9.2 ^{acd}	0.4	9.4 ^c	0.4	8.9 ^c	0.6
64 µg/mL	25.1 ^b	0.7		21.5 ^a	0.3	10.1 ^{abcd}	0.4	9.6 ^c	0.3	10.9 ^d	0.5

^{a-d} Diferentes literales en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Nota: La prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni se realizó con las medias marginales y error estándar ajustados por el modelo.

7.1.6 Enrofloxacina-desinfectante a base de citratos-agua

En el cuadro 13 se presentan los resultados de las mezclas enrofloxacina-desinfectante a base de citratos-agua, puede observarse un aumento de la actividad del antibacteriano en presencia del desinfectante en la mezcla con una concentración de 50 y 5 µg/mL de enrofloxacina con las diferentes concentraciones del desinfectante ($P < 0.05$). De igual forma se ve un aumento en la actividad antimicrobiana en las concentraciones de 0.5 y 0.05 µg/mL de enrofloxacina con la mayor concentración del desinfectante (16 mg/mL).

Cuadro 13. Media aritmética de halos de inhibición (mm) obtenidos de las mezclas enrofloxacina-desinfectante a base de citratos-agua

Inhibición (mm)										
Enrofloxacina	50 µg/mL		5 µg/mL		0.5 µg/mL		0.05 µg/mL		0.00 µg/mL	
Citrato	MED	±DE	MED	±DE	MED	±DE	MED	±DE	MED	±DE
0 mg/mL	29.3 ^a	0.5	21.5 ^a	0.3	9.9 ^a	0.4	0.0 ^a	0.0	0.0 ^a	0.0
2 mg/mL	31.9 ^b	0.7	22.4 ^b	0.5	10.0 ^a	0.6	0.0 ^a	0.0	10.5 ^b	0.3
4 mg/mL	32.0 ^{bc}	0.6	22.5 ^b	0.5	10.1 ^a	0.5	0.0 ^a	0.0	11.1 ^b	0.7
8 mg/mL	32.6 ^{cd}	0.3	22.6 ^b	0.3	10.2 ^a	0.3	0.0 ^a	0.0	16.0 ^c	0.2
16 mg/mL	33.4 ^d	0.5	22.9 ^b	0.1	11.7 ^b	0.3	5.3 ^b	0.3	21.7 ^d	0.4

^{a-d} Diferentes literales en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Nota: La prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni se realizó con las medias marginales y error estándar ajustados por el modelo.

7.2 Pruebas farmacocinéticas

Los resultados de los grupos con las mezclas únicamente del desinfectante-agua (Cl++++, I++++, C++++) fueron omitidos en las gráficas y cuadros, debido a que no existió actividad antimicrobiana en ninguna de ellas.

7.2.1 Amoxicilina-hipoclorito de sodio-agua

En la figura 6 y cuadro 14 se presentan los resultados de las mezclas de amoxicilina-cloro-agua de los grupos a los que se les administró alguna de las mezclas con el hipoclorito de sodio (grupo ACl+, ACl++, ACl+++, ACl++++), se puede observar una disminución ($P < 0.05$) en todos los parámetros farmacocinéticos con respecto al grupo testigo (A). También en la figura anterior se muestra la CMI₉₀ de amoxicilina establecida por Huang y *col.* (2009) para *Pasteurella multocida*.

Figura 6. Media y DE de la concentración de amoxicilina en suero de los diferentes grupos de aves. Grupo A: amoxicilina 50 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo ACI+: amoxicilina 50 mg/mL, cloro libre 0.005 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo ACI++: amoxicilina 50 mg/mL, cloro libre 0.010 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo ACI+++: amoxicilina 50 mg/mL, cloro libre 0.020 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL y grupo ACI++++: amoxicilina 50 mg/mL, cloro libre 0.040 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL.

*CMI₉₀ de amoxicilina establecida para *Pasteurella multocida* aislada de pollos enfermos (Huang y col., 2009).

Cuadro 14. Parámetros farmacocinéticos (media y DS) de amoxicilina-hipoclorito de sodio-agua en pollos de los diferentes grupos de prueba

Variable	Grupos									
	A		ACI+		ACI++		ACI+++		ACI++++	
	X	±DE	X	±DE	X	±DE	X	±DE	X	±DE
T_{½β}	0.8 ^a	0.0	0.7 ^b	0.0	0.2 ^c	0.0	0.1 ^c	0.0	-	-
T_{max}	1.2 ^a	0.1	1.0 ^b	0.0	0.3 ^c	0.0	0.2 ^c	0.0	0.4 ^d	0.0
C_{smax}	11.1 ^a	0.7	5.1 ^b	1.2	3.6 ^c	0.2	3.3 ^{bc}	1.0	1.4 ^d	0.5
AUC	39.1 ^a	0.5	10.8 ^b	0.8	4.6 ^c	0.0	2.4 ^d	0.0	-	-
AUCM	101.2 ^a	5.4	22.8 ^b	3.3	3.0 ^c	0.4	1.3 ^c	0.8	-	-
MRT	2.4 ^a	0.0	2.0 ^b	0.1	0.6 ^c	0.0	0.5 ^c	0.1	-	-
Fr¹	100.0 ^a	0.0	27.5 ^b	2.0	11.8 ^c	0.2	6.1 ^d	0.9	-	-

^{a-d} Diferentes literales en cada fila indica diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05).

¹Fr = biodisponibilidad relativa (AUC_{interacción}/AUC_{estándar}) * 100.

7.2.2 Amoxicilina-iodóforo-agua

En la figura 7 y en el cuadro 15 se presentan los resultados de las mezclas amoxicilina-iodóforo-agua, se puede observar que sólo en la mezcla del grupo AI++++ existió diferencia estadísticamente significativa en los valores farmacocinéticos con respecto al testigo, obteniéndose un decremento en la C_{smax}, AUC y biodisponibilidad relativa (Fr) (P<0.05 en todos los casos). Además en la figura anterior se muestra la CMI₉₀ de amoxicilina establecida por Huang y col. (2009) para *Pasteurella multocida*.

Figura 7. Media y DE de la concentración de amoxicilina en suero de los diferentes grupos de aves. Grupo A: amoxicilina 50 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo AI+: amoxicilina 50 mg/mL, iodo libre 0.008 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo AI++: amoxicilina 50 mg/mL, iodo libre 0.016 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo AI+++: amoxicilina 50 mg/mL, iodo libre 0.032 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL y grupo AI++++: amoxicilina 50 mg/mL, iodo libre 0.064 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL.

*CMI₉₀ de amoxicilina establecida para *Pasteurella multocida* aislada de pollos enfermos (Huang y col. 2009).

Cuadro 15. Parámetros farmacocinéticos (media y DS) de amoxicilina-iodóforo-agua en pollos de los diferentes grupos de prueba

Variable	Grupos									
	A		AI+		AI++		AI+++		AI++++	
	X	±DE								
T_{½β}	0.8 ^a	0.0	1.0 ^b	0.0						
T_{max}	1.2 ^a	0.1	1.3 ^a	0.0	1.3 ^a	0.0	1.2 ^a	0.0	1.4 ^b	0.0
C_{smax}	11.1 ^a	0.7	10.9 ^a	0.4	11.0 ^a	0.5	10.5 ^a	0.6	9.4 ^b	0.3
AUC	39.1 ^a	0.5	39.1 ^a	1.1	39.1 ^a	2.0	39.1 ^a	2.3	37.0 ^b	1.0
AUCM	101.2 ^a	5.4	101.1 ^a	5.8	101.2 ^a	8.2	101.2 ^a	7.7	113.1 ^b	7.2
MRT	2.4 ^a	0.0	2.4 ^a	0.0	2.4 ^a	0.1	2.4 ^a	0.0	2.6 ^b	0.0
Fr¹	100.0 ^a	0.0	100.0 ^a	1.2	99.9 ^a	0.0	99.9 ^a	2.1	94.6 ^b	1.1

^{a-b} Diferentes literales en cada fila indica diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05).

¹Fr = biodisponibilidad relativa (AUC_{interacción}/AUC_{estándar}) * 100.

7.2.3 Amoxicilina-desinfectante a base de citratos-agua

En la figura 8 y en el cuadro 16 se presentan los resultados de las mezclas amoxicilina-desinfectante a base de citratos-agua, se puede observar que los grupos AC++, AC+++ y AC++++ presentaron valores mayores de C_{smax} y Fr (P<0.05) y que las dos últimas mezclas exhibieron también un incremento en el AUC, AUCM y MRT (P<0.05 para todos los casos). Todos estos cambios con respecto al grupo A (testigo). Igualmente en la figura 8 se muestra la CMI₉₀ de amoxicilina establecida por Huang y col. (2009) para *Pasteurella multocida*.

Figura 8. Media y DE de la concentración de amoxicilina en suero de los diferentes grupos de aves. Grupo A: amoxicilina 50 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo AC+: amoxicilina 50 mg/mL, desinfectante citrato 2 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo AC++: amoxicilina 50 mg/mL, desinfectante citrato 4 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo AC+++: amoxicilina 50 mg/mL, desinfectante citrato 8 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL y grupo AC++++: amoxicilina 50 mg/mL, desinfectante citrato 16 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL.

*CMI₉₀ de amoxicilina establecida para *Pasteurella multocida* aislada de pollos enfermos (Huang y col. 2009).

Cuadro 16. Parámetros farmacocinéticos (media y DS) de amoxicilina-desinfectante a base de citratos-agua en pollos de los diferentes grupos de prueba

Variable	Grupos									
	A		AC+		AC++		AC+++		AC++++	
	X	±DE	X	±DE	X	±DE	X	±DE	X	±DE
T_{½β}	0.8 ^a	0.0	0.8 ^{ab}	0.1	0.8 ^{ab}	0.0	0.7 ^{ab}	0.0	0.6 ^b	0.0
T_{max}	1.2 ^a	0.1	1.1 ^{ab}	0.1	1.1 ^{ab}	0.1	1.1 ^{ab}	0.0	1.0 ^b	0.0
C_{smax}	11.1 ^a	0.7	11.2 ^a	0.3	12.2 ^b	0.0	13.4 ^c	0.5	13.7 ^c	0.2
AUC	39.1 ^a	0.5	39.7 ^a	3.0	43.2 ^{ab}	3.2	47.0 ^b	1.2	51.8 ^c	3.9
AUCM	101.2 ^a	5.4	101.4 ^a	13.6	103.9 ^a	11.8	146.4 ^b	11.4	198.3 ^c	28.2
MRT	2.4 ^a	0.0	2.4 ^a	0.1	2.2 ^a	0.0	2.9 ^b	0.1	3.6 ^c	0.2
Fr¹	100.0 ^a	0.0	101.4 ^a	0.6	110.4 ^b	1.1	119.9 ^c	2.0	132.3 ^d	1.7

^{a-c} Diferentes literales en cada fila indica diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05).

¹Fr = biodisponibilidad relativa (AUC_{interacción}/AUC_{estándar}) * 100.

7.2.4 Enrofloxacin-a-hipoclorito de sodio-agua

En la figura 9 y en el cuadro 17 se presentan los resultados de las mezclas enrofloxacin-a-hipoclorito de sodio-agua, se aprecia que el grupo con menor cantidad del desinfectante (ECL+) presenta la mayor C_{smax} mientras que los grupos a los que se les administró las otras mezclas con el desinfectante presentan C_{smax}, AUC, AUCM, MRT y Fr menores (P<0.05) que la que se obtuvo en el grupo E (testigo). Asimismo en la figura 9 se muestra la CMI₉₀ de enrofloxacin establecida para *Escherichia coli* (0.13 µg/mL) para aves de producción (NVAL, 2013).

Figura 9. Media y DE de la concentración de enrofloxacin en suero de los diferentes grupos de aves. Grupo E: enrofloxacin 25 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo ECI+: enrofloxacin 25 mg/mL, cloro libre 0.005 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo ECI++: enrofloxacin 25 mg/mL, cloro libre 0.010 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo ECI+++ : enrofloxacin 25 mg/mL, cloro libre 0.020 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL y grupo ECI++++: enrofloxacin 25 mg/mL, cloro libre 0.040 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL.

*CMI₉₀ de enrofloxacin establecida para *Escherichia coli* (0.13 µg/mL) para aves de producci3n (NVAL, 2013).

Cuadro 17. Parámetros farmacocinéticos (media y DS) de enrofloxacina-hipoclorito de sodio-agua en pollos de los diferentes grupos de prueba

Variable	Grupos									
	E		ECI+		ECI++		ECI+++		ECI++++	
	X	±DE	X	±DE	X	±DE	X	±DE	X	±DE
T_{1/2β}	1.9 ^a	0.1	1.7 ^a	0.0	1.3 ^b	0.0	1.4 ^b	0.0	1.3 ^b	0.2
T_{max}	2.7 ^a	0.1	2.5 ^a	0.0	1.9 ^b	0.0	2.0 ^b	0.0	1.9 ^b	0.2
C_{smax}	2.1 ^a	0.1	2.3 ^b	0.0	0.9 ^c	0.0	0.9 ^c	0.0	0.7 ^d	0.0
AUC	14.8 ^a	1.4	15.1 ^a	0.4	4.9 ^b	0.2	4.5 ^{bc}	0.2	3.4 ^c	0.5
AUCM	76.0 ^a	10.5	70.5 ^a	2.7	17.9 ^b	1.7	16.9 ^b	1.7	12.3 ^b	3.9
MRT	5.5 ^a	0.3	5.0 ^a	0.0	3.9 ^b	0.1	4.0 ^b	0.1	3.8 ^b	0.5
Fr¹	100.0 ^a	0.0	101.8 ^a	2.9	33.1 ^b	1.8	30.6 ^b	2.0	22.9 ^c	3.4

^{a-d} Diferentes literales en cada fila indica diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05).

¹Fr = biodisponibilidad relativa (AUC_{interacción}/AUC_{estándar}) * 100.

7.2.5 Enrofloxacina-iodóforo-agua

En la figura 10 y en el cuadro 18 se presentan los resultados de las mezclas de enrofloxacina-iodóforo-agua, puede observarse que las mezclas con mayor cantidad del desinfectante (grupo EI+++ , grupo EI++++) presentaron un aumento en T_{1/2β}, T_{max} y MRT (P<0.05 en todos los casos) y un decremento (P<0.05) en la C_{smax} con respecto al grupo testigo (E). Además en dicha figura se muestra la CMI₉₀ de enrofloxacina establecida para *Escherichia coli* (0.13 µg/mL) para aves de producción (NVAL, 2013).

Figura 10. Media y DE de la concentración de enrofloxacin en suero de los diferentes grupos de aves. Grupo E: enrofloxacin 25 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo EI+: enrofloxacin 25 mg/mL, iodo libre 0.008 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo EI++: enrofloxacin 25 mg/mL, iodo libre 0.016 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo EI+++: enrofloxacin 25 mg/mL, iodo libre 0.032 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL y grupo EI++++: enrofloxacin 25 mg/mL, iodo libre 0.064 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL.

*CMI₉₀ de enrofloxacin establecida para *Escherichia coli* (0.13 µg/mL) para aves de producci3n (NVAL, 2013).

Cuadro 18. Parámetros farmacocinéticos (media y DS) de enrofloxacina-iodóforo-agua en pollos de los diferentes grupos de prueba

Variable	Grupos									
	E		EI+		EI++		EI+++		EI++++	
	X	±DE	X	±DE	X	±DE	X	±DE	X	±DE
T_{1/2β}	1.9 ^a	0.1	1.9 ^{ab}	0.0	2.0 ^{ab}	0.1	2.1 ^b	0.0	2.3 ^c	0.1
T_{max}	2.7 ^a	0.1	2.8 ^{ab}	0.1	2.9 ^{ab}	0.1	3.0 ^b	0.1	3.3 ^c	0.1
C_{smax}	2.1 ^a	0.1	1.9 ^a	0.0	2.0 ^a	0.0	1.8 ^b	0.0	1.7 ^b	0.0
AUC	14.8 ^a	1.4	14.0 ^a	0.7	14.7 ^a	0.8	13.8 ^a	0.7	14.2 ^a	0.8
AUCM	76.0 ^a	10.5	73.2 ^a	6.6	78.4 ^a	7.7	77.2 ^a	6.1	79.5 ^a	5.4
MRT	5.5 ^a	0.3	5.6 ^{ab}	0.2	5.8 ^{ab}	0.2	6.1 ^b	0.2	6.6 ^c	0.3
Fr¹	100.0 ^a	0.0	94.5 ^a	5.8	99.2 ^a	5.3	92.7 ^b	5.4	95.5 ^b	2.0

^{a-c} Diferentes literales en cada fila indica diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05).

¹Fr = biodisponibilidad relativa (AUC_{interacción}/AUC_{estándar}) * 100.

7.2.6 Enrofloxacina-desinfectante a base de citratos –agua

En la figura 11 y en el cuadro 19 se presentan los resultados de las mezclas enrofloxacina-desinfectante a base de citratos-agua, las mezclas con mayor concentración del desinfectante (EC+++ , EC++++) presentaron valores mayores de T_{1/2β}, T_{max}, C_{smax}, AUC, AUCM, MRT y Fr (P < 0.05 para todos los casos) con respecto al grupo testigo (grupo E). El grupo EC++ también presentó un incremento en todos los parámetros farmacocinéticos a excepción de la C_{smax}. También en la figura 11 se muestra la CMI₉₀ de enrofloxacina establecida para *Escherichia coli* (0.13 µg/mL) para aves de producción (NVAL, 2013).

Figura 11. Media y DE de la concentración de enrofloxacin en suero de los diferentes grupos de aves. Grupo E: enrofloxacin 25 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo EC+: enrofloxacin 25 mg/mL, desinfectante citrato 2 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo EC++: enrofloxacin 25 mg/mL, desinfectante citrato 4 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL, grupo EC+++ : enrofloxacin 25 mg/mL, desinfectante citrato 8 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL y grupo EC++++: enrofloxacin 25 mg/mL, desinfectante citrato 16 mg/mL y agua desionizada cbp 1mL.

*CMI₉₀ de enrofloxacin establecida para *Escherichia coli* (0.13 µg/mL) para aves de producci3n (NVAL, 2013).

Cuadro 19. Parámetros farmacocinéticos (media y DS) de enrofloxacin-desinfectante a base de citratos-agua en pollos de los diferentes grupos de prueba

Variable	Grupos									
	E		EC+		EC++		EC+++		EC++++	
	X	±DE	X	±DE	X	±DE	X	±DE	X	±DE
T_{1/2β}	1.9 ^a	0.1	2.1 ^{ab}	0.0	2.2 ^b	0.1	2.2 ^b	0.1	2.5 ^c	0.0
T_{max}	2.7 ^a	0.1	3.0 ^{ab}	0.0	3.1 ^b	0.2	3.2 ^b	0.1	3.7 ^c	0.1
C_{smax}	2.1 ^a	0.1	2.1 ^a	0.0	2.1 ^a	0.0	2.3 ^b	0.0	2.4 ^b	0.0
AUC	14.8 ^a	1.4	16.2 ^{ab}	0.5	17.0 ^b	1.3	18.9 ^c	0.4	22.9 ^d	0.7
AUCM	76.0 ^a	10.5	90.3 ^{ab}	3.4	99.4 ^{bc}	15.2	111.7 ^c	7.1	156.1 ^d	10.5
MRT	5.5 ^a	0.3	6.0 ^{ab}	0.0	6.3 ^b	0.4	6.4 ^b	0.2	7.4 ^c	0.2
Fr¹	100.0 ^a	0.0	109.2 ^b	3.4	114.2 ^b	9.3	127.4 ^c	3.2	154.1 ^d	5.0

^{a-d} Diferentes literales en cada fila indica diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05).

¹Fr = biodisponibilidad relativa (AUC_{interacción}/AUC_{estándar}) * 100.

7.3 Análisis mediante espectroscopia infrarroja (FT-IR)

7.3.1 Análisis FT-IR de la mezcla amoxicilina-desinfectante

El FTIR de amoxicilina (estándar) muestra en la región 3532 cm⁻¹ el estiramiento del grupo O-H, en 3163 y 2972 cm⁻¹ el grupo NH₃⁺ (figura 12), en 1773 cm⁻¹ el estiramiento C=O del anillo β- lactámico, en 1686 cm⁻¹ el estiramiento de C=O del grupo amida, en 1582 cm⁻¹ el estiramiento asimétrico de COO⁻ y en 1519 cm⁻¹ corresponde al anillo aromático (figura 13). Dichas señales están ausentes en el FTIR del precipitado de la mezcla amoxicilina-hipoclorito de sodio (Florey, 1975).

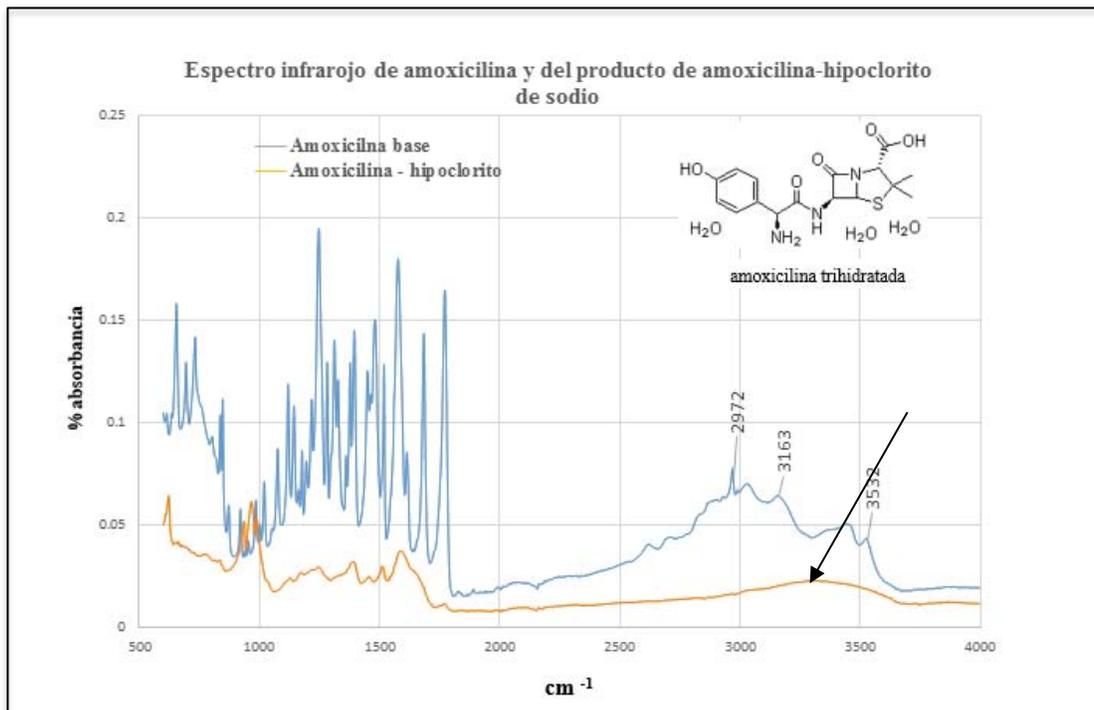


Figura 12. Espectro FT-IR de la amoxicilina y de la mezcla de amoxicilina trihidratada-hipoclorito de sodio.

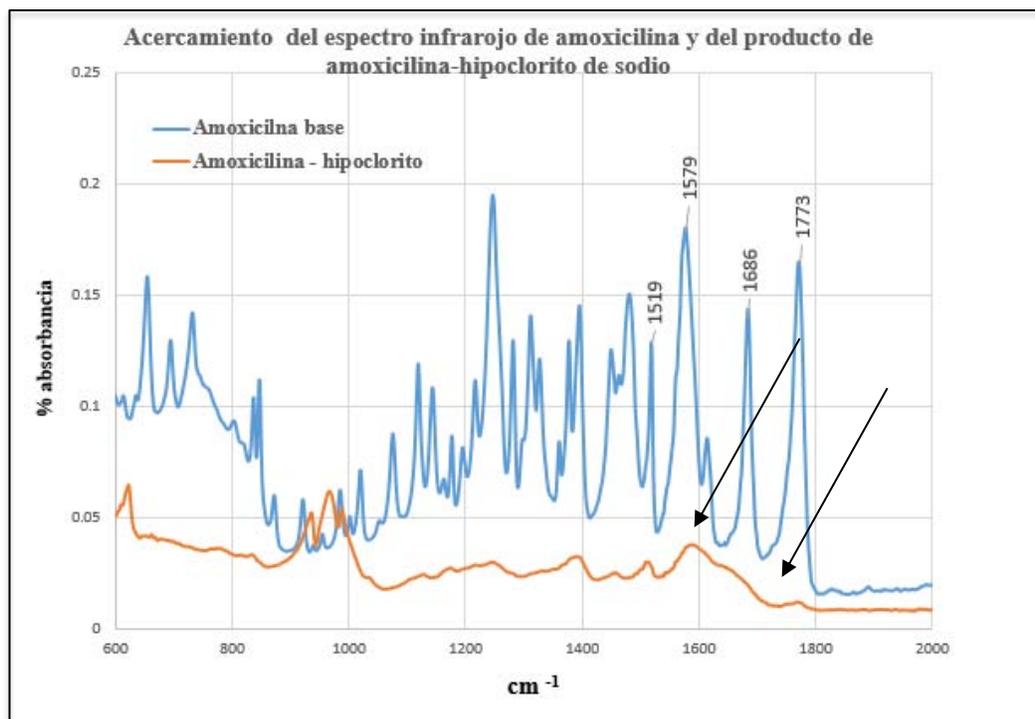


Figura 13. Acercamiento del espectro FT-IR de la amoxicilina y de la mezcla de amoxicilina trihidratada-hipoclorito de sodio

7.3.2 Análisis FT-IR de la mezcla enrofloxacin-desinfectante

En el FTIR de enrofloxacin se observa una señal a 2968 cm^{-1} (figura 14) que corresponde al estiramiento del grupo O-H, la region de $1734\text{-}1627\text{ cm}^{-1}$ corresponde a respuestas del grupo C=O, la señal correspondiente a 1336 cm^{-1} se debe a C-N, de la region $803\text{-}889\text{ cm}^{-1}$ pertenece a la señal de C-H y la respuesta a 1254 cm^{-1} a C-F (figura 15). Estas señales no son tan evidentes en el FTIR de la mezcla (Florey, 1975; Stuart, 2004; Ben Salem y col., 2015).

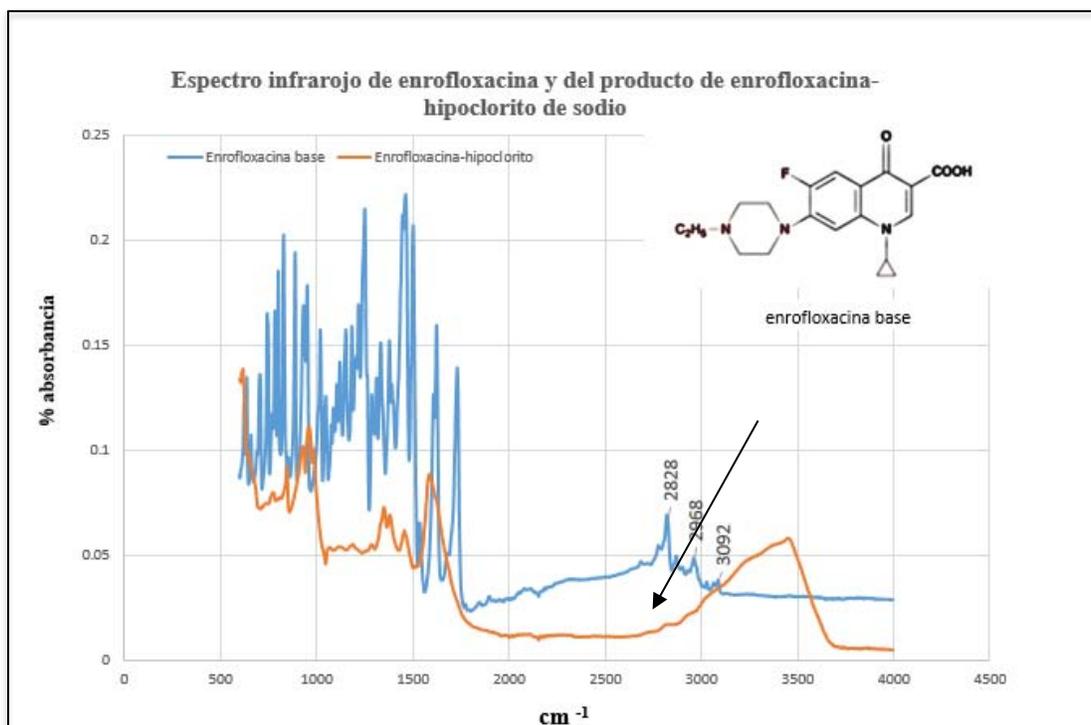


Figura 14. Espectro FT-IR de la enrofloxacin y de la mezcla de enrofloxacin-hipoclorito de sodio

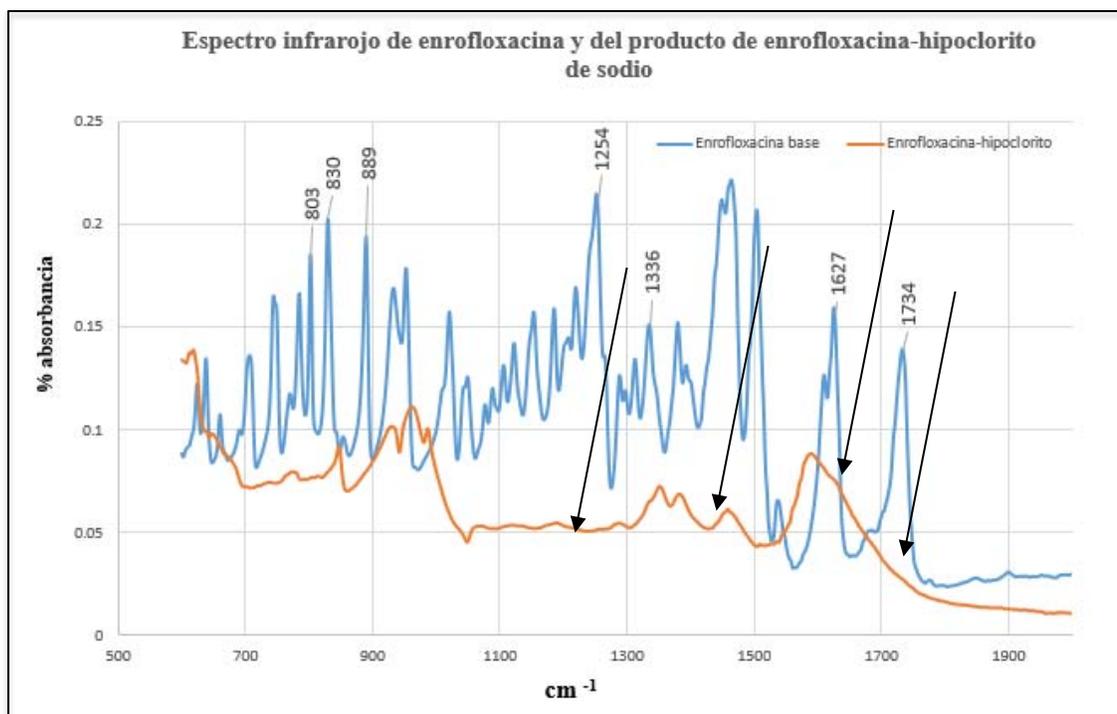


Figura 15. Acercamiento del espectro FT-IR de la enrofloxacina y de la mezcla de enrofloxacina-hipoclorito de sodio

7.4 Análisis HPLC-masas

7.4.1 Análisis HPLC-masas de la mezcla amoxicilina-desinfectante

La amoxicilina estándar (figura 16) se disolvió en agua y se introdujo a un equipo de HPLC-masas. Se observó claramente que hay un compuesto en una alta concentración correspondiente al tiempo de retención de 7.8 min y tres productos adicionales en menor concentración, estos se encuentran a 9, 10.2 y 10.5 minutos.

El principal compuesto es amoxicilina y en el espectro de masas (figura 17) se observa el monómero (364 m/z) y el dímero (729 m/z) (Clarke, 2011).

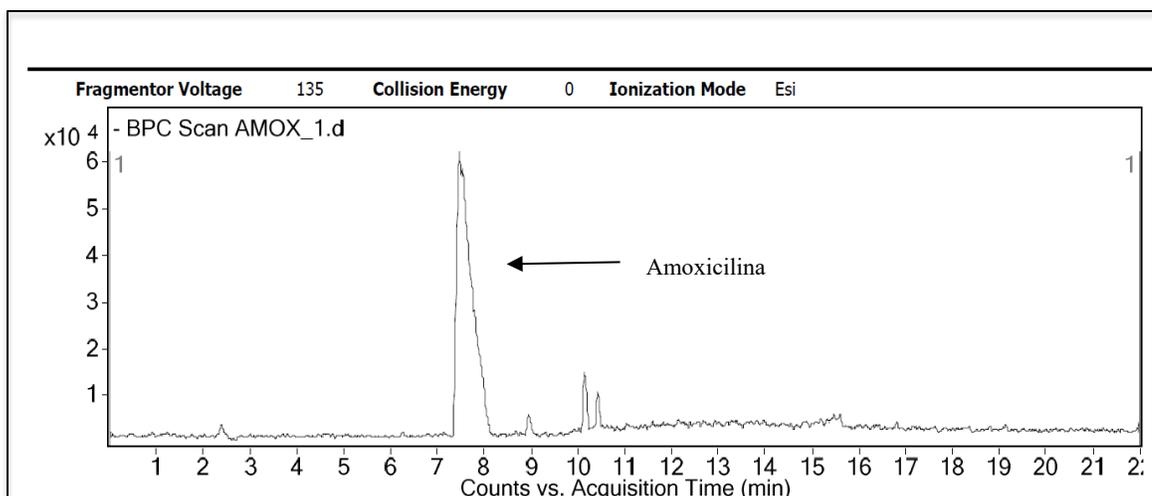


Figura 16. Cromatograma de amoxicilina trihidratada (estándar).

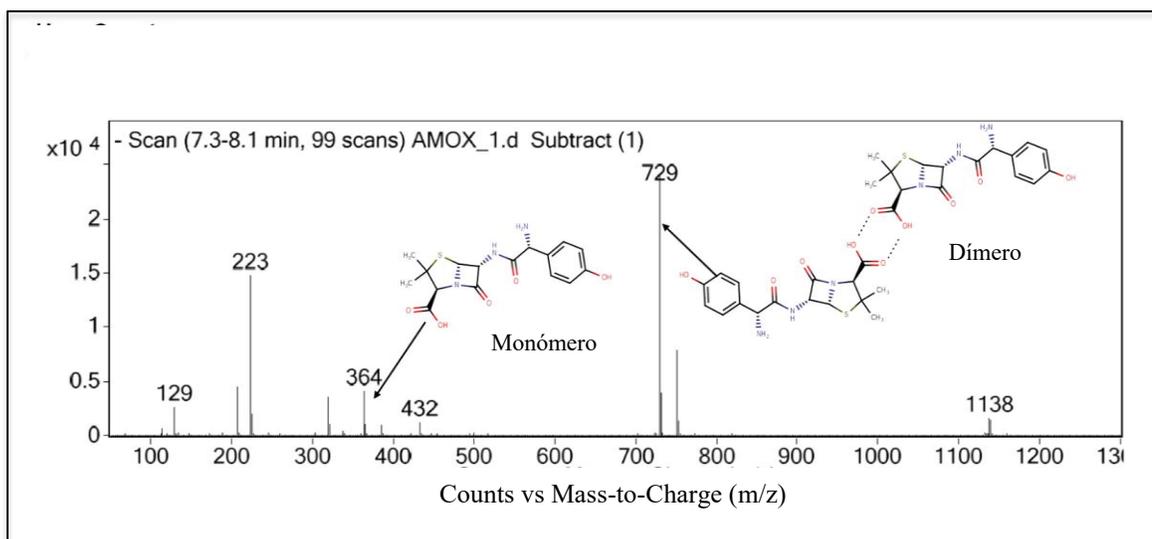


Figura 17. Monómero (364 m/z) y dímero (729 m/z) de amoxicilina trihidratada (estándar).

La mezcla de amoxicilina-hipoclorito de sodio también fue introducida en el HPLC-masas y se encontró que la interacción de la amoxicilina con el hipoclorito de sodio, provoca la descomposición de este antibiótico. El cromatograma obtenido bajo las mismas condiciones que el estándar se muestra en la figura 18, se observa que al tiempo de 8.1 minutos no hay amoxicilina, lo que indica que este antibiótico se descompuso

completamente. No hay un compuesto mayoritario, hay aproximadamente 32 productos de reacción.

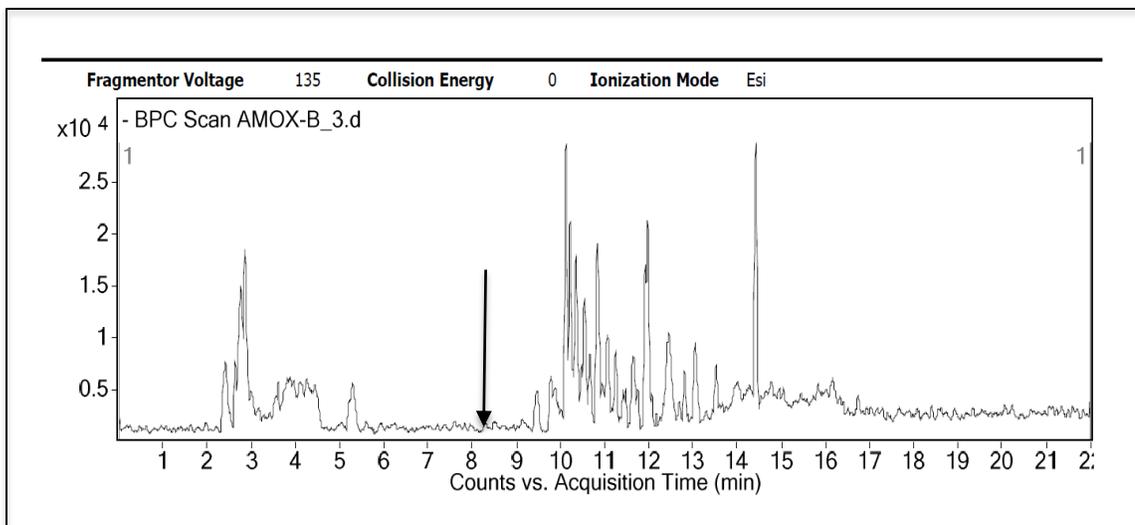


Figura 18. Cromatograma de la mezcla de amoxicilina-hipoclorito de sodio.

Los espectros de los productos de reacción de los tiempos de retención entre 9.4 y 11 minutos son los más intensos observándose abundancias isotópicas (figura 19) (Mistry, 2009).

7.4.2 Análisis HPLC-masas de la mezcla enrofloxacina-desinfectante

La enrofloxacina estándar se disolvió en acetonitrilo y se introdujo a un equipo de HPLC-masas. Se encontró un compuesto principal con tiempo de retención en 10.3 minutos aproximadamente y otros compuestos en una concentración muy baja a 13.5, 16, 16.5 y 16.9 minutos (figura 20). El espectro de masas del pico a 10.3 minutos efectivamente corresponde a la enrofloxacina. Se observan el ion molecular a 358 m/z y los dímeros a 717 m/z y trímero a 1098 m/z (figura 21) (USP, 1996).

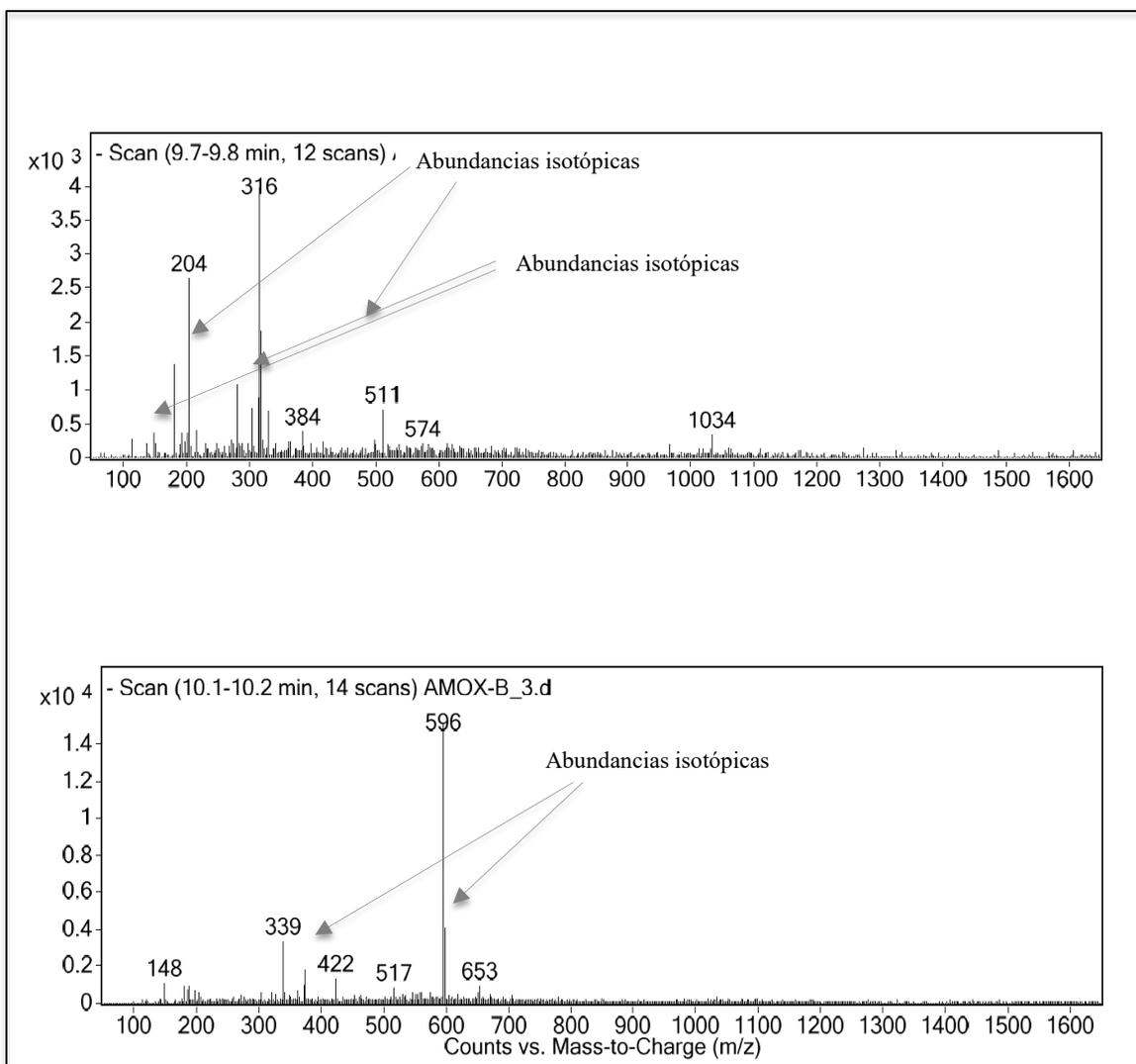


Figura 19. Espectro de masas de la mezcla de amoxicilina-hipoclorito de sodio.

La interacción de la enrofloxacin con el hipoclorito de sodio provocó también la descomposición de este antimicrobiano. El cromatograma obtenido bajo las mismas condiciones que la enrofloxacin estándar se muestra en la figura 22. Se observó que al tiempo de retención 10.3 minutos ya no hay ninguna señal de alguna sustancia en el cromatograma, esto indica que la enrofloxacin se descompuso completamente y se formaron mayoritariamente dos productos similares en polaridad a tiempos de retención de 4.3 y 5.2 minutos. Adicionalmente, diez productos más en menor cantidad entre 10 y 13 minuto y tres más entre 2 y 3 minutos.

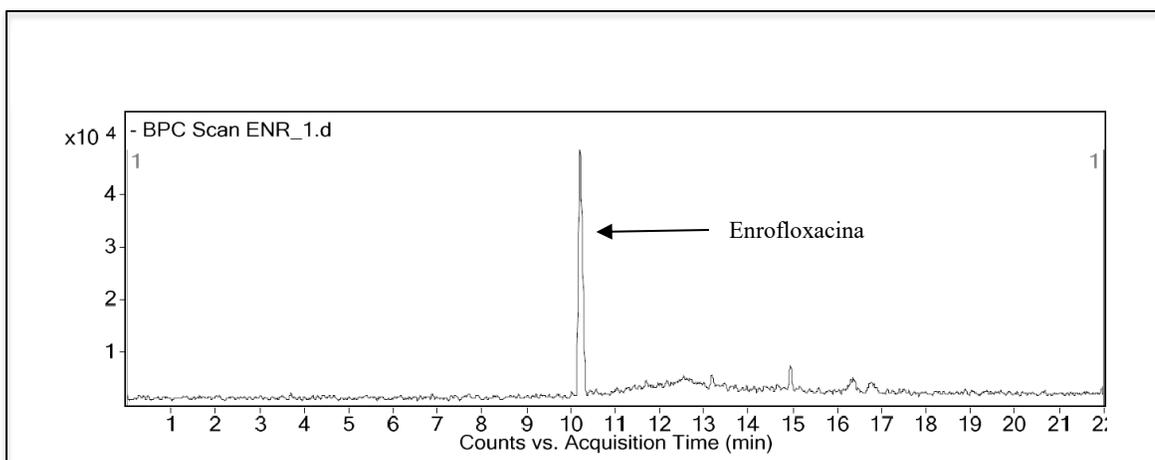


Figura 20. Cromatograma de enrofloxacina base (estándar).

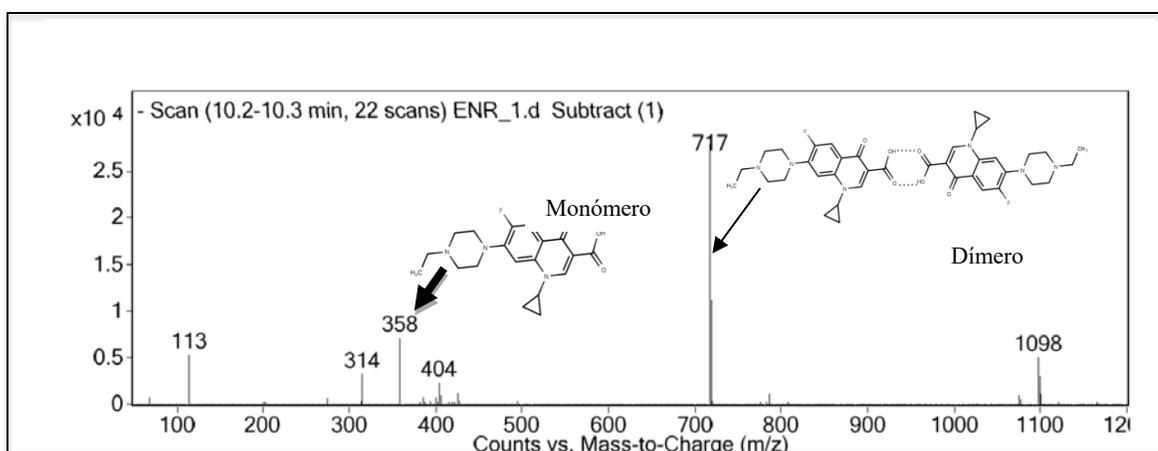


Figura 21. Espectro de masas de enrofloxacina base (estándar).

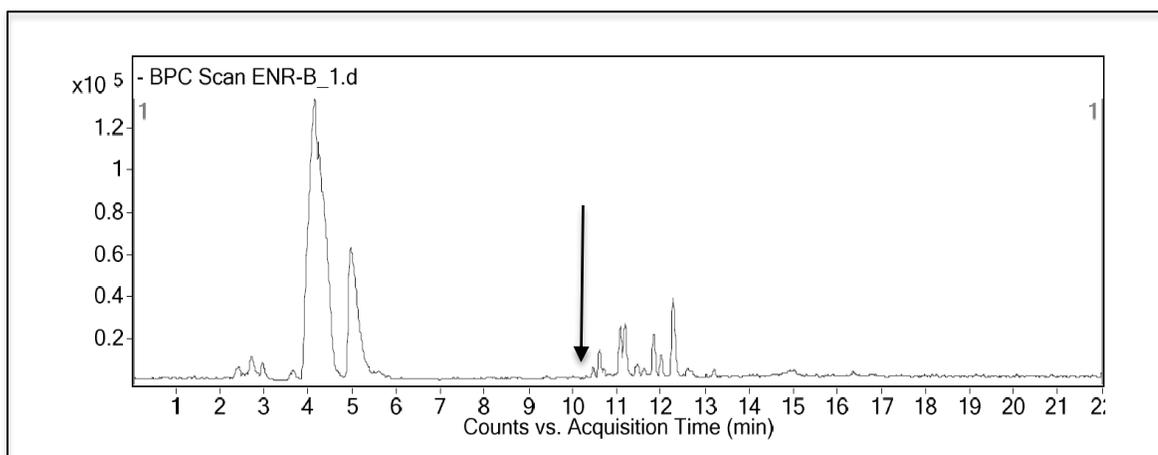


Figura 22. Cromatograma de la mezcla de enrofloxacina-hipoclorito de sodio.

El principal producto de descomposición se muestra en el espectro de masas (figura 23) que corresponde al producto del resultado de la fragmentación del anillo piperazínico (266 m/z) (Chemaxon, 1998).

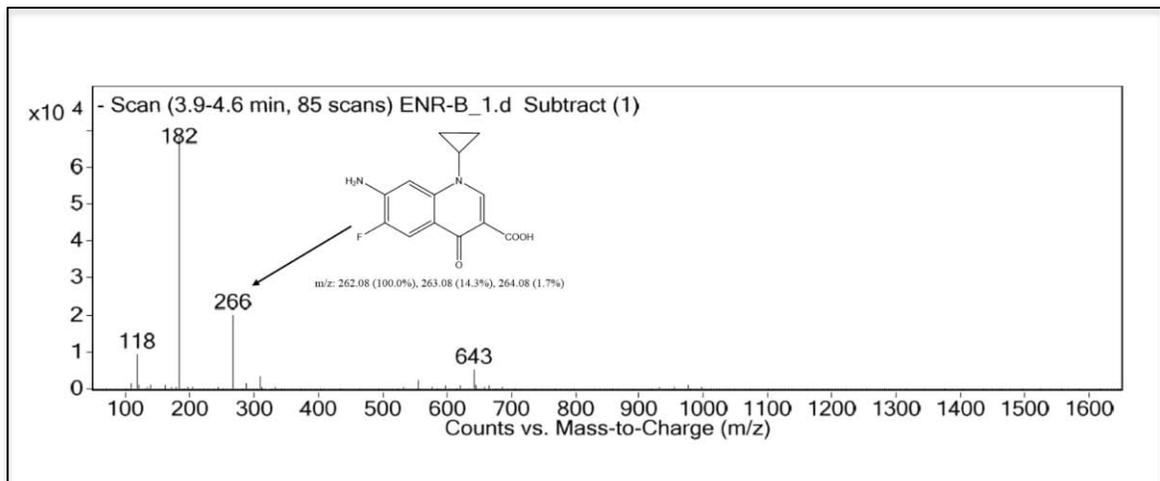


Figura 23. Espectro de masas de la mezcla enrofloxacin-hipoclorito de sodio.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se utilizaron las concentraciones y condiciones de trabajo lo más cercanas posibles a las prácticas comunes de desinfección a nivel campo, las concentraciones de cloro, yodo o desinfectante a base de citratos probados fueron las dosis máxima recomendada por los fabricantes (Cooperative Extension Service, 1998; Sumano y *col.*, 2015). También se evaluaron 8 veces la dosis recomendada, la cual llega a utilizarse empíricamente por los trabajadores de las granjas avícolas o en prácticas incorrectas que causan acumulaciones accidentales del desinfectante en el agua potable (Maharjan y *col.*, 2016). En algunos casos, el uso de altas concentraciones de algunos desinfectantes se utiliza con fines terapéuticos. Por ejemplo, el yodo se utiliza a concentraciones de 13.5 ppm de yodo libre para reducir la mortalidad debida al hidropericardio asociado a adenovirus (Abdul-Aziz y Hasan, 1996), dicha concentración corresponde a 1.6 veces más alta que la concentración máxima recomendada para la purificación del agua.

Es sabido que el hipoclorito de sodio es un potente oxidante y como tal, puede reaccionar fácilmente con muchos fármacos antibacterianos como la amoxicilina o la enrofloxacina, empero, no existe información de dicho efecto a nivel interacciones antibacterianos utilizados en avicultura-agua-desinfectantes (Acero y *col.*, 2010; Wang y *col.*, 2010). En el presente trabajo se encontró que para los PAS derivados del hipoclorito de sodio, a medida que aumentaron las concentraciones del cloro, la acción antibacteriana disminuyó de forma drástica y lineal ($[Y_{II} = 4.28 + 0.042b_1 - 0.038b_2]$; donde Y_{II} : halos de inhibición; b_1 : amoxicilina; b_2 : cloro; con una $r^2 = 0.75$, $F_{2, 79} = 106.37$; $P = 0.0001$) obteniéndose hasta una disminución del 88% con respecto al grupo testigo (A).

El PES derivado de la menor concentración de hipoclorito de sodio (5 $\mu\text{g/ml}$ de cloro), contrario a lo esperado, aumentó su actividad antibacteriana *in vitro* ($P < 0.05$). Aunque, a medida que aumentaron las concentraciones del cloro, la acción antibacteriana de los PES también disminuyó de forma lineal ($[Y_{II} = 12.31 + 0.022b_1 - 0.055b_2]$; donde Y_{II} : halos de inhibición; b_1 : enrofloxacina; b_2 : cloro; con una $r^2 = 0.75$, $F_{2, 59} = 84.24$; $P = 0.0001$) encontrándose una disminución del efecto antibacteriano incluso del 51% con respecto al grupo testigo (E).

Parece no haber una explicación clara de la actividad *in vitro* mejorada y de una mayor C_{max} de la enrofloxacina obtenida del tratamiento con EC1+ (5 $\mu\text{g/ml}$ de cloro). Tal

vez, un proceso de oxidación reducido a bajas concentraciones de cloro y la suma de las acciones antibacterianas de la enrofloxacin y hipoclorito de sodio, puede explicar la mayor actividad antibacteriana *in vitro* (OPS/ OMS, 1999), sin embargo, una mayor C_{max} no puede ser fácilmente explicada. Una posible elucidación de estos resultados podría estar relacionada con cambios en la solubilidad de la enrofloxacin causados por la influencia del hipoclorito de sodio. Además, es importante considerar que el primer producto de la reacción entre el hipoclorito de sodio y enrofloxacin, es la ciprofloxacina (Wang y *col.*, 2010). Así, teóricamente en algún punto, es posible encontrar una mezcla de enrofloxacin y ciprofloxacina, la cual se ha encontrado que actúa como una sinergia *in vivo* (McKellar y *col.*, 1999), así como cierta actividad antibacteriana del hipoclorito de sodio. Cierta tipo de interacciones no definidas de estas moléculas podrían explicar la mejora en la actividad antibacteriana *in vivo* e *in vitro* encontrada con ECI^+ , en comparación con la enrofloxacin sola, como sería el caso de bloque de bombas de expulsión o bombas de ingreso acoplada a iones, así como cierres y apertura de canales a nivel lumen intestinal o en la misma bacteria (Uivarosi, 2013). Aunque esta propuesta requiere un análisis más detallado.

Aparte de ECI^+ , todos los demás grupos de la serie de hipoclorito de sodio, hicieron que los PAS y PES mostraran valores C_{max} inferiores estadísticamente en comparación con los valores de referencia (grupo A y grupo E) ($P < 0,05$ en todos los casos). También, se observaron estas disminuciones en otros parámetros farmacocinéticos como AUC, MRT y Fr.

Los resultados obtenidos del análisis de FT-IR demuestran que las moléculas de amoxicilina y enrofloxacin sufren cambios estructurales por el efecto del hipoclorito de sodio. Esto concuerda con lo encontrado por Wang y *col.* (2010) en donde observó que las fluoroquinolonas sufren un proceso de oxidación en el anillo piperazínico y en los grupos amino por el efecto del cloro. Para el caso de la amoxicilina Acero y *col.* (2010) observó el efecto oxidante del cloro sobre el anillo aromático y los grupos amino de su estructura. Estos cambios en la estructura de dichos antibacterianos afectan su actividad antimicrobiana. Por ejemplo, en el caso de la amoxicilina, podrían evitar su unión a proteínas fijadoras de penicilinas, con lo cual se ve modificado su mecanismo de acción, evitando el bloqueo completo de la síntesis del péptidoglicano (Giguère y *col.*, 2013). Esto se sustenta también con el análisis de HPLC-masas en donde se demuestra que ya no existe la estructura de la amoxicilina después de su exposición al hipoclorito de sodio, en cambio existen abundancias

isotópicas que sugieren la presencia de productos clorados de degradación (Mistry, 2009). En el caso de la enrofloxacin se observó la fragmentación del anillo piperazínico (principal sitio activo de las fluoroquinolonas) y 10 productos de descomposición, con lo cual se demuestra la degradación de la estructura de la enrofloxacin al ser expuesta a la acción del hipoclorito de sodio.

Las repercusiones de todas las interacciones antes descritas pueden presentarse a diferentes niveles clínico-terapéuticos, algunos de ellos pueden conllevar repercusiones en la actividad antibacteriana, en los parámetros farmacocinéticos y en una inadecuada relación farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD), lo cual se ve como una inactividad clínica. Esto significa, en el caso de la amoxicilina, que al ser clasificada como un antibacteriano dependiente del tiempo, es necesario para tener resultados clínicos óptimos que las concentraciones plasmáticas de amoxicilina se mantengan por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI); $T \geq CMI$ del 40 al 100% del intervalo de dosificación (McKellar y col., 2004; MacGowan, 2011). Además, se considera importante mantener la C_{max} de 1-5 veces el valor de la CMI (McKellar y col., 2004). Es importante destacar que es improbable que las preparaciones comerciales de amoxicilina que se administran en el agua de bebida de las aves de producción cumplan con las relaciones PK/PD antes mencionadas, esto debido a que se prescriben generalmente cada 24 horas. Por ejemplo, basándose en el MRT y C_{max} obtenidos para la amoxicilina en este ensayo (2.47 h y 11.16 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) y tomando una CMI teórica de 2 $\mu\text{g/mL}$ para *Pasteurella multocida* (Huang y col., 2009), puede observarse que no se cumple con la relación PK/PD con la amoxicilina sola y mucho menos con los PAS derivados de hipoclorito de sodio (Cuadro 20). Los resultados obtenidos para la farmacocinética de la amoxicilina sin presencia del desinfectante (grupo A) coinciden con los de Krasucka y Kowalski (2010). Al analizar las concentraciones séricas reportadas de amoxicilina frente a las relaciones de tiempo en aves de producción, no se cumplió con la relación $T \geq CMI$, después de dosificar pollos de engorda con 20 mg/kg y considerando los mismos valores de la CMI para *Pasteurella multocida*, además en este estudio nunca se obtuvo un tiempo donde la C_{max} igualará la CMI. Del mismo modo, Abo El-Sooud y col. (2004) demostraron que una dosis de 10 mg/kg PO induce una $T \geq CMI$ de sólo 2 horas (cubriendo el 8.3% del intervalo de dosificación), considerando también a *Pasteurella multocida*. Análogamente, al analizar los datos de Kandeel (2015), una dosis de 10 mg/kg de PO ofrece un $T \geq CMI$ a las 2.5 h (10.4 %),

también la C_{max} no alcanzó el valor de 4-5 veces la CMI. En contraste, el mismo análisis realizado en un estudio anterior de Anadón y *col.* (1996) ofrece concentraciones séricas de amoxicilina que cumplen bien con las relaciones PK/PD referidas. Tal vez, las diferencias en la precisión analítica pueden explicar las discrepancias entre estos investigadores. Por lo que se recomienda que se dosifique por lo menos 2 veces al día.

Para la enrofloxacin, antibiótico clasificado como dependiente de la concentración, la C_{max} y el AUC son los parámetros farmacocinéticos más importantes. Las relaciones PK/PD para este tipo de antibióticos se fundamentan en el cumplimiento de las siguientes condiciones: $C_{\text{max}} \geq 10-12$ veces la CMI y el $\text{AUC/CMI} \geq 125$ para tener una respuesta clínica óptima. Los datos obtenidos de la farmacocinética de la enrofloxacin sola en este estudio (grupo E) demuestran que si se contempla una CMI teórica para *E. coli* de 0.13 $\mu\text{g/mL}$ (NVAL, 2013), se requería una C_{max} de 1.56 $\mu\text{g/mL}$ para cumplir con $C_{\text{max}} \geq 12$ veces la CMI, lo cual no cumplen los PES derivados del hipoclorito de sodio, excepto el grupo de ECl^+ . En cuanto a la relación $\text{AUC/CMI} \geq 125$, los únicos grupos que cumplen con dicha proporción son los PES derivados del citrato (Cuadro 21); cabe señalar que el grupo testigo (E) no cumplió con dicha relación, seguramente debido a que se trató de un medicamento genérico que no es bioequivalente al de referencia (Sumano y *col.*, 2001).

A pesar de ser también un compuesto halogenado, el desinfectante a base de yodo utilizado (yodo-polivinilpirrolidona) fue incapaz de interactuar suficientemente con la amoxicilina y la enrofloxacin y provocar cambios tan marcados en la actividad antibacteriana *in vitro* y en los parámetros farmacocinéticos como el hipoclorito de sodio. La reducción de la actividad antibacteriana, C_{max} , Fr y MRT sólo se observó con la mayor concentración de yodo (64 $\mu\text{g/mL}$) cuando se utilizó amoxicilina a 50 y 5 $\mu\text{g/mL}$ y enrofloxacin a 50 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$), lo que se tradujo en una disminución de la C_{max} y Fr para los grupos AI^{++++} , EI^{++++} y EI^{+++} ($P < 0.05$ en todos los casos). La yodo-polivinilpirrolidona es una formulación de liberación lenta de yodo y esto puede explicar en parte los patrones observados de actividad/concentración antibacteriana *in vitro* e *in vivo*. Es posible que si se permite más tiempo en la interacción antibiótico-yodo, puede obtenerse un mayor deterioro de la actividad antibacteriana de la amoxicilina y la enrofloxacin. Esto debe estudiarse más a fondo, ya que la permanencia de los antibióticos en el tanque de agua persiste mucho más de 30 min, lo cual fue la interacción de este sanitizante con los antibióticos en el agua permitida en este ensayo.

Cuadro 20. Relación PK/PD de los diferentes grupos derivados de amoxicilina-desinfectante-agua y del grupo testigo (A)

Relación PK/PD				Cumple relación PK/PD por lo menos 70% del intervalo de dosificación (dosis cada 24hrs)
Fármaco dependiente del tiempo	T _≥ CMI*		Horas	
	Horas	%		
Grupos				
A	5.2	21.8		No
Cloro				
ACI+	3.0	12.5		No
ACI++	2.1	8.8		No
ACI+++	2.1	8.6		No
ACI++++	0.0	0.0		No
Yodo				
AI+	5.3	22.2		No
AI++	5.3	22.0		No
AI+++	1.9	8.0		No
AI++++	1.9	8.0		No
Citrato				
AC+	8.3	34.6		No
AC++	9.7	40.3		No
AC+++	5.4	22.4		No
AC++++	5.3	21.9		No

*CMI₉₀ de amoxicilina establecida para *Pasteurella multocida* aislada de pollos enfermos (Huang y col. 2009).

Para los PAS y PES derivados del desinfectante a base de citratos, se observó un aumento en la actividad antibacteriana con la concentración más alta de amoxicilina (50 µg/mL), y con las dos concentraciones más altas del desinfectante utilizadas interactuando con las concentraciones más altas de enrofloxacin (50 y 5 µg/mL) (P <0.05 en todos los casos). Este tipo de sanitizantes se hace generalmente a partir de extractos de toronja y otras semillas de cítricos (Bevilacqua y col., 2013), y se ha informado que los extractos de semillas de toronja contienen furanocumarinas, que a su vez pueden reducir o inhibir la P-glicoproteína bacteriana y gastrointestinal, permitiendo, así una mejor biodisponibilidad de algunos fármacos (Ahmed y col., 2015; Bailey, 2010; Dahan y Altman, 2004). Además, se

ha demostrado que los extractos de toronja también inhiben la actividad de la enzima P-450 (CYP) al nivel epitelial GI (Bailey y *col.*, 1998; Giorgi y *col.*, 2003; Kane y Lipsky, 2000), contribuyendo así a una mejor absorción de algunos fármacos. En consecuencia, es probable pensar que los principios activos del desinfectante a base de citratos contribuyeron en los grupos AC+++ , AC++++ , EC+++ y EC++++ a elevar los valores de C_{max}, AUC y Fr en las aves utilizadas en este estudio. Por lo que, el uso de productos a base de extractos de toronja tendría que evaluarse con más detalle como promotor de la biodisponibilidad de los antibióticos.

Cuadro 21. Relación PK/PD de los diferentes grupos derivados de enrofloxacina-desinfectante-agua y del grupo testigo (E)

Relación PK/PD			
Grupos	AUC/CMI₉₀ ≥ 125	C_{max} ≥ CMI* 12 (1.56 µg/mL)	Cumple relación PK/PD
E	114.5	2.2	No
Cloro			
ECl+	116.7	2.4	No
ECl++	37.8	1.0	No
ECl+++	35.1	0.9	No
ECl++++	26.3	0.7	No
Yodo			
EI+	108.2	2.0	No
EI++	113.6	2.0	No
EI+++	106.2	1.8	No
EI++++	109.4	1.7	No
Citrato			
EC+	125.0	2.1	Si
EC++	130.8	2.2	Si
EC+++	146.0	2.4	Si
EC++++	176.5	2.5	Si

*CMI₉₀ de enrofloxacina establecida para *Escherichia coli* (0.13 µg/mL) para aves de producción (NVAL, 2013).

En la actualidad, existe una mayor conciencia sobre el problema de la resistencia a los antibacterianos en la medicina de aves de producción (Bjork y *col.*, 2015; Limayem y *col.*, 2015). El uso excesivo de fármacos antibacterianos (Grant y *col.*, 2016), la falta de bioequivalencia de las preparaciones farmacéuticas (Sumano y *col.*, 2001), y la manipulación inadecuada de los medicamentos antibacterianos (Sumano y Gutiérrez, 2008), parecen estar alimentando este problema. La dosis administrada y la calidad de las preparaciones farmacéuticas pueden ser adecuadas. No obstante, la forma en que el fármaco antibacteriano se administra a las aves de producción puede resultar inadecuado en muchos casos. Por ejemplo, la relación PK/PD para la enrofloxacin establece un valor de C_{max} necesario para el uso óptimo de este fármaco (Balaje y *col.*, 2013; Sang y *col.*, 2016). Para lograr esto, es recomendable que el agua de bebida se retenga durante una hora, para así aumentar la sed y mejorar la ingesta del agua. Además, si el tanque de agua está siendo medicado con enrofloxacin, se debe cerrar la entrada del agua para evitar una mayor dilución (Sumano y Gutiérrez, 2000). También la dureza del agua, la concentración microbiana de la fuente de agua y la presencia de otros productos químicos en el agua no suelen tomarse en cuenta (Sumano y *col.*, 2004; Fairchild y *col.*, 2006).

9.- CONCLUSIONES

En este estudio se observó que los PAS y los PES derivados del hipoclorito de sodio y los PAS y los PES derivados del yodóforo a altas concentraciones (64 µg/mL de yodo) presentaron una disminución en la actividad antibacteriana *in vitro*. Mientras que los PAS y PES derivados del citrato aumentaron la actividad antibacteriana *in vitro* de los dos fármacos.

Los PAS y los PES derivados del hipoclorito de sodio presentaron en general una disminución en los parámetros farmacocinéticos y en la biodisponibilidad de los fármacos de manera directamente proporcional. Los PAS y los PES derivados del yodóforo a altas concentraciones (64 µg/mL de yodo) presentaron una disminución en la C_{max} y la biodisponibilidad de los fármacos. Y los PAS y los PES derivados del citrato ampliaron la C_{max} y la biodisponibilidad de los antibióticos. Sin embargo, es necesario realizar estudios detallados sobre la toxicidad y la ingesta de agua por parte de las aves, a concentraciones elevadas del desinfectante a base de citratos.

Los análisis de FT-IR y HPLC-masas de los precipitados de los PAS y PES derivados del hipoclorito de sodio, demostraron que existió un cambio estructural en los antibióticos resultante del efecto oxidante del cloro.

Las interacciones entre los sanitizantes del agua de bebida y los antibióticos se deben de considerar para administrar una adecuada medicación a los pollos y cumplir con las relaciones PK/PD, esto es, en el caso de la enrofloxacin C_{max}/CMI ≥ 10-12 y AUC/CMI ≥ 125 y para la amoxicilina T ≥ CMI del 40 al 100% del intervalo de dosificación.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal
AC+	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal más citrato 0.8 mg/kg peso corporal
AC++	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal más citrato 1.6 mg/kg peso corporal
AC+++	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal más citrato 3.2 mg/kg peso corporal
AC++++	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal más citrato 6.4 mg/kg peso corporal
ACI+	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal más cloro 0.002 mg/kg peso corporal
ACI++	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal más cloro 0.004 mg/kg peso corporal
ACI+++	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal más cloro 0.008 mg/kg peso corporal
ACI++++	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal más cloro 0.016 mg/kg peso corporal
AUC	Área bajo la curva
AUMC	Área bajo la curva en el primer momento
AI+	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal más iodo 0.0032 mg/kg peso corporal
AI++	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal más iodo 0.0064 mg/kg peso corporal
AI+++	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal más iodo 0.0128 mg/kg peso corporal
AI++++	Amoxicilina 20 mg/kg peso corporal más iodo 0.0256 mg/kg peso corporal
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C++++	Citrato 6.4 mg/kg peso corporal
Cl++++	Cloro 0.016 mg/kg peso corporal
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Csmax	Concentración sérica máxima
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMI ₉₀	Concentración mínima inhibitoria 90
CYP	Enzima P-450
E	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal
EC+	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal más citrato 0.8 mg/kg peso corporal
EC++	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal más citrato 1.6 mg/kg peso corporal
EC+++	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal más citrato 3.2 mg/kg peso corporal
EC++++	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal más citrato 6.4 mg/kg peso corporal
ECl+	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal más cloro 0.002 mg/kg peso corporal
ECl++	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal más cloro 0.004 mg/kg peso corporal
ECl+++	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal más cloro 0.008 mg/kg peso corporal
ECl++++	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal más cloro 0.016 mg/kg peso corporal
EI+	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal más iodo 0.0032 mg/kg peso corporal
EI++	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal más iodo 0.0064 mg/kg peso corporal
EI+++	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal más iodo 0.0128 mg/kg peso corporal
EI++++	Enrofloxacin 10 mg/kg peso corporal más iodo 0.0256 mg/kg peso corporal
ESI	Ionización por electrospray
F	Biodisponibilidad
Fr	Biodisponibilidad relativa

FTIR	Espectroscopia infraroja por transformadas de Fourier
GI	Gastrointestinal
GLM	Modelo Lineal General
GzLM	Modelo lineal generalizado.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-Masas	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento con espectrómetro de masas
I+	Iodo 0.0256 mg/kg peso corporal
MRT	Tiempo máximo de residencia
mm	Milímetros
PAS	Productos-amoxicilina-sanitizante
PES	Productos-enrofloxacina-sanitizante
PK/PD	Farmacocinética/farmacodinamia
Tmax	Tiempo para alcanzar la C _{smax}
T _{1/2β}	Vida media de eliminación
T ≥ CMI	Tiempo en que las concentraciones plasmáticas son iguales o superan los valores de la CMI

10- REFERENCIAS

- Abdul-Aziz, T. A., and S. Y. Hasan. 1996. Preliminary observations on the efficacy of an iodophor in reducing the mortality in chickens experimentally affected by the “hydropericardium syndrome.” *Vet. Res. Commun.* 20:191–194.
- Acero, J. L., F. J. Benitez, F. J. Real, and G. Roldan. 2010. Kinetics of aqueous chlorination of some pharmaceuticals and their elimination from water matrices. *Water Res.* 44:4158–70
- Bailey, M. 1999. The Water Requirements of Poultry. Page 342 in *Developments in Poultry Nutrition 2*. Nottingham University Press, United Kingdom.
- Balaje, R. M., P. K. Sidhu, G. Kaur, and S. Rampal. 2013. Mutant prevention concentration and PK-PD relationships of enrofloxacin for *Pasteurella multocida* in buffalo calves. *Res. Vet. Sci.* 95:1114–24
- Bell, D., and W. Weaver. 2002. Consumption and quality of water. Pages 411–430 in *Commercial Chicken Meat and Egg Production*. 5th ed. Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA.
- Bennet, J. ., J. L. Brodie, E. J. Benner, and W. . Kirby. 1966. Simplified accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Am. Soc. Microbiol.* 14:170–177.
- Bjork, K. E., C. A. Koprak, B. A. Wagner, and D. A. Dargatz. 2015. Comparison of mixed effects models of antimicrobial resistance metrics of livestock and poultry *Salmonella* isolates from a national monitoring system. *Prev. Vet. Med.* 122:265–272
- Chemaxon. 1998. MarvinSketch 17.21.0.
- Clarke, E. 2011. *Clarke’s Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. Fourth ed. Pharmaceutical Press, Italy.
- CLSI. 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ; Approved Standard*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cooperative Extension Service. 1998. Sanitizing Poultry Drinking Water. Page 1 in *The Disaster Handbook*. National Edition Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida.
- Dozier, D., M. Czarick, M. Lacy, and B. Fairchild. 2002. Monitoring water consumption on commercial broiler farms: Evaluation tool to assess flock performance. *Poult. Sci.* 80.
- Esmail, S. 1996. Water: the vital nutrient. *Poult. Int.* 15:72–76.
- Fairchild, B., A. Batal, C. Ritz, and P. Vendrell. 2006. Effect of Drinking Water Iron Concentration on Broiler Performance. *J. Appl. Poult. Res.* 15:511–517.
- Faul, F., E. Erdfelder, A.-G. Lang, and A. Buchner. 2007. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav. Res. Methods* 39:175–191.
- Florey, K. 1975. *Analytical profiles of drug substances*. Academic, New York.
- Giguère, S., J. Precott, and P. Dowling. 2013. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5th ed. Wiley Blackwell, Malaysia.
- Grant, A., F. Hashem, and S. Parveen. 2016. *Salmonella and Campylobacter: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry*. *Food Microbiol.* 53:104–9
- Huang, T.-M., T. L. Lin, and C. C. Wu. 2009. Antimicrobial susceptibility and resistance of chicken *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Pasteurella multocida* isolates. *Avian Dis.* 53:89–93.
- ISA. 2010. *Nutrition management guide*. Institut de Sélection Animale, Hendrix Genetics Company, Boxmeer.

- Kahrs, R. F. 1995. Principios generales de la desinfección. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 14:143–163
- Krasucka, D., C. Kowalski, M. Osypiuk, and G. Opielak. 2015. Determination of amoxicillin in poultry plasma by high-performance liquid chromatography after formaldehyde derivation. Acta Chromatogr. 27:55–65
- Limayem, A., R. S. Donofrio, C. Zhang, E. Haller, and M. G. Johnson. 2015. Studies on the drug resistance profile of *Enterococcus faecium* distributed from poultry retailers to hospitals. J. Environ. Sci. Heal. Part B 50:827–832
- MacGowan, A. 2011. Revisiting Beta-lactams - PK/PD improves dosing of old antibiotics. Curr. Opin. Pharmacol. 11:470–476
- Maharjan, P., T. Clark, C. Kuenzel, M. K. Foy, and S. Watkins. 2016. On farm monitoring of the impact of water system sanitation on microbial levels in broiler house water supplies. J. Appl. Poult. Res. 25:266–271.
- May, J., B. Loot, and J. Simmons. 1997. Water consumption by broilers in high cyclic temperatures: bell versus nipple waterers. Poult. Sci. 76:944–947.
- McKellar, Q., I. Gibson, A. Monteiro, and M. Bregante. 1999. Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma, inflammatory exudate, and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1988–1992.
- McKellar, Q. A., S. F. Sanchez Bruni, and D. G. Jones. 2004. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. J. Vet. Pharmacol. Ther. 27:503–514.
- Mistry, B. . 2009. Handbook of Spectroscopic Data Chemistry. Oxford, Jaipur, India.
- NRC. 1994. Components of Poultry Diets.in Nutrient Requirements of Poultry. Ninth Revi. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- NVAL. 2013. A Report on the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System -2008 to 2011-. MAFF, Japan.
- OPS/ OMS, O. P. D. L. S. 1999. La desinfección del agua. Organización Panamericana de la Salud, Washington, DC.
- Pillai, K., G. Eliopoulos, and C. Moellering. 2005. Antimicrobial Combinations. Pages 365–409 in Antibiotics in Laboratory Medicine. Lorian, V., ed. edition 5. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Quilumba, C., E. Quijia, A. Gernat, G. Murillo, and J. Grimes. 2015. Evaluation of different water flow rates of nipple drinkers on broiler productivity. J. Appl. Poult. Res. 24:58–65
- Ribeiro, A., E. Krabbe, J. A. Penz, S. Renz, and H. Gomez. 2004. Effect of chick weight, geometric mean diameter and sodium level in prestarter diets (1 to 7 days) on broiler performance up to 21 days of age. Poult. Sci. 6:225–230.
- Ben Salem, S., M. Mezni, M. Errami, K. M. Amine, R. Salghi, H. A. Ismat, A. Chakir, B. Hammouti, M. Messali, and S. Fattouch. 2015. Degradation of enrofloxacin antibiotic under combined ionizing radiation and biological removal technologies. Int. J. Electrochem. Sci. 10:3613–3622.
- Sang, K., H. Hao, L. Huang, X. Wang, and Z. Yuan. 2016. Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling of Enrofloxacin Against *Escherichia coli* in Broilers.
- Souza, M. J. ., C. F. Bittencourt, and P. da S. . S. Filho. 2004. Microbiological assay for enrofloxacin injection. Int. J. Pharm. 271:287–291
- Stuart, B. H. 2004. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Wiley, Chichester, West Sussex, England.

- Sumano, L. H., and O. L. Gutiérrez. 2000. Problemática del uso de enrofloxacin en la avicultura en México. *Vet. Mex.* 31:137–145.
- Sumano, H. S., and L. Gutiérrez. 2008. *Farmacología clínica en aves*. 3rd ed. México.
- Sumano, L. H., O. L. Gutierrez, R. Aguilera, M. R. Rosiles, B. M. J. Bernard, and M. J. Gracia. 2004. Influence of Hard Water on the Bioavailability of Enrofloxacin in Broilers. *Poult. Sci.* 83:726–731.
- Sumano, L. H., O. L. Gutiérrez, and M. A. Zamora. 2001. Bioequivalence of four preparations of enrofloxacin in poultry. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 24:309–313.
- Sumano, L. H., C. L. Ocampo, and O. L. Gutiérrez. 2015. *Farmacología Veterinaria*. 4th ed. Diseño e Impresiones Aranda SA de CV, Mexico.
- Sun, L., L. Jia, X. Xie, K. Xie, J. Wang, J. Liu, L. Cui, G. Zhang, G. Dai, and J. Wang. 2016. Quantitative analysis of amoxicillin, its major metabolites and ampicillin in eggs by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 192:313–318
- Uivarosi, V. 2013. Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: An update. *Molecules* 18:11153–11197.
- USP. 1996. *Monografías Oficiales*. 16th ed. United States Pharmacopeial Convention, Maryland, USA.
- Velázquez, O. G. 1999. Medidas de bioseguridad en explotaciones porcinas. OIRSA.
- Vermeulen, B. 2002. Drug administration to poultry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:795–803
- Wang, P., Y.-L. He, and C.-H. Huang. 2010. Oxidation of fluoroquinolone antibiotics and structurally related amines by chlorine dioxide: Reaction kinetics, product and pathway evaluation. *Water Res.* 44:5989–98
- Weinberg, H. 2004. Method Development for the occurrence of residual antibiotics in drinking water.
- Ziaei, N., J. H. Guy, S. A. Edwards, P. J. Blanchard, J. Ward, and D. Feuerstein. 2007. Effect of Gender on Factors Affecting Excreta Dry Matter Content of Broiler Chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 16:226–233
- Ziaei, N., H. Kermanshahi, and M. Pilevar. 2011. Effects of dietary crude protein and calcium / phosphorus content on growth , nitrogen and mineral retention in broiler chickens. *Afr. J. Biotechnol.* 10:13342–13350.