

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

ELABORACIÓN DE UN PREPARADO INTELIGENTE DE
LIBERACIÓN CONTROLADA DE FLORFENICOL EN
CAPRINOS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA:

JENY AGUILAR ACEVEDO

TUTOR: Dra. Lilia Gutiérrez Olvera

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Ema de Jesús Maldonado Siman

Dr. Héctor Sumano López

México, D.F.

2009



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 padre y a mi madre: Por mantener unida a nuestra familia gracias a su cariño, enseñanzas y apoyo.

A mis Hermanas:

Janet, Gabriela y Yazmín: Por el cariño y convivencia, cada una en sus diferentes etapas.

A Ángel Olivares Sánchez: Por seguir a mi lado y su apoyo en todas mis decisiones.

A mis Sobrinas:

Karla, Diana y Fátima: Por la alegría que me transmiten al brindarme su cariño y travesuras.

A Renato: Por su compañía y cariño durante 14 años.

A Jimeno: Por haber llegado en el momento preciso.

II

AGRADECIMIENTOS

A mis Tutores.

Dra. Lilia Gutiérrez Olvera, Dra. Ema De Jesús Maldonado Siman, Dr. Héctor Sumano López: Por su apoyo, asesoramiento y amistad brindada.

A mi Comité Tutorial.

Dr. Luís Ocampo Cambreros, Dr. Fernando Osnaya Gallardo, Dra. Maria Josefa Bernad Bernard, Dr. René Rosiles Martínez: Por la orientación, correcciones y amistad proporcionada.

A mis amigos.

Silvia Reyes Cuayahuitl y Froylan Rodríguez: Por su amistad incondicional.

Agustin Nieto y Sayuri Hayashida: Por su amistad y apoyo para la realización del proyecto.

A Dinohora Vargas: Por su apoyo en la realización de la tesis y amistad.

A mis compañeros de trabajo

Miguel Ángel Matías Zamora Quesada, Juan Alberto Bravo Alcántara, Martín Ángeles Bautista, Benjamín Sánchez García, Guillermo Danilo Merino: Por su aceptación, apoyo y amistad.

III

RESUMEN

ELABORACIÓN DE UN PREPARADO INTELIGENTE DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FLORFENICOL EN CAPRINOS

Dado el sobre uso indiscriminado y la falta de antibacterianos novedosos en la industria farmacéutica veterinaria se ha iniciado una nueva etapa con el diseño de preparados farmacéuticos de moléculas comúnmente utilizadas en el área veterinaria a partir de los conceptos de congruencia farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD), los continuos avances tecnológicos en el área químico farmacéutico ha permitido incorporar estos conceptos en modelos de que permitan una liberación modificada, generalmente de larga acción (LA) mediante la manipulación de una gran variedad de vehículos. Con el uso adecuado los antibacterianos ajustados a su relación PK/PD es posible lograr excelentes resultados terapéuticos además de disminuir la generación de cepas resistentes.

El florfenicol es un antibacteriano sintético de amplio espectro, que tiene buena actividad contra bacterias Gram positivas y negativas, Posee actividad bacteriostática por medio de su unión a la unidad ribosomal 50S donde interfiere con la síntesis de proteínas.

En esta investigación se obtuvieron dos preparados de florfenicol con característica LA a partir de el uso de diversos polímeros, cuyo intervalo de dosificación obtenido fue de 5 días (120 hrs). Los 2 preparados de Florfenicol-LA lograron concentraciones por encima de los valores de CMI requeridos con lo que proporciona niveles terapéuticos adecuados. El preparado Florfenicol-LA (chitosan) a dosis de 20 mg/kg en cabras logró una C_{max} de $4.28 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, T_{max} de $0.96 \pm 0.003 \text{ h}$ y $t_{1/2\beta}$ de $15.84 \pm 0.005 \text{ h}$ con un MRT de $16.05 \pm 0.08 \text{ h}$ y el preparado Florfenicol-LA (ciclodextrina-carbopol-poloxámero) alcanzó una C_{max} de $3.76 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ y un T_{max} de $4.11 \pm 0.9 \text{ h}$, $t_{1/2\beta}$ de $17.14 \pm 0.2 \text{ h}$ con un MRT de $16.45 \pm 0.9 \text{ h}$. Con estos valores farmacocinéticos se obtiene una relación PK/PD congruente para un antibacteriano tiempo dependiente, obteniendo un preparado que permite un mejor manejo clínico dado que con una sola administración se logran concentraciones durante 5 días evitando estar redosificando a los animales tratados.

Palabras claves: Florfenicol, liberación controlada, bioequivalencia, farmacocinética, caprinos.

IV

SUMMARY

ELABORATION OF A SUSTAINED RELEASE- INTELLIGENT PHARMACEUTICAL PREPARATION OF FLORFENICOL FOR GOATS

Due to the irrational overuse of antibacterial drugs in veterinary medicine and the lack of new drug-entities destined for Veterinary Medicine, a new research approach has risen in a new phase. That is, known antibacterial drugs are being used to design pharmaceutical entities that can comply with each individual pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD). This has been possible now a days based on the availability of new pharmaceutical chemical-vehicles; i.e., polymers for long-acting preparations (LA). Considering that a better drug-design could diminish bacterial resistance and based on the referred availability of vehicles and bearing in mind the ideal PK/PD of florfenicol, the design and testing of florfenicol LA in goats was attempted.

Florfenicol is a potent synthetic antibacterial drug possessing wide antibacterial spectrum vs. Gram positive and Gram negative bacteria. Its action is bacteriostatic and it is achieved after binding at the 50S ribosome level, thus interfering with protein synthesis.

Two florfenicol-pharmaceutical preparations were obtained based on polymer and having LA serum profiles, thus allowing a 5 day (120 h) dosing interval. Both florfenicol-LA pharmaceutical preparations achieved higher serum concentrations as compared with the MIC literature referred levels; hence concluding that adequate therapeutic concentrations were obtained. The chitosan-based florfenicol preparation at a dose of 20 mg/kg and injected SC in goats afforded a $C_{max} = 4.28 \pm 1 \mu\text{g/mL}$; T_{max} de $0.96 \pm 0.003 \text{ h}$; and a $t_{1/2\beta}$ de $15.84 \pm 0.005 \text{ h}$ with a MRT value of $16.05 \pm 0.08 \text{ h}$. In contrast, the cyclodextrin-carbopol-ploxamer preparation of florfenicol showed a $C_{max} = 3.76 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$; $T_{max} = 4.11 \pm 0.9 \text{ h}$; $t_{1/2\beta} = 17.14 \pm 0.2 \text{ h}$ and a MRT values of $16.45 \pm 0.9 \text{ h}$. These pharmacokinetic variables allow a better PK/PD relationship, much in agreement with a time-dependant antibacterial drug. The derived clinical advantages that can be predicted include a reduced handling of the treated goats, based on a single injection every 5 days, and not having in many occasions to deal with a second injection.

Key words: Florfenicol, drug delivery, polymers for long-acting preparations, pharmacokinetics, goats.

Lista de Cuadro

- Cuadro 1. CMI de algunos patógenos en algunas especies como: rumiantes, cerdos y ave.
- Cuadro 2- MRLs en tejidos de las diferentes especies de producción (EMEA).
- Cuadro 3.- Proporciones máximas de Beta-ciclodextrina aprobadas por la FDA en medicamentos.
- Cuadro 4.- Toxicidad DL_{50} de la β -ciclodextrina en algunas especies por distintas vías de administración.
- Cuadro 5.- Proporciones de Carbopol para sus diferentes usos.
- Cuadro 6.- Usos del poloxámero 407 en diferentes especies y toxicidad reportada.
- Cuadro 7.- Toxicidad DL_{50} de poloxámero 407 en algunas especies por distintas vías de administración.¹²¹
- Cuadro 8.-Diiluciones del estándar de florfenicol.
- Cuadro 9.- Promedio \pm DE de las variables farmacocinéticas de los preparados de referencia y de larga acción de florfenicol posterior a su administración subcutánea a dosis de 20 mg/kg en ratas (6 mg/rata, en un volumen de aproximado 0.02 ml).
- Cuadro 10.- Promedio \pm DE de las variables farmacocinéticas de los preparados de referencia y de larga acción de florfenicol posterior a su administración subcutánea a dosis de 20 mg/kg en ratas
- Cuadro 11.- Promedio \pm DE de las variables farmacocinéticas de los preparados de referencia y de larga acción de florfenicol posterior a su administración subcutánea a dosis de 20 mg/kg en cabras.
- Cuadro 12.- Promedio \pm DE de las variables farmacocinéticas de los preparados de referencia y de larga acción de florfenicol posterior a su administración subcutánea a dosis de 20 mg/kg en cabras.
- Cuadro 13.- Resultados del estudio Histopatológicas de porciones de piel de ratas tratadas con florfenicol pionero y los 2 preparados L-A con mejores resultados.

VI

Lista de figuras

Fig.1. Estructura química del florfenicol.

Figura 2.- Estructura química del chitosan.

Figura 3.- Forma estructural de las ciclodextrinas.

Figura 4.- Estructura de carbopol.

Figura 5.- Estructura tridimensional de poloxámero.

Figura 6.- Flujograma del proyecto de investigación.

Figura 7.- Cámara de Franz.

Figura 8.- Regresión lineal \pm 1DE para el estándar de florfenicol.

Figura 9.- Resultado de los preparados por el método de la cámara de Franz.

Figura 10.- Resultado de los mejores preparados probados en ratas Winstar.

Figura 11.- Promedio \pm DE de las concentraciones/actividades séricas de florfenicol vía subcutánea en ratas de tres preparadas de florfenicol (Nuflor® de Schering Plough de México y florfenicol-L-A-chitosan y florfenicol-L-A-BCP a dosis de 20 mg/kg.

Figura 12.- Promedio \pm DE de las concentraciones/actividad séricas de florfenicol-chitosan vía subcutánea en cabras de dos preparadas de florfenicol (Nuflor® de Schering Plough de México y florfenicol-LA a dosis de 20 mg/kg.

Figura 13.- Promedio \pm DE de las concentraciones/actividad séricas de florfenicol vía subcutánea en cabras de los preparados de florfenicol 3, 4 y el de referencia aplicados a dosis de 20 mg/kg.

Figura 14. Niveles Terapéuticos de los preparados de florfenicol chitosan y β -ciclodextrina, Carbopol y Poloxámero.

VII
Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Generalidades de florfenicol	1
1.2. Propiedades fisicoquímicas del florfenicol.....	2
1.3. Espectro	2
1.4. Farmacodinamia	3
1.5. Farmacocinética	3
1.6. Tiempo de Retiro	4
1.7. Usos Clínicos	4
1.8. Efectos Adversos	5
1.9. Resistencia	5
1.10. Clasificación farmacodinámica de los antibióticos dependientes de la concentración o del tiempo	6
1.11. Liberación Modificada	7
1.13. Polímeros biodegradables como sistemas de liberación	10
1.15. Chitosan como sistema de liberación	11
1.16. Las ciclodextrina como sistemas de liberación	13
1.17. Carbopol	15
1.18. Poloxámero	16
1.14. Vía de Aplicación	18
2. Justificación	20
3. Hipótesis	21
4. Objetivo General	22
4.1 Objetivo Alternativo	21
5. Material y Métodos	22
5.1. Fase I de Investigación- Evaluación <i>in vitro</i>	23

5.2. Fase II de Laboratorio	24
5.2.1.1 Formación del complejo de inclusión Florfenicol L-A Chitosan	24
5.2.1.2. Formación del complejo de inclusión Florfenicol L-A- BCP	24
5.2.1.3. Formación del complejo de inclusión Florfenicol L-A Chitosan (6)	25
5.3. Estudio <i>in vivo</i>	25
5.4 Fase III de Campo	25
5.4.1.1 Diseño de la prueba	26
5.4.1.2. Evaluación de toxicidad de florfenicol L-A-Chitosan y florfenicol L-A-BCP	26
5.4.1.3. Análisis Cuantitativo	26
5.4.1.4. Análisis para la Evaluación microbiológica	26
6 Resultados. Fase I de Investigación- Evaluación <i>in vitro</i>	30
6.1 Resultados. Fase II de Laboratorio Estudio <i>in vivo</i>	30
6.2 Resultados Fase III de Campo.....	32
6.5 Resultados Histopatológico.....	35
7. Discusión	36
8. Conclusiones	39
9. Referencias	39

ELABORACIÓN DE UN PREPARADO INTELIGENTE DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FLORFENICOL EN CAPRINOS.

1- Introducción

Con excepción de la tulatromicina para bovinos y cerdos, hace ya más de dos décadas que la comunidad científica internacional no ha logrado generar un antimicrobiano que satisfaga los estándares de organismos regulatorios de países líderes de opinión y que sea altamente novedoso. Esto ha dado lugar a que no se haya permitido introducir un nuevo antibacteriano para uso en medicina veterinaria en dicho tiempo.¹⁻⁴ En parte porque cada vez es más difícil generar nuevas opciones antibacterianas y por las exigencias de organismos regulatorios. Así, aunque se siguen generando ideas y nuevos enfoques para tratar las enfermedades bacterianas; el costo y el riesgo financiero implícitos en satisfacer todas las demandas de organismos como la FDA (Food and Drug Administration) o la Comunidad Europea, hacen poco probable que en el corto plazo se tengan nuevas opciones antibacterianas disponibles para el clínico en campo^{1,5,6}.

La evaluación de la seguridad y eficacia de los medicamentos es un proceso lento y sumamente costoso. En términos generales el tiempo que tarda un producto desde la búsqueda del principio activo, hasta que sale al mercado fluctúa en promedio entre 10 y 12 años y con un costo aproximado de 100 millones de dólares o más². La resultante natural de estas variables es la realización de estudios tendientes a hacer un uso óptimo de los recursos antibacterianos hasta ahora disponibles.⁷⁻⁹ Así, los retos actuales en farmacología no son solamente la búsqueda de nuevas moléculas, sino la reformulación y mejora de las ya existentes. Por ejemplo con nuevas formulaciones se puede favorecer la absorción, y se puede, al menos en teoría, ayudar al paso del fármaco desde la sangre al sitio de acción, logrando así una mayor distribución a los tejidos blanco, y abatir los efectos adversos secundarios. Una ventaja de manipular principios activos con vehículos es lograr productos

¹ Food and Drug Administration. FDA. <http://www.fda.gov/eder/handbook> 13/01/03

² Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica <http://www.canifarma.org.mx> 05/04/03

de vida media larga mediante formulaciones de liberación sostenida o prolongada, las cuales facilitan el manejo y mantienen los productos en una relación PK/PD ideal.^{7,9-11} Los estudios de farmacocinética en el área de antimicrobianos para veterinaria son escasos, estos son indispensables para establecer las dosis correctas, por ejemplo, el 22% de las publicaciones de estudios farmacocinético en medicina veterinaria a nivel mundial corresponden a los rumiantes y de estos solo el 5% corresponden a las cabras.¹²

1.1. Generalidades de florfenicol

El florfenicol es un antibiótico de amplio espectro, bacteriostático y su espectro de acción abarca microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Se desarrollo a partir del tianfenicol, por la substitución con flúor de un radical hidroxilo de la cadena alifática, a diferencia del cloranfenicol, el florfenicol es un antibiótico de uso exclusivo en medicina veterinaria sin la toxicidad del primero.^{13,14}

Se autorizó en 1995 el uso del florfenicol como fármaco inyectables para el tratamiento de enfermedades respiratorias en bovinos y en cerdos esto ocurrió en el año 2000.¹⁵ Su uso en el área veterinaria ha ido en aumento. En la actualidad se cuenta con estudios farmacocinéticos en terneros (Varma *et al.*, 1986), ovinos (S. Jianzhong *et al.*, 2004), caprinos (M. Atef *et al.*, y B.H Ali *et al.*, 2003), perros (Park *et al.*, 2008), conejos (Park *et al.*, 2007 y Abd El-Aty, 2004), patos (Switala *et al.*, 2007 y El Banna 1998), pollo de engorda (Shen *et al.*, 2002 y 2003), cerdos (Palacios *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2003, Voorspoels *et al.*, 1999) y ganado bovino (Schwarz *et al.*, 2004, Varma *et al.*, 1994 y 1995, Craene *et al.*, 1997, Calvin *et al.*, 1997).

1.2. Propiedades fisicoquímicas del florfenicol

Su nombre químico es: (d-tre-2,2-dicloro-N-c- α -(fluormetilo)- β -hidroxi-p-(fenetilo) acetamida), su fórmula condensada es C₁₂H₁₄CL₂FNO₄S. Su peso molecular es de 358.2 Daltones y su punto de fusión se encuentra entre 153-154 °C tiene un rango de pH de 3 a 9. Por lo tanto es soluble en solventes orgánicos polares tales como los polietilenglicoles y la

N-metilpirrolidona, es casi insoluble en agua, medios acuosos ácidos y alcalinos. Presenta una solubilidad relativamente elevada en lípidos.^{14, 16}

Su coeficiente de partición octanol agua es de 2,36, lo que explica la amplia distribución del fármaco en los tejidos. Tiene un espectro más amplio que el cloranfenicol y es aproximadamente 100 veces más potente.^{13, 17, 18}

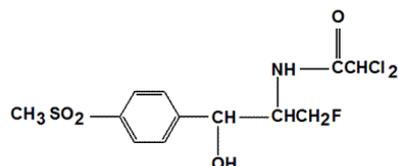


Fig.1. Estructura química del florfenicol.

1.3. Espectro

Actúa contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos, incluso muestra un espectro superior a sus análogos el tianfenicol y el cloranfenicol. Dentro de su espectro destaca la eficacia sobre *Proteus mirabilis*, *Proteus indol*⁺, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Citrobacter sp.*, *Bacteroides sp.*, *Actinobacter sp.*, *Histophilus sp.* y *enterococos*.^{19, 20}

Se ha demostrado su actividad *in vitro* contra *Histophilus somni*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *suis* y *Shigella dysenteriae*, así como contra algunas bacterias resistentes al cloranfenicol.^{21, 22}

También se ha demostrado su actividad tanto *in vitro* como *in vivo* contra las principales bacterias involucradas en el complejo respiratorio bovino que incluyen *Manheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*, así como las involucradas en los problemas interdigitales de los rumiantes *Fusobacterium necrophorum* y *Bacteroides melaninogenicus*.^{14, 23} No se ha establecido breakpoint para bacterias de importancia en animales productivos, pero en el cuadro 1 se presentan los valores de concentración mínima inhibitoria que se detalla en la literatura.

Cuadro 1. CMI de algunos patógenos en algunas especies como: rumiantes, cerdos y ave

Patógeno	CMI	Referencia
<i>Pasteurella multocida.</i>	0.25-0.5 µg/ml	Sung y Sang 2004
<i>Manhemia haemolytica.</i>	0.5 µg/ml	
<i>Staphylococcus aureus.</i>	4.0 µg/ml	Henk y Kees 2005
<i>Streptococcus sp.</i>	2.0 µg/ml	Voorspoels y Haese 1999
* <i>Escherichia coli.</i>	4.0 µg/ml	
<i>Histophilus somni</i>	0.25 µg/ml	Salmon y Watts 2000
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	0.2 µg/ml	Kehrenberg 2004
<i>Fusobacterium necrosporum</i>	0.25 µg/ml	Prescott, 2000
<i>Bacteroides melaninogenicus.</i>	0.25 µg/ml	
Diferentes cepas de <i>Mycoplasma</i>	0.25-8 µg/ml	Rosenbusch 2005

* *Escherichia coli* se considera resistente a florfenicol.

1.4. Farmacodinamia

El Florfenicol es un antibacteriano bacteriostático que inhibe la síntesis de proteína uniéndose a las subunidades ribosomales susceptibles 50S. Se destaca por inhibir la peptidil transferasa, de esta manera previene la transferencia de amino ácidos y la formación de cadenas peptídicas y subsecuentemente la formación de proteínas bacterianas inhibiendo la formación de la nueva pared celular en su primera etapa. Se considera que el receptor bacteriano se encuentra en el mismo sitio de acción en el que actúa el cloranfenicol y el tianfenicol.^{24, 25,26}

1.5. Farmacocinética

El florfenicol es ampliamente distribuido después de su administración, logrando una alta concentración terapéuticas en tejidos e incluso en fluido cerebrospinal. Se distribuye ampliamente en tejidos y órganos como: pulmón, corazón, páncreas, músculo esquelético, bazo y líquido sinovial. Las concentraciones son relativamente mayores en bilis, riñón, intestino delgado y orina. Se le puede considerar un fármaco con cinética de orden cero, pero de acumulación moderada.^{12, 27}

En bovinos, la vida media es aproximadamente de 4.1 horas en administrado por vía intramuscular e intravenosa a dosis de 20 mg/kg, pero los preparados para larga acción en n-metilpirrolidona su T1/2β fluctúa alrededor de 11 horas. Administrado vía oral a cerdos alcanza su pico máximo de concentración en suero a las 3 horas y su vida media de

eliminación es de 64 a 80 horas. En vacas no lactantes vía intramuscular reportan una biodisponibilidad de 79%.¹⁷

En cabras de acuerdo con lo reportado por Atef (2001), tiene biodisponibilidad de $65 \pm 3.37\%$, una vida media de eliminación de 132.84 ± 3.68 min., T_{max} a las 1.20 ± 0.045 horas, y un C_{max} de 0.859 ± 0.025 µg/ml, a dosis de 20 mg/kg vía intramuscular. Estos datos son similares similar a lo que reporta Ali (2003) una biodisponibilidad de 60.88 ± 5.94 , vida media de eliminación de 127.4 ± 11.0 min., T_{max} de 1.13 ± 0.13 horas y C_{max} de 1.20 ± 0.10 µg/ml., a la misma dosis y vía.^{19, 23}

1.6. Tiempo de retiro y residuos

Se recomienda un tiempo de retiro de 28 días si la aplicación fue IM y 36 días si la aplicación se realizó subcutánea considerando al preparado de larga acción.¹³ En cerdos se recomienda un tiempo de retiro de 16 días posterior a su administración IM.^{28, 29}

En el cuadro 2 se muestran los MRL para tejidos de las diferentes especies de producción de acuerdo a la EMEA (“The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products”)

Cuadro 2- MRLs en tejidos de las diferentes especies de producción (EMEA) ²⁹

Sustancia activa	Residuo marcador	Especie	MRLs	Tejido	Provisiones
Florfenicol	Amina-florfenicol	Bovinos, Ovinos, caprinos	200 µg/ml 3000 µg/ml 300 µg/ml	Músculo Hígado Riñón	No utilizar en animales productores de leche para consumo humano
		Porcinos	300 µg/ml 500 µg/ml 2000 µg/ml 500 µg/ml	Músculo Piel y grasa Hígado Riñón	
		Aves	100 µg/ml 200 µg/ml 2500 µg/ml 750 µg/ml	Músculo Piel y grasa Hígado Riñón	No utilizar en animales productores de huevo para consumo humano
		Peces	1000 µg/ml	Músculo y piel en proporciones naturales	
		Todas las especies productoras bovino, ovino, porcino, caprino, aves y peces	100 µg/ml 200 µg/ml 2000 µg/ml 300 µg/ml	Músculo Grasa Hígado Riñón	

1.7. Usos clínicos y dosis.

Bovinos

Se utiliza para el tratamiento de neumonías bacterianas, en la profilaxis y tratamiento de infecciones respiratorias asociadas al complejo respiratorio bovino. Se administran 2 dosis de 20 mg/kg por vía IM, con un intervalo de 48 h entre cada aplicación aplicada en la tabla del cuello para evitar reacciones en los tejidos que pudieran dañar la apariencia de la canal; no se deben administrar más de 10 ml de solución en un mismo sitio. ^{13, 30} Sin embargo, se ha desarrollado otro preparado cuya dosis es de 40 mg/kg (Resflor[®] Schering International) y se aplican 2ml/15Kg y tiene una duración de 96-120 horas y tiene un tiempo de retiro de 46 días de acuerdo a los detalles en la literatura comercial.³ No hay datos adicionales en la literatura formal.

³http://www.intervet.com.mx/productos/rojo/resflor_/020_informaci_n_del_producto.asp

Cerdos

Se ha usado mezclado con el alimento a razón de 200 ppm, con resultados favorables en el tratamiento de diversas infecciones del aparato respiratorio; su eficacia es mejor por vía parenteral.^{31, 32} Y es importante resaltar que en algunos países (EUA por ejemplo) no se usa por esta vía aunque en otros la dosis es mayor en el agua de bebida (UK, dosis de 5-7.5 mg/kg)⁴

Aves

En México y algunos países latinoamericanos se le ha usado como premezcla y en el agua de bebida para aves. La dosis recomendada comercialmente es muy baja (20-40 ppm en el alimento). Y para obtener concentraciones terapéuticas confiables, se recomiendan dosis de 80 ppm ó más. En el agua de bebida la dosis es de 20 mg/kg.^{33, 34}

Ovinos y Caprinos

Se le usa en enfermedades del complejo respiratorio en animales jóvenes a dosis de 20 mg/Kg IM cada 48 hrs.^{14, 35}

Perros y gatos

En perros la dosis utilizada es de 20 mg/kg vía oral o IM, en gatos la dosis de 22 mg/kg PVO ó IM; aunque el uso de este todavía no ha sido aprobado para uso en estas especies.^{13, 16}

1.8. Efectos adversos

El preparado LA produce irritación moderada en el sitio de inyección.

Los equinos presentan diarrea a dosis de 22 mg/kg por VO ó parenteral. En becerros a dosis elevada aplicado IM provoca anorexia marcada, disminución del peso, cetosis ligera (secundaria a la anorexia), disminución en la actividad ruminal, heces líquidas, menor consumo de agua y menor producción de enzimas séricas (incluyendo a la alanina aminotransferasa, aminoacil transferasa, aspartato amino transferasa, lactasa y deshidrogenasa). En bovinos con la sobredosis hay diarrea, generalmente transitoria y disminución en el consumo de agua y de alimento.^{12, 13} Esto hace evidentemente que un

⁴ www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/025197en.pdf

preparado de dosis elevada debe estar diseñado para lograr concentraciones mayores que la CMI, pero no muy elevadas.

1.9. Resistencia

En la actualidad solo se ha establecido el punto de equilibrio o breakpoint para florfenicol vs *P. multocida*, *M. haemolytica* y *Histophilus somni*, bacterias aisladas de bovinos con una susceptibilidad de ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$. En estudios realizados por Priebe *et al* (2003) *P. multocida* y *M. haemolytica* en bovinos y *A. pleuropneumoniae* y *S. Suis* en cerdos no se generó resistencia aún después de 5 años de ser utilizado consecutivamente. Se ha identificado que el principal mecanismo de resistencia esta dado por plásmidos en *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*.^{15, 36, 37}

El género *Enterobacteriae* puede inactivar al cloranfenicol y al tianfenicol por acetilación del grupo OH⁻ en los átomos de carbono 1 y 3 de la cadena del propanediol (alifática); pero esto no ocurre en el caso del florfenicol aparentemente porque la unión flúor, le permite ser más potente contra microorganismos resistentes a los otros miembros de la familia de los fenicoles.³⁸

1.10. Clasificación farmacodinámica de los antibióticos (dependientes de la concentración o del tiempo)

Los métodos de determinación de la susceptibilidad antimicrobiana son necesarios debido a que guían al médico veterinario en la elección del tratamiento adecuado. Las pruebas se basan en descripciones hechas por el NCCLS (“*National Comitee for Clinical Laboratory Standards*”), que originalmente fueron desarrolladas para aplicación en medicina humana, y en la actualidad son utilizadas por muchos laboratorios de diagnóstico veterinario. La prueba de dilución en tubos sigue siendo la más usada y probada para la obtención de información cuantitativa para finalmente interpretarse como concentración mínima inhibitoria (CMI) la más baja concentración de fármaco capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Sin embargo, estos métodos solamente son guías, dadas las diferencias que existen entre las pruebas “*in vitro*” y lo que ocurre con los microbios en el organismo.

La concentración mínima inhibitoria es una herramienta valiosa cuando se le interpreta en función de las concentraciones que el fármaco puede alcanzar en el organismo. Para poder hacer una correcta interpretación, se deberá tener un conocimiento completo de la distribución poblacional de la bacteria problema (susceptibilidad de aislamientos de campo), la farmacocinética del agente (tanto plasmática como tisular) y los resultados de los estudios de eficacia. Así surge la disciplina conocida como modelaje farmacocinético-farmacodinámico (PK/PD) que representa la interacción final entre estos datos y hace posible la administración eficaz y racional de los antibióticos.

Al estudiar la susceptibilidad a un determinado antibiótico a través de su relación PK/PD podremos, estimar con mayor certeza su eficacia “*in vivo*”.³⁹ Los efectos antibacterianos pueden ser medidos “*in vitro*” y aún “*in vivo*” a través de la exposición de cultivos de microorganismos a diferentes concentraciones de antibióticos, tomando muestras a diferentes tiempos durante un período de 24 horas y determinando la cantidad de bacterias en cada muestra con que se realizan una serie de curvas de muerte para una determinada bacteria expuesta a un antibiótico al cual es susceptible a concentraciones iguales, menores y mayores que la CMI de ese antibiótico para esa cepa.⁴⁰ Con estos datos se logra la clasificación del antibiótico por su perfil antibacteriano y mediante las variables de: a) $T > CMI$, que se refiere al tiempo en el cual las concentraciones de los antibióticos permanece sobre la CMI y es útil para antibióticos clasificados como tiempo dependientes. b) C_{max}/CMI , describe la proporción entre el pico de concentración y la CMI y es válido para antibióticos concentración-dependientes y por último, la relación entre AUC/CMI que es útil para, ambos tipos de antibióticos: concentración dependiente y tiempo dependientes.⁴¹

42

El grupo clasificado como concentración-dependiente se caracteriza por conseguir la muerte bacteriana en poco tiempo y de manera dependiente de la concentración del fármaco. Por ello son necesarias altas concentraciones del fármaco en plasma y tejido, con lo que se incrementa la actividad bactericida, (fluoroquinolonas, aminoglicósidos), es mucho más importante la relación C_{max}/CMI que el tiempo que las concentraciones del fármaco se encuentren por encima de la CMI. Con una relación C_{max}/CMI mayor de 8 o 10, se puede estar seguro de que el fármaco está ejerciendo el máximo de su acción

antimicrobiana y el máximo de su efecto post-antibiótico para aminoglicósidos y fluoroquinolonas, respectivamente. No es muy importante el intervalo entre dosis, dado que estos agentes funcionan, en general con una dosis diaria. Son fármacos con gran residualidad terapéutica (efecto post-antibiótico). El grupo clasificado como Tiempo-dependiente, se caracteriza por su actividad antibacteriana dependiente del tiempo mientras la concentración del fármaco se mantenga por encima de la CMI, aunque no es necesario que la concentración supere la CMI en más de 2 a 4 veces y es suficiente que la concentración supere la CMI en aproximadamente un 50-75% por ciento del período entre dosis. Son fármacos con poca residualidad terapéutica. Las concentraciones cerca de estos valores no mata el organismo. La ausencia de grandes concentraciones para matar a los microorganismos es una característica común de los antibióticos beta-lactámicos, doxiciclina, vancomicina, clindamicina y los macrólidos. El caso de las tetraciclinas, azitromicina y glucopéptidos es interesante porque si bien son tiempo dependientes, tienen persistencias terapéuticas prolongadas.⁴²

El florfenicol es un antibacteriano tiempo dependiente y se ha propuesto que debe estar 3 o 4 veces arriba de la CMI por lo menos cuatro horas, se considera un fármaco con cinética de orden cero, pero de acumulación moderada, tiene un volumen de distribución elevado pero una disponibilidad relativamente baja.¹²

El florfenicol tiene actividad *in vitro* contra un total de 243 bacterias aisladas de infecciones del árbol respiratorio de bovinos y cerdos. Se definió su actividad por el método de difusión en agar y microdiluciones. En el cuadro 1 se muestran algunas CMI de florfenicol para algunas bacterias.³⁰

1.11. Liberación modificada

El concepto de liberación modificada de fármacos pretende proporcionar concentraciones constantes en el organismo del fármaco problema y llevarlo directamente al sitio de acción para que su actividad farmacológica a su PK/PD y optimizar así su eficacia.⁴⁵

El concepto de liberación modificada es amplio, pues hace referencia a la aplicación de un proceso tecnológico a una sustancia definida para modificar su interacción con el medio en el cual será utilizada, con el fin de controlar el lugar, el momento, la duración o la magnitud

de su acción. Se aplican distintas técnicas para obtener una liberación modificada de principios activos en campos tan distintos como la agricultura o la farmacia. Existen técnicas que permite modificar y controlar la liberación de principios activos por cualquiera de las vías de administración, siendo las vías oral, transdérmica y parenteral subcutánea las que han tenido mayor éxito terapéutico y comercial. Para lograrlo se lleva a la sustancia activa al sitio de acción modificando su bio-distribución atrapando las partículas de sustancia activa en transportadores como nanoesferas, polímeros, nanocapsulas o liposomas.^{45, 46, 47}

La necesidad de encapsulación surge de la inestabilidad de muchos fármacos, y en algunos casos esto puede mejorar la biodisponibilidad de los componentes terapéuticos, otra razón de importancia para utilizar los transportadores como sistemas de liberación de fármacos es la pobre solubilidad de algunos. La encapsulación del activo se diseña con acarreadores o transportadores para protegerlo de condiciones hostiles como el pH, temperatura, etc.

En muchos casos la absorción puede ser mejorada y los efectos indeseables en el sitio de acción pueden ser minimizados.^{45, 48}

El concepto de liberación de fármacos comprende de 2 mecanismos que pueden ser diseñados con sistemas de transportadores; liberación sostenida o liberación controlada de fármacos al sistema y liberación directa en el sitio. En la primera se toma un polímero de origen natural o sintético que se combina con el principio activo o agente terapéutico y lo libera a una tasa relacionada con el material utilizado en su diseño y la segunda en el que se libera en el sitio u objetivo directamente al adicionar el fármaco en el órgano o sitio específico.^{45, 47}

El objetivo de los sistemas de liberación sostenida es mejorar la eficacia del tratamiento y minimizar la sub o sobredosificación, mantener constantes los niveles terapéuticos en circulación sanguínea o en el sitio de acción de la sustancia, con un mínimo de aplicaciones. Usualmente los vehículos que permiten lograr los sistemas de liberación de fármacos deben ser preferentemente disueltos, degradados y/o fácilmente eliminados del organismo y aunque la tecnología de los sistemas de liberación busca principalmente lograr

óptimas concentraciones, usualmente por tiempos prolongados, mejorando la actividad de fármacos lábiles, proporcionando protección contra ambientes hostiles, disminuyendo efectos adversos debido a la reducción de altas concentraciones iniciales en sangre (concentraciones tóxicas),⁴⁹ en veterinaria se pueden usar vehículos no degradables siempre y cuando se decomise en rastro el sitio de aplicación.

Existen 3 procesos clásicos que explican la liberación de sustancias de los sistemas de acarreadores: difusión, degradación e hinchamiento seguido por difusión o una combinación de ambos.

Las primeras investigaciones en los sistemas de liberación modificada datan de la década de los 70's, con base el uso de polímeros formados de ácido láctico. Además de los polímeros más evidentemente se han incorporado una gran variedad de materiales biodegradables y sintéticos así como la manipulación del principio activo como, liposomas, nanopartículas, bombas osmóticas, principios activos cristalizados y otros. Por ello y dado el reducido diseño de principios activos para veterinaria resulta consecuente observada un auge en el diseño farmacológico de moléculas ya existentes en el mercado. En tales casos se puede augurar que se están generando nuevas formulaciones que permiten una liberación controlada o sostenida mediante no solo la manipulación de los vehículos, si no verdaderamente entidades novedosas que optimizan la relación PK/PD de cada principio activo .^{45, 50, 51}

La tecnología de liberación de fármacos juega un papel importante en el desarrollo de la industria farmacéutica de la salud animal. De la misma manera, la industria farmacéutica de la salud animal es pionera en la aplicación de tecnología de fármacos de liberación sostenida así como de biotecnología. La necesidad de tecnología farmacéutica para lograr larga acción para la salud animal está guiada por cinco factores importantes:^{52, 53}

1. Mejorar la farmacocinética
2. Aumentar la vida útil de los principios activos
3. Extender la vida de la patente de las moléculas al proveer diferenciación de producto
4. Garantizar la seguridad del consumidor (bioequivalencia y tiempo de retiro)

5. Seguridad del animal y del médico veterinario

Teniendo como propósito lograr terapias efectivas debida a:

- Evitar subdosificaciones
- Concentraciones adecuadas de fármacos tiempo-dependientes
- Mantenimiento de concentraciones terapéuticas en tratamientos prolongados
- Disminución del número de aplicaciones esto conlleva a la reducción de estrés
- Disminución de costo por manejo

Pero se debe tener en consideración que estas presentaciones tienen las siguientes desventajas:

- El sitio específico de absorción debe ser definido y constante
- Potencial presencia de residuos tisulares por retención en el sitio de aplicación
- Reacciones en tejidos
- Inyectabilidad del producto
- Estabilidad del producto
- Procesos de manufactura

Más del 60% de los productos nuevos en el mercado farmacéutico veterinario son productos de liberación sostenida o modificada. Lo que se ha logrado con la incorporación de fármacos en material polimérico para el control de la liberación es una tasa predefinida y reproducible de liberación de uno o varios principios activos por un prolongado periodo.^{55, 56}

La mayoría de los polímeros usados en veterinaria son no degradables tales como: silicón, poliuretano, copolímeros de vinilacetato y etileno los cuales son económicos, biocompatibles, biológicamente inertes y han recibido aprobación por las autoridades regulatorias. No obstante, se debe decomisar el sitios de aplicación (v.g. oreja) y/o retirar el material. En contraste los polímeros biodegradables no requieren no requieren ser

removidos de los animales al final del tratamiento dado que son degradados (metabolizados) a compuestos para pueden ser excretados del organismo. Proporciona grandes beneficios donde el punto de vista comercial y de salud pública dado que muchos de estos preparados están indicados en el tratamiento de animales de producción.

La industria de los animales de producción pondera el costo de los tratamientos con el beneficio resultante de éste. Así que como el precio del medicamento debe ser lo más bajo posible y debe de ser de fácil manejo por el productor. Por otro lado cada visita del veterinario es relacionada por el productor con gastos por lo que así un sistema de liberación biodegradable, que solo requiere una aplicación asociado con un incremento en el efecto terapéutico será un beneficio económico aunque el costo del sistema de liberación pueda ser más alto que el tratamiento convencional a simple vista. Los preparados para animales de producción en el mercado de la salud animal, representan y poseen el 70% del total de las ventas.⁵⁹

1.12. Polímeros biodegradables como sistemas de liberación modificada

Los polímeros biodegradables más activos y comúnmente utilizados en veterinaria son los poliésteres como el poli (ácido láctico) (PLA), el poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y el poli (ε-caprolactona) (PCL). Estos materiales están comercialmente disponibles en diferentes composiciones y pesos moleculares los cuales permiten una degradación variable del polímero. El término degradación se refiere al proceso por el cual la cadena polimérica pierde parte de sus componentes y existe una erosión subsecuente. Para los polímeros biodegradables se han propuestos dos mecanismos de erosión: el homogéneo y el heterogéneo.^{47, 52}

Los polímeros biodegradables liberan al fármaco por diferentes 3 mecanismos. En el caso de los monómeros conectados a otros por uniones tipo éster, la degradación comienza después de la penetración de agua hacia el espacio donde se encuentran. El rompimiento de las uniones éster ocurre por hidrólisis. Dependiendo de la velocidad de degradación, será el tiempo de liberación del fármaco, el cual puede ir desde semanas hasta meses. Otro grupo de polímeros más nuevos son aquellos elaborados a base de ácido tartárico, que además de

poseer uniones éster, tienen uniones cetonas y se les llama politartratos. Algunos de los polímeros pioneros en ésta área son los poliorto-ésteres (POE) que desde 1970 se han incorporado y desarrollado. Se les divide por generaciones (I, II, III y IV). Este tipo de polímeros permiten la incorporación de diferentes agentes terapéuticos mediante la elaboración de una mezcla simple evitando el uso de solventes o temperaturas elevadas, lo cual representa una ventaja frente a otro tipo de polímeros.^{45. 47,}

En la actualidad las matrices poliméricas siguen siendo de gran importancia, se les denomina comúnmente como microsferas y se ha clasificado como reservorios y matrices, según su tamaño y estructura. Un “reservorio” comprende una forma polimérica envolvente que encapsula a los fármacos y una “matriz” corresponde a un sistema en el cual el fármaco se encuentra físicamente atrapado en una red polimérica. Se reconoce como importante que los implantes sean biodegradables ya que las reacciones adversas que normalmente se producen, sean mínimas, que se coloquen fácilmente y no requieran remoción manual. Por ello se está generando mucha investigación acerca de nuevos polímeros y micropartículas. Por lo que es predecible que en poco se tendrán nuevas matrices que se apliquen fácilmente y que se degraden con el tiempo, manteniendo un efecto terapéutico aceptable a un costo razonable.⁶⁰

En el caso de poliésteres biodegradables los cuales están conformados por monómeros unidos entre sí por enlaces éster, la degradación inicia después de la penetración de agua al polímero. La ruptura de los enlaces éster se da aleatoriamente a través de hidrólisis lo que inicia la erosión del polímero. El grado de hidrólisis es influenciado por el peso molecular, por la cantidad de copolímero (vehículo que contiene al polímero), la polidispersidad y la cristalinidad. Todos estos factores pueden ser utilizados para controlar la liberación del fármaco. Dependiendo de su encapsulación el tiempo de degradación tarda de varias semanas hasta varios años y permite la liberación del fármaco durante todo este tiempo. Sin embargo el diseño de preparados conteniendo fármacos para lograr liberación sostenida y basados en poliésteres es difícil ya que los polímeros experimentan homogeneidad al agregar el copolímero y aún el principio activo y esto cambia la matriz del polímero y modifica la liberación del fármaco. Como consecuencia no es trivial para predecir su tasa

de liberación. Los poliésteres arriba mencionados tienen una característica en común: la sensibilidad a la hidrólisis está localizada en la columna del poliéster, esta característica estimula el desarrollo de una clase de polímeros biodegradables basados en ácido tartárico el cual tiene enlaces en la cadena del polímero. Estos compuestos llamados también politartratos parecen ser una esperanza para abatir la modificación de la estructura del polímero. Experimentos anteriores mostraron la conveniencia de utilizar politartratos para controlar la liberación de los fármacos. Sin embargo, hasta ahora estos politartratos no han recibido suficiente atención comercial.^{55, 60, 61}

1.13. Chitosan como sistema de liberación

Sinónimos: 2-Amino-2deoxy-(1,4)- β -D-glucopiranan; quitina deacetilada; deacetilquitina; β -1,4-poly-D-lucosamina; poly-D-glucosamina; poly-(1,4- β -D-glucopyranosamina).⁶⁴

Categoría funcional: Agente de revestimiento, disintegrante, agente formador de películas, mucoadhesivo, cubierta de tabletas, agente que incrementa la viscosidad.⁶⁴

Se conoce desde 1859, pero en los últimos 20 años se ha investigado sobre este polímero como un sistema de liberación.⁶⁵ Recientemente se han considerado a las microesferas o nanoesferas de chitosan como poseedoras de un gran potencial en la aplicación farmacéutica para la liberación controlada de fármacos, y también para incrementar la absorción y prolongar la liberación de fármacos y macromoléculas. Se ha demostrado que mejora la disolución de fármacos poco solubles en agua; tiene propiedades bioadhesivas, se le considera biocompatible, biodegradable y carece de efectos alérgicos (DL 50 16 g/kg administrado por vía oral en ratones) y además posee alta densidad de carga de principios activos.⁶⁶⁻⁷⁰

El chitosan es un polímero parcialmente deacetilado obtenido a partir de deacetilación alcalina de la quitina, la cual a su vez es un polisacárido con base de glucosa, distribuido ampliamente en la naturaleza; de hecho es el segundo polisacárido más ampliamente distribuido en la naturaleza, después de la celulosa.⁷¹

Además de ser parte del citoesqueleto de crustáceos e insectos, es parte estructural de algunas membranas bacterianas y de hongos. Se ha utilizado a últimas fechas en industrias como: la agricultura, en tratamientos de aguas residuales, fabricación de textiles, cosméticos, promotor del crecimiento, complemento alimenticio y adicionado en algunos procesos de elaboración de alimentos. Es ampliamente utilizado por poseer un bajo potencial alergénico y por ser altamente biocompatible con muchos procesos biológicos. Es completamente biodegradable, absorbible y forma películas. Por ello se ha utilizado como biomaterial farmacéutico y en algunas áreas médicas, donde se le ha utilizado para formulaciones de liberación controlada ya sean sistémicas o locales de fármacos y vacunas, así como implantes.⁷²⁻⁷⁴

El chitosan es un polímero lineal de biopoliaminosacárido β (1,4) unida a N-acetil-glucosamina, consta de copolímeros de glucosamina y N-acetil-glucosamina, tiene un amino básico y dos grupos hidroxilo libre por cada C_6 formados. Debido a la disponibilidad de los grupos amino libres de chitosan puede protonarse con facilidad positivamente y debido a las fuerzas electrostáticas pueden interaccionar con superficies mucosas cargadas negativamente en su superficie o bien quelar metales iónicos (cobalto).⁷⁵⁻⁷⁶

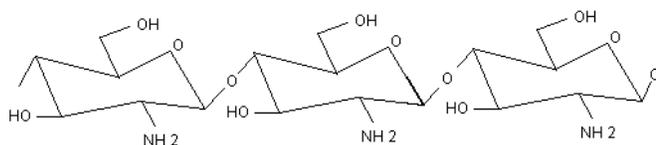


Figura 2.- Estructura química del chitosan

Evidentemente es una base débil y es insoluble en agua y disolventes orgánicos, pero soluble en soluciones ácidas y ligeramente soluble en soluciones alcalinas.⁷⁷ Su formación de gel puede ser obtenido por interacción de chitosan con iones opuestos de bajo peso molecular como polifosfatos, sulfatos y con la unión de glutaraldeido. La propiedad de gelación del chitosan permite un amplio rango de aplicaciones como la de recubrir productos farmacéuticos y alimentos.⁷⁸⁻⁸⁰ Entre otras aplicaciones farmacéuticas en que se

ha utilizado destacan su uso como vehículo para la comprensión directa de las formas farmacéuticas sólidas, como desintegrante. El 93% de los fármacos cargados en chitosan presentan un perfil de liberación cercano al orden-cero.⁷⁹⁻⁸¹

Las microesferas o nanoesferas de chitosan es que permite la liberación de fármacos en el sitio específico del tratamiento si se manipulan y se seleccionan cuidadosamente las combinaciones de polímeros y fármacos. Por ejemplo se han desarrollado membranas utilizando salicato y chitosan sensibles al pH, a la temperatura y a la luz, por otro lado, se han desarrollado membranas que tienen características mucoadhesivas para la aplicación transmucosal. Las microesferas han sido investigadas tanto para la administración de fármacos por vía oral como parenteral.⁸⁰

El uso de chitosan en preparación inyectable ha recibido reciente atención. Los transportadores poliméricos biodegradables ofrecen una ventaja como vehículos de fármacos para la liberación prolongada de componentes de bajo peso molecular hasta fármacos macromoleculares. Jameela et al. (2000), encontraron al usar toxoide de difteria (DT)- cargado lo que demuestra en chitosan, que la producción de anticuerpos se mantuvo constantes por 5 meses, el uso potencial del chitosan en microesferas como vehículo de liberación de fármacos de larga acción. Se ha preparado prednisolona en perlas de gel de chitosan, retenida en una solución acuosa al 10% de aminoácidos (pH 9.0) administrada vía SC en el dorso de ratones, se observó una liberación sostenida que permitió una dosis efectiva mínima local y una prolongada duración de la actividad del fármaco. El chitosan es biodegradado naturalmente por hidrólisis con lisozima. El producto de degradación es atóxico, no inmunogénico y no carcinogénico. Onishi y Machida encontraron en una investigación in vivo la biodegradación del chitosan soluble en agua en ratones. Los resultados muestran que aproximadamente el 50% del material fue desacetilado y no se reportó bioacumulación de estos productos.^{68, 82} Fundado en estos estudios, se hace evidente que el uso del sistema de las micropartículas de chitosan representa una efectiva opción para el diseño de liberación de medicamentos por vía parenteral.

1.14. Las ciclodextrinas (CD) como sistemas de liberación

Sinónimos: beta-cicloamilosa, betadex, beta-dextrina cicloheptaamilosa, cicloheptaglucano, ciclomaltoheptosa, kleptosa.⁶⁴

Categoría Funcional: solubilizante, estabilizante.⁶⁴

Las Ciclodextrinas son carbohidratos cíclicos formados por glucosa unidas mediante enlaces α -(1,4) glucosídicos. Las CD presentan forma toroidal cuya cavidad muestra propiedades hidrofóbicas sus bordes exteriores son hidrofílicos. Una de sus propiedades más relevantes es su habilidad para formar complejos de inclusión con una extensa variedad de moléculas, en medio sólido, líquido y con algunos gases.⁸³

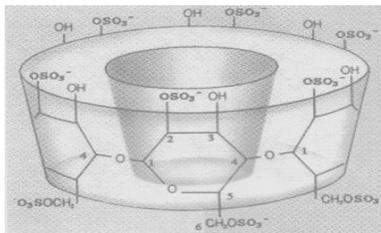


Figura 3.- Forma estructural de las ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas forman el Complejo de inclusión atrapando una o más moléculas huésped incluidas en la cavidad de esta, sin tener lugar algún enlace covalente entre ambos⁸¹. Se han utilizado como acarreadores de fármacos ya que mejoran algunas propiedades físicas como disminuir la inestabilidad del fármaco⁸⁴, mejorar su solubilidad en agua. Las ciclodextrinas cuentan con una estructura química bien definida, con varios lugares susceptibles de sustitución. Cuenta con diferentes tamaños de cavidades para albergar moléculas de diferente tamaño. Tienen cierta solubilidad en el agua.^{85, 86}

En general las moléculas hidrofóbicas tienen una alta afinidad por la cavidad de la CD en presencia de agua, debido a que ésta proporciona una matriz microheterogénea semejante a un disolvente no polar⁸⁷. En solución acuosa, la cavidad altamente apolar de la CD es ocupada por moléculas de agua que están en un estado energéticamente desfavorable

(repulsión polar-apolar) y son por consiguiente rápidamente substituidos por moléculas “huésped,” menos polares aún. Los complejos en solución no son especies estáticas, por el contrario, continuamente se intercambian con las moléculas de substrato libre generando un equilibrio termodinámico y cinético.⁸⁸

En solución acuosa, la molécula “huésped” se encuentra dentro de la cavidad de la CD, por lo cual el complejo es rodeado completamente por una multicapa de moléculas de agua⁸⁸.

La solubilidad acuosa del huésped usualmente se incrementa al aumentar la concentración de CD.

Las ventajas de las ciclodextrinas como vehículos acarreadores de fármacos de interés para la elaboración del sistema matricial son:

1.- El mejoramiento de la absorción ocurre debido a que la velocidad y la magnitud de la biodisponibilidad de un fármaco pueden ser optimizados ajustando varios factores que afectan el equilibrio de la disociación del complejo en la formulación y en la biofase en las que el complejo se administra. Solo la forma libre del fármaco que está en equilibrio con el fármaco complejoado en la solución es capaz de penetrar las barreras lipofílicas para posteriormente entrar en la circulación sistémica.^{88, 89, 90}

2.- Reducción de la irritación local debida a la encapsulación molecular del fármaco en la cavidad de la CD puede prevenir el contacto directo del medicamento con superficies biológicas, así la irritación local disminuye sin afectar los tejidos adyacentes.^{87, 88}

En la liberación de un fármaco, el complejo se disocia en sus componentes (de acuerdo con la constante de estabilidad) sin pérdida de los beneficios terapéuticos del medicamento. Por consiguiente las CD actúan como portadores que disminuyen el daño a tejidos debido a la reducción en las concentraciones efectivas de fármaco en contacto con la membrana. El efecto de protección de las CDs puede atribuirse principalmente a la afinidad pobre de los complejos hidrófilos de los medicamentos por las membranas sarcolemas.^{91, 92}

Liberación lenta de fármacos. Las CDs hidrófilas ionizables refuerzan la absorción del fármaco, mientras que las CDs hidrófobas son útiles para la descarga lenta. Se pueden obtener formulaciones de liberación retardada usando la 6-0-(carboximetil)-O-etil- β -CD.

Las CDs hidrófobas (como los derivados alquilados o acilados) son útiles como portadoras de liberación lenta para fármacos solubles en agua. Se ha informado que se pueden preparar sistemas de liberación farmacológica a base de algunos polímeros para complejar la ciclodextrina, la velocidad de liberación de éste fármaco depende del método usado y puede ser incrementado o disminuido. Por lo anterior, es factible formar un sistema de liberación con CDs y polímeros (poloxámero, chitosan y carbopol) para lograr un sistema de liberación prolongada con florfenicol.^{93,94}

Cuadro 3.- Proporciones máximas de Beta-ciclodextrina aprobadas por la FDA en medicamentos.⁶⁴

Vía	(%)
IM	44.1 %
IV	0.4 %

Cuadro 4.- Toxicidad DL₅₀ de la CDβ en algunas especies por distintas vías de administración.⁶⁴

Especie	Vía	Toxicidad aguda (LD ₅₀) ¹²⁴
Ratón	SC	0.41 g/ kg
Ratón	IP	0.33 g/kg
Rata	IV	1 g/kg
Rata	SC	3.7 g/kg
Rata	IP	0.36 g/kg

Polímeros como sistemas de liberación modificada

Una vez realizados diversos ensayos para incluir el florfenicol en la ciclodextrina se procederá a incluir esta preparación en polímeros, se realizaron formulaciones con carbopol, poloxámero y chitosan con el fin de seleccionar la presentación que logró una liberación prolongada de más de 2 días a dosis de 20 mg/kg, superando al referente de preferencia en las variables de AUC y T>CMI.

1.15. Carbopol

Sinónimos: acritamero, polímero de ácido acrílico, carbopol, carboxi polimetileno, ácido poliacrílico, polímero carboxivinílico, permuten, ultrez.⁶⁴

Categoría Funcional: bioadesivo, agente emulsificante, agente que modifica la liberación, agente suspensor, cubierta de tabletas, agente que incrementa la viscosidad.⁶⁴

Los carbómeros o carbopoles son polímeros sintéticos de alto peso molecular entrecruzados, derivados del ácido acrílico. Su característica más relevante es su gran capacidad de hidratación al absorber agua se hinchan fácilmente. Su naturaleza hidrofílica y su estructura entrecruzada, resultan una opción lógica para su uso en sistemas de liberación controlada de fármacos⁹⁵ adicionalmente, se debe que generan en la mayor parte de los casos mecanismos de liberación de orden cero.⁹⁶

El polímero en pH alcalino, sufre ionización del grupo del ácido carboxílico, debido a una repulsión iónica, lo que produce un aumento de volumen y la relajación completa de la cadena del polímero. Esto facilita la formación de redes tridimensionales que a través permiten la liberación controlada del fármaco en forma de cinética de orden cero. Cuando las cadenas de carbopol se relajan lo suficiente permiten la liberación del fármaco a través de los poros que se forman debido al hinchamiento. Debido a que se trata de un polímero sintético, se elimina del cuerpo sin sufrir degradación alguna. Cabe mencionar que los efectos producidos por este polímero son más reproducibles que aquellos que se puedan obtenerse de polímeros naturales, dado que su método de síntesis es más controlado, lo que permite conocer el porcentaje de polímero obtenido, la cantidad de monómero residual y la composición total del mismo (peso molecular) y conformación espacial como se presenta esquemáticamente en la figura 4.⁹⁷

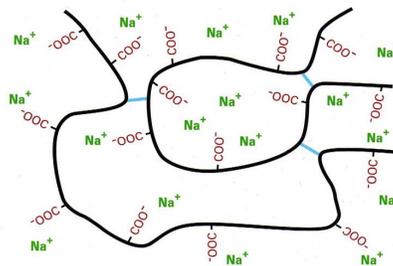


Figura 4.- Estructura de carbopol

En años recientes, las resinas carboméricas han tenido gran éxito como matrices para la liberación controlada de fármacos administrados por vía oral y parenteral.⁹⁸ El carbopol es compatible con gran variedad de ingredientes activos y excipientes, lo que permite diseñar presentaciones con características de liberación-absorción especiales.^{99, 100} Ha sido usado como matriz en suspensiones, cremas para uso externo o como matriz bioadhesiva para formulaciones bucales, rectales y nasales. MacLean (1995)¹⁰¹ estudió la liberación de péptido /proteína a partir de un polímero de hidrogel (carbopol-940) por vía SC en ratas y encontró un incremento en la vida media y la concentración del principio activo Ikechukwi, (1999)¹⁰² investigó la formulación de carbopol 971 conteniendo apomorfin, (agonista dopaminérgico para el tratamiento de Parkinson), para evitar la redosificación que es de 10-15 veces al día. Midió la liberación *in vivo* después de la administración SC e intranasal en conejos y encontró una liberación sostenida del fármaco por encima de 8 hrs en comparación con las 3 hrs que se lograban con las presentaciones convencionales. Otros ejemplos de los fármacos que se han estudiado formulados en vehículo de carbopol incluye al piroxicam¹⁰³ y al diclofenaco sódico.⁹⁵

A pesar de lo dicho, se sabe que la FDA no recomienda a aún su uso por vía parenteral, anqué no se especifica ningún argumento.

Cuadro 5.- Proporciones de Carbopol para sus diferentes usos.⁶⁴

Uso	Concentración %
Agente emulsificante	0.1-0.5
Agente gelificante	0.5-2.0
Agente suspensor	0.5-1.0
Cubierta de tabletas	5.0-10.0

1.16. Poloxámero

Sinónimos: Lutrol F127, Pluronic, Monolan, Pcloxalkol, Copolímero polietilen-propilenglycol, Copolímero polioxietilen-polioxipropilen, Supronic, Synperonic.⁶⁴

Categoría Funcional: Agente Emulsificante, Solubilizante e Humidificante.⁶⁴ Los usos que se le han dado al poloxamero 407 y las proporciones aceptadas son: Como agente gelante de un 15- 50%, como agente estabilizante 1-5% y como agente humectante de un 0.01-5%.

Se ha utilizado en las siguientes proporciones como: agente gelante 15-50%, agente estabilizante 1-5% y como agente humectante de 0.01 – 5%.¹¹⁹

La FDA reporta los siguientes porcentajes recomendados para la formulación de preparados para diferentes vías de aplicación: Oftálmica 0.16-0.2%, Oral 5-12.6% y Tópico 1-15.5%.⁶⁴

Se les conoce como lutrol o pluronic. Estos copolímeros han sido utilizados en formulaciones farmacéuticas como matrices-vehículos para liberación de fármacos debido a su habilidad para autoagregarse formando micellas, microemulsiones o fases líquidas cristalinas. Pueden mejorar la solubilidad, reducir la degradación hidrolítica y pueden lograr una liberación controlada, lo que consigue mejorar la biodisponibilidad.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ Las micelas poseen un centro hidrófobico de óxido de propileno y una corona hidrofílica de óxido de etileno capaces de solubilizar sustancias hidrofóbicas como el florfenicol, una característica importante de este sistema, es que su autoensamble es altamente dependiente de la temperatura. Específicamente, un incremento en la temperatura facilita la autoasociación, resultando una fuerte disminución en la concentración crítica de micelización (ccm). Se han descrito varias técnicas en la literatura para medir la ccm de los polímeros, tales como espectroscopía con luz fluorescente y resonancia magnética nuclear. La micelización y la gelación son afectadas por varios factores como: temperatura, composición de los copolímeros, el peso molecular, la concentración y la presencia de cosolutos, tales como surfactantes, electrólitos y sustancias hidrofóbicas. Para lograr que el sistema tenga una temperatura de gelación entre la temperatura ambiente y la temperatura corporal dependerá del pH (ionización del fármaco) y la concentración de los componentes de la formulación.^{64, 109-111}

Estos sistemas de microemulsión presentan varias ventajas sobre las formulaciones basadas en emulsión entre las que se incluyen: buena estabilidad, fácil preparación, se logra un pequeño tamaño de partícula comparado con la emulsión y por último el mejoramiento en el manejo debido a la transparencia de la formulación. Las propiedades de gelación pueden

ser controladas al incrementar la concentración de solutos adicionados a la formulación¹¹², o la adición de alcoholes Monzon y Sumano (2007).

Las emulsiones oleosas en agua presenta ciertas ventajas en la administración tópica, como: miscibilidad en agua, fácil difusión en el sitio de aplicación y bajo grado de irritación. Las microemulsiones son sistemas bien conocidos por su excelente larga estabilidad y fácil preparación. Estos son definidos como sistemas que contienen agua, aceite y constituyentes anfifílicos constituidos de un único punto isotrópico óptico y termodinámicamente estable en solución líquida. Por otro lado la emulsión homogenizada es cinéticamente estable, pero termodinámicamente inestable a la dispersión. Por lo anterior el tamaño de la gota de la emulsión aumenta continuamente a través del tiempo separando la emulsión en 2 fases macroscópicas. En contraste las propiedades de las microemulsiones son independientes del tiempo (en la ausencia de degradación química) y son independientes en el orden de la mezcla. La estructura de la microemulsión puede ser aceite en agua (o/w) o agua en aceite (w/o) o bicontinua.¹¹³,

Se ha investigado sobre poloxámero como vehículo para fármacos, tanto para la aplicación oral como parenteral.¹¹⁴⁻¹¹⁶ como la formulación que contiene tetraciclina para el tratamiento periodontal, en la que se prepararon 2 poloxámeros semi-sólidos, poli (oxietilen) poli (oxipropilen) y monoglicéridos respectivamente. Su administración se realizó con un equipo inyectable para la liberación del paquete periodontal, la liberación del fármaco, se caracterizó por una transición sólida-gel que partió de la presentación semisólida del paquete periodontal. También se determinó in vitro la liberación del fármaco. Estudios que indican que ambos poloxámeros y gel monoglicéridos pueden ser aplicados subgingivalmente y producen una significativa mejora en la liberación sostenida de fármacos.¹¹⁷. Por otra parte se desarrolló una formulación a base de gel de poloxámero 407 para la liberación de insulina en ratas, aplicada por vía SC, se observó que el efecto hipoglicemiante fue más prolongado que con la formulación convencional de 0.5 hrs a 4 hrs¹¹⁴, En otras investigaciones se elaboró una formulación tópica con lidocaína y pilocarpina, los resultados mostraron que dicha presentación tuvo un rápido inicio de acción y no fue irritante. Los copolímeros logrados mostraron gelación dependiente de

temperatura inversa, la formulación mostró baja viscosidad a temperatura ambiente y se consiguió un gel rígido elástico a temperatura corporal. Esta presentación pudo ocupar la cavidad periodontal y se aplicó fácilmente, debido a la baja viscosidad después de la forma de gel rígido, que aseguró una efectiva fijación de la formulación en el sitio de aplicación. Después del tratamiento el gel puede ser removido por simple lavado con agua fría.¹¹⁸, Entre otras formulaciones que se han preparado destacan el ibuprofeno y la doxiciclina.¹⁰⁹ Estos estudios demuestran que el poloxámero como vehículo para la aplicación parenteral incrementa la estabilidad de los fármacos lábiles y para prolongar la liberación, en aquellos que tienen corta vida media biológica.

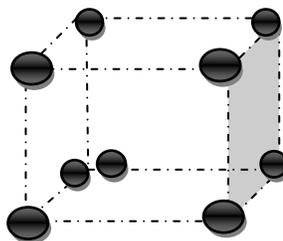


Figura 5.- Estructura tridimensional de poloxámero.

Cuadro 6.- Usos del poloxámero 407 en diferentes especies y toxicidad reportada.¹²⁰

Seguridad	Vía	Dosis	Tiempo del Tratamiento	Toxicidad
Conejos y perros	IV	0.5 g/kg/día	14 días	No se observó
Ratas	Oral	3 – 5 % alimento	2 años	No se observó
Ratas	Oral	7.5 %		Disminuyo el porcentaje de crecimiento

Cuadro 7.- Toxicidad DL₅₀ de poloxámero 407 en algunas especies por distintas vías de administración.¹²¹

Especie	Vía	Toxicidad aguda
Ratón	IV	1 g/ kg
Ratón	SC	5.5 g/kg
Rata	IV	7.5 g/kg

1.17. Vía de aplicación

En el campo de la medicación parenteral se han estudiado sistemas con el fin de proporcionar concentraciones plasmáticas eficaces del fármaco, constantes y duraderos en el tiempo. Son clásicas las suspensiones de penicilina-G procaína y penicilina-G benzatina que hacen posible la administración de una inyección cada 12, 24 ó 48 horas dependiendo de la severidad del patógeno.⁶²

Actualmente, ya se dispone de productos de administración parenteral que posibilitan la liberación del fármaco durante periodos largos (incluso meses), fundamentados en la administración de dispersiones líquidas o semisólidas o en la aplicación de implantes, conteniendo los fármacos en forma de microcápsulas, microesferas, microcriostales o nanocápsulas. Se trata de recubrir los cristales de principio activo con sustancias biodegradables, con el fin de conseguir liberarlo de forma lenta y constante. Junto a estos sistemas, también se han desarrollado auténticas bombas osmóticas de implantación subcutánea que liberan el fármaco de forma controlada, al igual que comprimidos matriciales y cápsulas colocadas en pequeños tubos que deben ser implantados subcutáneamente.⁴⁵

Las inyecciones subcutáneas buscan liberar el producto en el espacio entre la dermis y la grasa subcutánea. En muchas especies animales, la inyección subcutánea se realiza en el área del cuello en la que la piel es más laxa y el tejido subcutáneo se encuentra fácilmente. Es común, que las inyecciones subcutáneas formen un depósito, cuyo tamaño, forma y naturaleza está determinada por la composición del preparado que se aplicó, volumen inyectado, propiedades reológicas del sistema, tasa de dispersión, y las fuerzas internas debido a la contracción de tejidos adyacentes (músculo). Una vez que se ha formado el depósito con el fármaco, éste debe liberarse y difundir hacia la circulación sanguínea y capilares linfáticos. En el espacio subcutáneo, la cantidad de capilares sanguíneos es menor que en tejido muscular y dependiendo de la profundidad de la inyección y la cantidad de grasa presente, la tasa de absorción es más lenta que en músculo. El retardo en la absorción de fármacos depositados en el tejido subcutáneo es mayor para aquellos que tienen altos coeficientes de partición de lípido/agua, pero aún este factor puede modificarse.^{47, 63}

Cabe mencionar que espacio subcutáneo tiene una permeabilidad excepcionalmente baja, lo cual puede explicarse por la gran cantidad de lípidos extracelulares. La grasa subcutánea tiene un espesor aproximado de 30 mm en la mayoría de las especies y se le puede conceptuar como una barrera lipofílica, la cual evita la pérdida excesiva de agua y protege al organismo de la entrada de químicos y otros contaminantes. La distribución y el tipo de lípidos presentes en el tejido subcutáneo no están totalmente estudiados en animales.^{46, 47}

2.- Justificación

Dado que el florfenicol logra sus efectos óptimos antibacterianos in vivo al permanecer por periodos prolongados en el plasma y tejidos a una concentración por lo menos equivalentes a la CMI de patógeno en particular, se consideró importante realizar estudios encaminados a extender el intervalo de dosificación hasta ahora logrado por el preparado de referencia Nuflor® de Schering-Plough/Intervet y que es de 48 horas. Para ello se proyectó el uso de los polímeros ya descritos (chitosan, carbopol y poloxamero) y la inclusión de florfenicol en una ciclodextrina, basados en evidencias previas de que dicha combinación puede lograr un efecto de larga acción. Para lograr esta extensión el ID, se realizaron diversos preparados y de los prototipos logrados se realizaron pruebas farmacocinéticas comparativas con el referente en ratas Wistar. A su vez, de los ensayos en ratas se escaló a cabras, habiendo seleccionado los preparados con mayor estabilidad, que mantuviera concentraciones terapéuticas de más de 3 días y que no presentara toxicidad aparente o irritación en los sitios de administración. Se eligieron 2 preparados de florfenicol de larga acción (florfenicol-LA-chitosan) formulado a base de chitosan y otro a base de β -ciclodextrina, carbopol 971 y poloxámero 407.

Es importante mencionar que al inicio de este trabajo solo existía en el mercado un solo producto de florfenicol de larga duración original el Nuflor® con tiempo de redosificación de 48 hrs. Posteriormente se dio a conocer por el mismo fabricante (Schering-Plough/Intervet) que se lanzaba un preparado que permitía concentraciones terapéuticas hasta por 96 horas pero con el doble de la dosis (40 mg/kg). Esta situación pone de manifiesto que el objetivo de este ensayo es congruente con las tendencias de la farmacología moderna. No obstante, cabe aclarar que no se realizaron ensayos con este referente, lo que de alguna manera queda como siguiente pasó para los prototipos logrados en este estudio.

3.- Hipótesis: La inclusión de florfenicol en diferentes matrices poliméricas permitirá obtener uno o varios prototipos de florfenicol LA que mantendrán concentraciones terapéuticas en caprinos de 48 horas a cuatro días aproximadamente.

4.- Objetivo General: Obtener uno o varios prototipos de liberación sostenida de florfenicol por medio de diferentes matrices polimérica que brinde concentraciones terapéuticas de 48 horas a 4 días en cabras.

4.1. Objetivo Alternativo: Diseño de un preparado de liberación sostenida de Florfenicol que brinde por lo menos concentraciones terapéuticas por 48 hrs. en cabras pero que no invada las restricciones de la patente del preparado referente.

5. Material y métodos

El estudio fue aprobado por el Comité de investigación de Posgrado, cuidado y Uso de Animales Experimentales (CICUAE), de acuerdo a la Regulación Oficial Mexicana NOM-062-ZOO. 1999 y se llevo a cabo en una granja experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El trabajo de campo se realizó en las instalaciones de Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agro-Silvo Pastoril (CEIEPASPS) localizado en el Km 68 de la carretera Atizapán-Jilotepec, Chapa de Mota, edo. México. La fase analítica se realizo en el laboratorio del departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicada en Ciudad Universitaria. Las ratas Wistar fueron obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, también perteneciente a la UNAM.

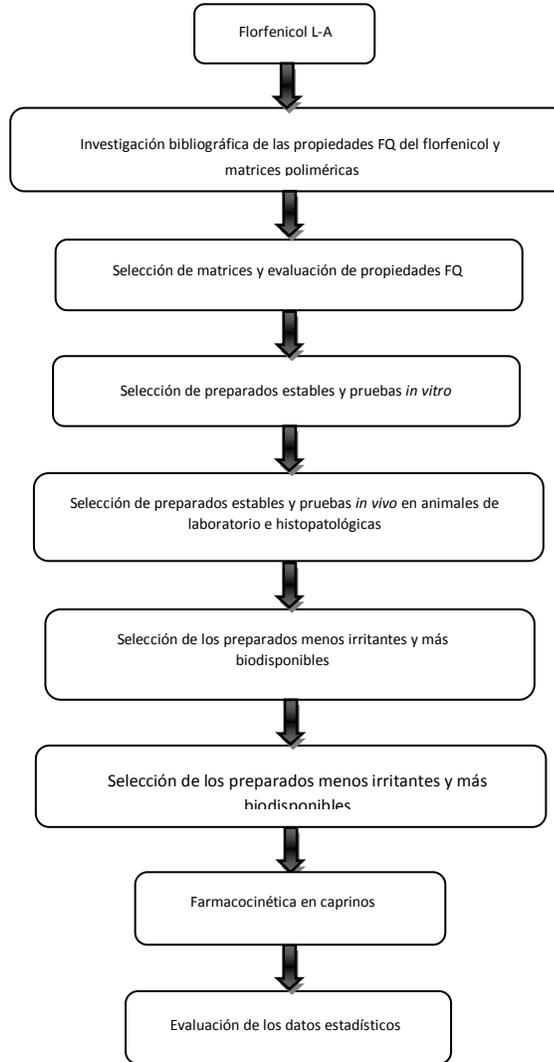


Figura 6.- Flujograma del proyecto de investigación.

5.1. Fase I de Investigación evaluaciones *in vitro*.

Se realizaron estudios *in vitro* en cámaras de difusión de Franz sobre el principio activo, solo y acompañado de excipientes con el fin de aportar elementos suficientes para obtener un medicamento-LA estable, biodisponible, y que pudiera ser fabricado por medio de un proceso industrializable.

Resultados Fase I.

Se midieron las muestras por triplicado con las celdas de difusión de Franz. Se evaluaron en cámaras de Franz diversos florfenicol incluido en diversos porcentajes de marices LA. En la figura 8 se presentan los resultados obtenidos. La evaluación de las concentraciones se realizó por medio de un método microbiológico de difusión en placa de actividad vs concentración.

Los preparados 3, 4 y 6 fueron los que ofrecieron una mayor capacidad de liberación sostenida y son los que se eligieron para la siguiente fase.

Vehículos utilizados en los 7 preparados evaluados en las cámaras de Franz para la preparación del FLORFENICOL-LA.

1. Propilenglicol
2. N-metil-2-pirrolidona
3. Polietilenglicol
4. Alcohol etílico
5. Agua Inyectable
6. Chitosan
7. β -Ciclodextrina
8. Carbopol 971
9. Poloxamero 407
10. Florfenicol
- 8.- Ácido acético

5.2. Fase II de Laboratorio

Preparados LA de florfenicol para administración en ratas

5.2.1.1 Formación del complejo de inclusión florfenicol-LA-chitosan Preparado 3 de la fase anterior (1)

Solución de Florfenicol

1. En un vaso de 250 mL agregar 40 mL de n-metil-2-pirrolidona con agitación constante y adicionar gradualmente 30 g de Florfenicol, una vez disuelto adicionar 15 mL de polietilenglicol E300 agitar, después adicionar el alcohol y finalmente adicionar 1.5 mL de ácido acético y filtrar en condiciones estériles.

Solución de Chitosan

1. Colocar en un vaso de 100 mL 20 mL de propilenglicol y adicionar 1.5 mL de ácido acético, agitar y agregar gradualmente, 0.5 g de chitosan, conectar esta solución a una temperatura que oscila entre 40-45 °C, cuando se observe el chitosan totalmente disperso se adicionan 4 mL de agua, continuar con la agitación hasta que se observe una solución viscosa transparente.

Mezcla final

1. A la solución de florfenicol estando en agitación constante se adiciona gradualmente la solución de chitosan, de tal forma que se incorpore totalmente esta solución a la solución de florfenicol, continuar con la agitación hasta un tiempo de 30 min. Finalmente se obtiene una solución con cierta viscosidad pero que se toma con la aguja # 22 sin ningún problema y también se dispara.

5.2.1.2 Formación del complejo de inclusión florfenicol-LA-BCP. Preparado 4 de la fase anterior (1)

Para prepara 100 ml

- Florfenicol 30g
- Diluyente (pharmasove) 45ml
- Propilenglicol E300 20 ml
- Carbopol 971 1g
- β -ciclodextrina 0.5g
- Poloxamero 407 1g
- Agua inyectable 22.5

Procedimiento:

- 1.- Diluir en pharماسolve florfenicol agregando poco a poco manteniendo en agitación constante hasta que se encuentre totalmente disuelto.
- 2.- Agregar poco a poco β -ciclodextrina hasta su disolución, para ayudar a ello se puede ir agregando un poco de polietilenglicol.
- 3.- Agregar propilemglicol hasta obtener una solución amarilla transparente.
- 4.- Agregar el carbopol hasta obtener una solución transparente y sin grumos.
- 5.- Se puede ir agregando el agua mientras se agrega el carbopol.
- 6.- La solución transparente obtenida es refrigerada por 3 a 4 hrs.
- 7.- Sacar el preparado de refrigeración y en agitación constante agregar poco a poco el poloxamero.
- 8.- Hasta obtener el un preparado transparente poco viscosa.

5.2.1.3. Formación del complejo de inclusión florfenicol-LA-chitosan Preparado 6 de la fase anterior (1)

Solución de Florfenicol

2. En un vaso de 250 mL agregar 200 mL de n-metil-2-pirrolidona con agitación constante y adicionar gradualmente 30 g de Florfenicol, una vez disuelto adicionar 15 mL de polietilenglicol E300 agitar, después adicionar el alcohol y finalmente adicionar 1.5 mL de ácido acético y filtrar en condiciones estériles.

Solución de Chitosan

2. Colocar en un vaso de 100 mL 20 mL de propilenglicol y adicionar 1.5 mL de ácido acético, agitar y agregar gradualmente, 0.5 g de β -ciclodextrina, conectar esta solución a una temperatura que oscila entre 20-25 °C, cuando se observe la mezcla está totalmente dispersa se adicionan 4 mL de agua, continuar con la agitación hasta que se observe una solución transparente.

Mezcla final

2. A la solución de florfenicol estando en agitación constante se adiciona gradualmente la solución de β -ciclodextrina, de tal forma que se incorpore

totalmente esta solución a la solución de florfenicol, continuar con la agitación hasta un tiempo de 30 min.

5.3. Estudio *in vivo*

Se utilizaron ratas, las cuales se dividieron en 4 grupo con 10 animales cada uno, que fueron tratados de la siguiente manera: Grupo I; preparado florfenicol- L-A (chitosan), Grupo 2; florfenicol-LA-BCP y Grupo 3;preparado de florfenicol con β -ciclodextrina-LA y Grupo 4; Fármaco pionero, todos se administraron a dosis de 20 mg/Kg, los animales se observaron durante 7 días posteriores a la administración para evaluar cambios que pudieran presentar en comportamiento y signos de intoxicación aguda como dolor, inflamación o necrosis.

Obtención de las variables farmacocinéticas: A través del análisis del suero obtenido de las ratas por medio del método microbiológico de *Bennet et al.*¹²²

Elección de un preparado de liberación controlada

Posteriormente a las pruebas realizadas *in vivo* en las ratas (toxicidad, concentraciones séricas, obtención de variables farmacocinéticas), los productos que no cumplieron con lograr una liberación sostenida de 120 hrs se eliminaron y se seleccionaron los preparados que si la obtuvieron para realizar los estudios en cabras. Los productos elegidos fueron el preparado 3 y el preparado 4.

5.4. Fase III de Campo

Obtenidos los preparados y seleccionadas las formulaciones más adecuadas. Se formaron grupos de 6 cabras cada uno, y recibieron diferentes tratamientos de florfenicol L-A-chitosan, florfenicol-L-A-BCP y florfenicol pionero aplicados por vía SC y en dosis de 20 mg/Kg.

Grupo 1 Florfenicol pionero

Grupo 2 Florfenicol-LA-chitosan

Grupo 3 Florfenicol-LA-BCP

5.4.1. Diseño de la prueba.

Se tomaron muestras sanguíneas (5ml) por punción de la vena yugular a los 30 minutos, 1, 2 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 y 120 h, colectadas en tubos con EDTA de 10 ml. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm, por 20 minutos y el plasma obtenido se refrigeró a -4°C. Después se realizó el análisis microbiológico.

Alojamiento y alimentación. Todos los animales recibieron su dieta habitual, agua *ad libitum*, se alojaron en sus corrales, compartiendo con otros animales no incluidos en el estudio y conviviendo con integrantes de otros grupos.

5.4.2. Evaluación de la toxicidad de florfenicol-LA-chitosan y florfenicol-LA-BCP

Los animales fueron monitoreados diariamente para detectar algún signo de reacción adversa o toxicosis al preparado como: salivación, lagrimeo, anafilaxia, diarrea, fotosensibilización, reacción inflamatoria en el sitio de administración.

5.4.3. Análisis cuantitativo de la concentración de florfenicol en el plasma de los caprinos.

Este estudio se realizó desarrollando en método microbiológico de difusión en agar Bennet et al.

5.4.4. Análisis para la evaluación microbiológica de florfenicol.

El estudio cuantitativo de florfenicol se desarrollo usando el método microbiológico de difusión en agar, se utilizó el microorganismo *Bacillus subtilis* 6633 ATCC. La solución estándar se preparó utilizando una serie de diluciones del fármaco control y plasma caprino. Las concentraciones de florfenicol se calculo por interpolación, comparando el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento de la bacteria con una curva realizada con el estándar. Se tomaron 5 mL de sangre, las muestras obtenidas se centrifugaron y refrigeraron (-4° C) hasta el momento de su análisis. El procesamiento de los sueros se llevó a cabo mediante el método microbiológico de Bennet *et al.*

Método de Bennet *et al.*¹²²

El agar a utilizar será Mueller Hinton (Bioxon) preparado siguiendo las indicaciones que marca el producto.

- Cultivo bacteriano

Se utilizará una cepa bacteriana ATCC (*American Type Culture Collection*) *Bacillus Subtilis* 6633.

- Estándar bacteriano (obtención de spora)

Obtención de spora de *Bacillus Subtilis* 6633

Se resembrar en caja petrí (24 horas antes a temperatura 32-37° C). Con 5 ml de caldo de cultivo a temperatura ambiente lavar el crecimiento de la cajita y recogerlo con una espátula, centrifugar (20 minutos a 3500 rpm), se decantar el supernadante obtenido y se resuspender el sedimento con 50-70 ml de caldo de cultivo estéril y calentar la suspensión por 30 min. A temperatura de 70° C, pasado este tiempo refrigerar por 2 horas. Sacar del refrigerador e impregnar la placa de agar.

- Preparación de las placas

En un refractario tipo Pirex® de 21 X 20 cm, estéril, se colocarán 300 ml de agar y se dejará enfriar durante 10 minutos. Sobre el agar ya frío se colocarán 400 µl de la suspensión de la spora bacteriana y por medio de un hisopo estéril se distribuirá homogéneamente sobre todo el agar, dejar reposar la placa de agar a temperatura ambiente por 2 horas.

- Preparación de las diluciones

Se pesarán 20 g de estándar de florfenicol (98% de pureza), se colocará en un matraz y se afora a 100 ml con agua desionizada. Se Marcaron 10 tubos de 5 ml del 1 al 10 y uno de 15 mililitros con el número 0, en el matraz numerado con el 0 se coloca 9 ml de agua

desionizada y en los demás tubos se coloca 1 ml en cada uno de ellos. Del matraz se toma 1 ml y se agrega en el tubo 0 se homogeniza y de este se toma 1 ml y se agrega al tubo 1 se homogeniza se toma 1 ml y se agrega al tubo 2 y así se continúa hasta completar los 10 tubos, teniendo finalmente las siguientes diluciones:

Cuadro 8.-Diiluciones del estándar de florfenicol.

No	Concentración (µg/ml)
Matraz	200
Tubo 0	20
Tubo 1	10
Tubo 2	5
Tubo 3	2.5
Tubo 4	1.25
Tubo 5	0.625
Tubo 6	0.3125
Tubo 7	0.15625
Tubo 8	0.078125
Tubo 9	0.0390625
Tubo 10	0.01953125

- Lectura de las placa

Una vez preparada la placa y con ayuda de un sacabocados se realizaran a lo largo del refractario dos hileras de 10 pozos cada una. Colocando en cada pozo 100 µl de cada una de las diluciones, realizándose por duplicado. Se realizaran 5 placas en el mismo día con la misma metodología con la finalidad de tener un total de 10 lecturas, se incuban durante 24 horas a 37°C.

Transcurridas las 24 horas se realizan las lecturas de milímetros de halo de inhibición por pozo y por placa.

- Procesamiento de las lecturas de los halos de inhibición

Se obtienen medias y desviaciones estándar del diámetro de halo de inhibición de cada una de las diluciones. A partir de los cuales y con ayuda de los programas Microcal Origin¹ y Excel², se obtienen las gráficas de milímetros de halo de inhibición vs concentración.

¹ Microcal Origin versión 4.0 Scientific and Technical Graphics in Windows. Microcal Software Inc.

² Microsoft Excel. 1985-97

- Procesamiento de los sueros

Se prepararon las placas con la misma concentración de bacteria del mismo modo que se prepararon las placas para obtener en estándar mediante las pruebas de *Bennet et al* , se realizaron los pozos de la misma manera que los anteriores y en la misma placa se sembraron los tiempos de muestreo de los tiempos de muestreo de los grupos de animales, colocando 100 μ L de suero, se incubaron durante 24 horas y se realizaron las lecturas de los milímetros de halos de inhibición, repitiendo este procedimiento para cada uno de los tiempos de cada uno de los grupos.

- Análisis y procesamiento de los resultados

De los resultados obtenidos por grupo y por tiempo de sangrado se extrapolaron en la grafica de concentración contra halos de inhibición obteniendo así los μ g/mL de cada una de las muestras de suero. Los análisis farmacocinéticos se procesaron por medio de los programas *Microcal origin* versión *originPro 8 Software*, con el cual se realizó la regresión lineal y *Micromath PKAnalyst Scientific Software* en el que se obtuvo el modelo farmacocinético, los parámetros farmacocinéticos que se compararan estadísticamente son aquellos que reflejaron directamente la potencia clínica y significancia de las formulaciones de liberación prolongada (florfenicol-chitosan, florfenicol-BCP) se estimó el área bajo la curva (AUCs), vida media terminal por regresión lineal, volumen aparente de distribución, pico de concentración sérica del fármaco, valor de vida media de eliminación, biodisponibilidad a partir de AUC y concentración sanguínea definida de mantenimiento, así como el análisis estadístico para los productos que se utilizaron. A los datos obtenidos por grupo y tiempo de sangrado se realizó diferencias entre medias y análisis de varianza, con los cuales se realizaron las graficas de concentración contra tiempo a partir de las cuales se obtuvieron las farmacocinéticas de cada uno de los grupos.

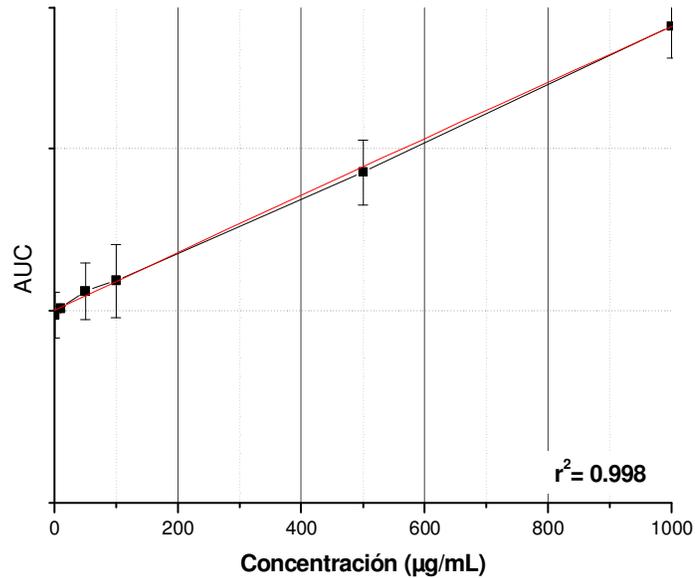


Figura 8.- Regresión lineal \pm 1DE para el estándar de florfenicol.

6 Resultados.

6.1 Fase I de la investigación

Se realizaron múltiples ensayos con los polímeros: quitosan, β -ciclodextrina, carbopol 971 y poloxámero 407.

Con las limitaciones de elaboración de prototipos ya señalados se evaluaron 7 preparados para determinar su tasa de liberación-absorción del donador al sitio receptor. En la figura 9 se presentan los resultados de esta fase, utilizando el método de la cámara de Franz como membrana.

Dado que se buscó preparados con una liberación lo más constante posibles pero sin retardarla tanto que las concentraciones terapéuticamente deficientes, se eligieron los preparados 3, 4 y 6, se les realizaron pruebas adicionales en una siguiente fase.

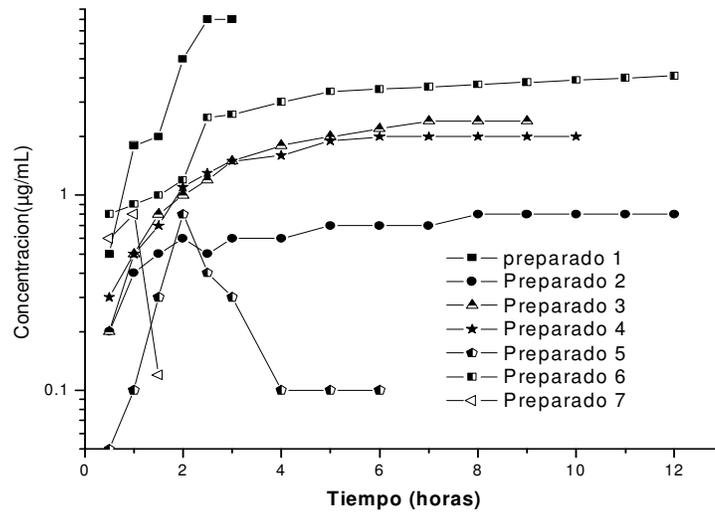


Figura 9.- Resultado de los preparados por el método de la cámara de Franz.

6.2 Resultados. Fase II de Laboratorio. Preparados probados en ratas Winstar

En la figura 10 se presentan las farmacocinéticas de 3 prototipos (3,4 y 6 y del preparado referente) logradas tras su aplicación subcutánea a dosis de 20 mg/kg (6mg/rata en un volumen de 0.02 ml). En el cuadro 9 se presentan los resultados obtenidos mediante análisis compartimental por PKAnalist (Micromath Sci, USA, 1995) usando el modelo 5 cuya fórmula general es:

$$\text{Concentración (tiempo)} = A_1e^{-B_1 \cdot \text{time}} + A_2e^{-B_2 \cdot \text{time}} - A_3e^{-B_3 \cdot \text{time}} + A_4e^{-B_4 \cdot \text{time}}$$

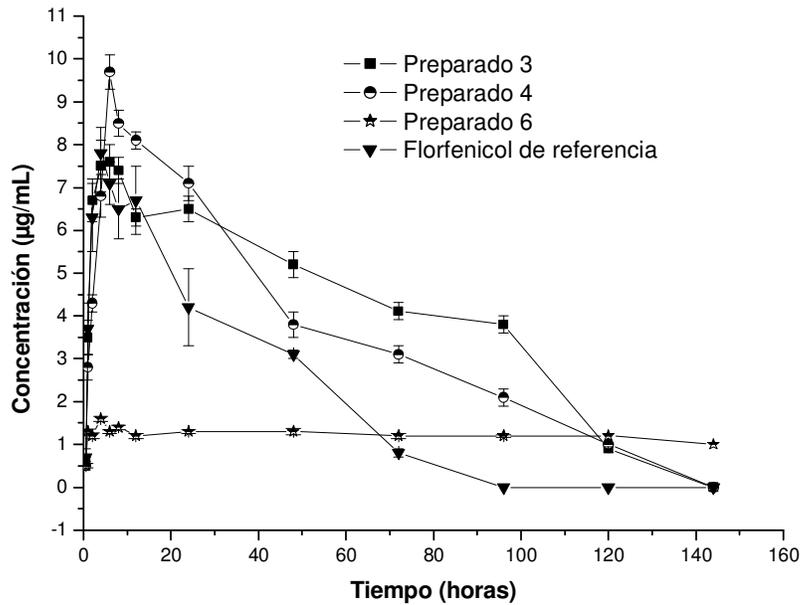


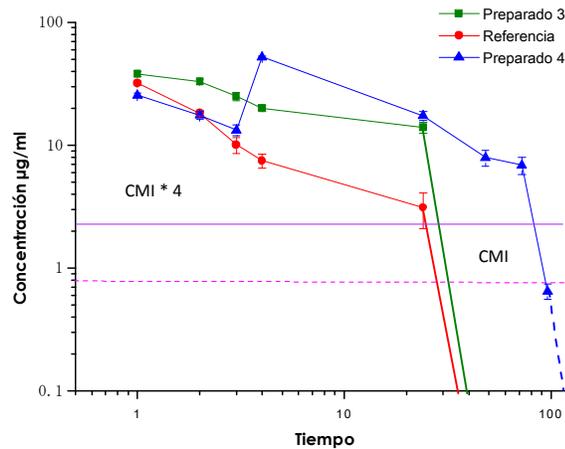
Figura 10.- Resultado de los mejores preparados probados en ratas Winstar.

Cuadro 9.- Promedio \pm DE de las variables farmacocinéticas de los preparados de referencia y de larga acción de florfenicol posterior a su administración subcutánea a dosis de 20 mg/kg en ratas (6 mg/rata, en un volumen de aproximado 0.02 ml).

Variable	Preparado 3	Preparado 4	Preparado 6	Referencia
C_{max}	7.45 \pm 0.23	9.56 \pm 0.47	1.62 \pm 0.37	7.51 \pm 0.31
T_{max}	5.56 \pm 0.12	5.84 \pm 0.24	8.18 \pm 0.57	6.35 \pm 0.47
AUC	558.06 \pm 15.5	487.78 \pm 13.56	149.1 \pm 10.36	284.5 \pm 9.65
AUMC	33113.98 \pm 198.65	25577.7 \pm 205.63	10353.5 \pm 103.56	10647.36 \pm 198.63
MRT	59.33 \pm 1.58	52.43 \pm 1.56	69.43 \pm 2.65	37.42 \pm 1.21

$K^{1/2}_{AE}$: Constante de eliminación, T_{MAX} Tiempo máximo en que ocurre el pico de concentración, C_{MAX} : Concentración máxima, AUC: Área bajo la curva, AUMC: Área bajo la curva en un momento dado, MRT: Vida media de residencia, AUC_t Área bajo la curva calculada por medio trapezoidal.

Dado los resultados obtenidos se realizaron pruebas adicionales para los preparados 3 y 4, incluyendo al referente.



11.- Promedio \pm DE de las concentraciones/actividades séricas de florfenicol vía subcutánea en ratas de tres preparadas de florfenicol (Nuflor® de Schering Plough de México y florfenicol-L-A-chitosan y florfenicol-L-A-BCP a dosis de 20 mg/kg. Se destacan las concentraciones terapéuticas destacadas en los casos del preparado 3 y 4. En el cuadro 13 se presentan los datos farmacocinéticos correspondientes.

Cuadro 10.- Promedio \pm DE de las variables farmacocinéticas de los preparados de referencia y de larga acción de florfenicol posterior a su administración subcutánea a dosis de 20 mg/kg en ratas

Calculated Variable(s):	Referencia	Experimental 3	Experimental 4
$K_{1/2AE}$	$0.729 \pm .03^a$	$1.52 \pm .05^a$	6.26 ± 2^b
T_{MAX}	$1.05 \pm .7^a$	$2.19 \pm .9^a$	$9.03 \pm^b$
C_{MAX} (µg/ml)	29.82 ± 5^a	114.20 ± 15^b	41.13 ± 8^a
AUC: (µg/ml/h)	85.37 ± 2.5^a	682.49 ± 22.9^b	1010.02 ± 87.6^c
AUMC:	179.82 ± 8.6^a	3000.71 ± 24.98^b	18248.55 ± 112.30^c
MRT (h)	$2.10 \pm .09^a$	$4.39 \pm .2^a$	18.06 ± 3^b
AUC_t	219.87 ± 12.2^a	1818.19 ± 96.5^b	1332.67 ± 102^c

$K_{1/2AE}$: Constante de eliminación, T_{MAX} Tiempo máximo en que ocurre el pico de concentración, C_{MAX} : Concentración máxima, AUC: Área bajo la curva, AUMC: Área bajo la curva en un momento dado, MRT: Vida media de residencia, AUC_t Área bajo la curva calculada por medio trapezoidal

Dados los resultados obtenidos y considerando que las variables PK/PD dominantes para florfenicol son el tiempo en el que esté sea o rebase más allá del nivel de CMI y la relación de AUC/CMI, se eligió el prototipo 4, con el que se obtuvieron valores de AUC/CMI de 1083 % mayor al valor del referente del logrado con el Nuflor®.

En la figura 11 se presentan los perfiles séricos de florfenicol con chitosan vs tiempo y en el cuadro 10 los valores farmacocinéticos.

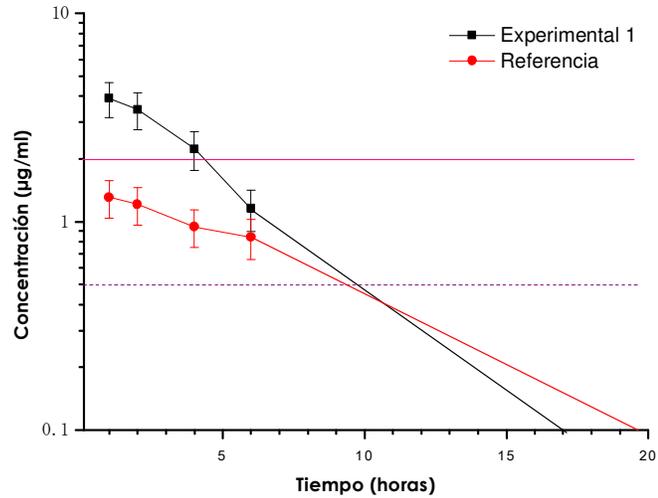


Figura 12.- Promedio \pm DE de las concentraciones/actividad séricas de florfenicol-chitosan vía subcutánea en cabras de dos preparadas de florfenicol (Nuflor® de Schering Plough de México y florfenicol-LA a dosis de 20 mg/kg. Se señalan los valores de CMI para bacterias sensibles y medianamente sensibles.

Cuadro 11.- Promedio \pm DE de las variables farmacocinéticas de los preparados de referencia y de larga acción de florfenicol posterior a su administración subcutánea a dosis de 20 mg/kg en cabras.

Variable(s):	Experimental	Referencia
$K_{1/2el}$	1.47 ± 0.2^a	$1.56 \pm .3^a$
T_{MAX}	$2.15 \pm .3^a$	$2.25 \pm .2^a$
C_{MAX} (µg/ml)	$8.86 \pm .2^a$	$1.13 \pm .7^b$
AUC: (µg/ml/h)	50.98 ± 13^a	6.95 ± 2^b
AUMC:	215.62 ± 120^a	31.41 ± 10^b
MRT (h)	4.22 ± 2^a	4.51 ± 2^a
AUC_t	95.45 ± 50^a	23.03 ± 15^b

$K_{1/2AE}$: Constante de eliminación, T_{MAX} Tiempo máximo en que ocurre el pico de concentración, C_{MAX} : Concentración máxima, AUC: Área bajo la curva, AUMC: Área bajo la curva en un momento dado, MRT: Vida media de residencia, AUC_t Área bajo la curva calculada por medio trapezoidal.

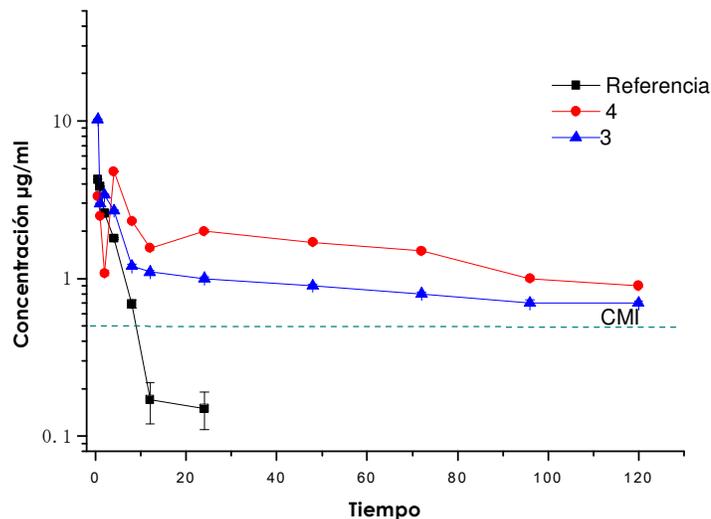


Figura 13.- Promedio \pm DE de las concentraciones/actividad séricas de florfenicol vía subcutánea en cabras de los preparados de florfenicol 3, 4 y el de referencia aplicados a dosis de 20 mg/kg.

Cuadro 12.- Promedio \pm DE de las variables farmacocinéticas de los preparados de referencia y de larga acción de florfenicol posterior a su administración subcutánea a dosis de 20 mg/kg en cabras.

Variable(s):	Referencia	Preparado 3	Preparado 4
$K_{1/2AE}$	15.84 \pm .005 ^a	16.20 \pm .003 ^c	16.35 \pm .4 ^b
T_{MAX}	0.96 \pm .003 ^a	0.28 \pm .001 ^a	4.11 \pm .9 ^b
C_{MAX} (μ g/ml)	4.28 \pm 1 ^a	12.10 \pm 2 ^b	3.76 \pm .5 ^a
AUC: (μ g/ml/h)	11.19 \pm 2 ^a	9.54 \pm 0.4 ^c	42.19 \pm 4 ^b
AUMC:	21.54 \pm 3 ^a	5.53 \pm 0.2 ^c	347.57 \pm 11 ^b
MRT (h)	16.05 \pm .08 ^a	17.14 \pm .002 ^c	16.45 \pm .9 ^b
AUC_t	27.25 \pm 5 ^a	39.43 \pm 10 ^a	104.68 \pm 25 ^b

$K_{1/2AE}$: Constante de eliminación, T_{MAX} Tiempo máximo en que ocurre el pico de concentración, C_{MAX} : Concentración máxima, AUC: Área bajo la curva, AUMC: Área bajo la curva en un momento dado, MRT: Vida media de residencia, AUC_t Área bajo la curva calculada por medio trapezoidal.

Se presentan 3 niveles de sensibilidad de los patógenos más comunes de enfermedades respiratorias en cabras, *Pasteurella multocida*, *M. haemolytica* y *Staphylococcus aureus*, con

base en la literatura dado que no existen puntos de quiebra (breakpoint) establecidos en ninguna agencia regulatoria o institución de investigación para estos patógenos (Papich, 2007). Los valores propuestos son: 0.25 µg/ml para las bacterias sensibles (S); 0.5 µg/ml para las medianamente sensibles (MS) y 2 µg/ml para las resistentes (R). Con estos antecedentes se establecen los siguientes intervalos de dosificación para el mejor prototipo 120 horas y 48 horas para el florfenicol referente, considerando que $T \geq CMI$ durante el 75% todo el intervalo de dosificación y calculando cual sería el valor de AUC/CMI en cada caso.

6.5 Resultados Histopatológicos de muestras obtenidas de ratas que fueron tratadas vía SC con el prototipo 4

De acuerdo con los resultados obtenidos de los estudios histopatológicos del prototipo 4 se da una descripción macroscópica y microscópica de los detalles de las muestras de piel verificado por el departamento de Patología de la UNAM. Se muestran en el cuadro 13.

Descripción Macroscópica

Se reciben 15 fragmentos de piel ratas ejes oscilan entre 1.4 cm hasta 5 cm, y 0.2 cm hasta 1 cm. No se observan cambios macroscópicos significativos.

Se reciben 15 fragmentos de músculo esquelético cuyos ejes mayores oscilan entre 1.5 hasta 3.5 cm y sus ejes menores entre 0.2 cm hasta 1.3 cm. Algunos fragmentos presentan áreas pálidas en la superficie de corte.

Descripción Microscópica.

Los fragmentos de piel presentan grados variables de infiltrado inflamatorio, el cual está compuesto principalmente por neutrófilos, histiocitos y en menor cantidad linfocitos. Asimismo, en algunas muestras hay áreas de edema, depósitos de mineral, cúmulos de fibrina y áreas de necrosis.

Los fragmentos de músculo presentan cantidades variables de infiltrado inflamatorio compuesto por neutrófilos, piocitos, histiocitos y en menor cantidad linfocitos. Asimismo,

en algunos especímenes se observan depósitos de fibrina, degeneración de miofibrillas, necrosis de miofibrillas, áreas de hemorragia y edema en el espacio intersticial.

Cuadro 13.- Resultados del estudio Histopatológicas de porciones de piel de ratas tratadas con florfenicol pionero y los 2 preparados L-A con mejores resultados.

Rata	Inflamación	Fibrina	Mineralización	Edema	Necrosis
1, grupo 1	-	-	-	+ DS	-
2, grupo 1	++ LO, HO (SC)	-	++ SC	-	++ SC
3, grupo 1	-	-	-	++ SC	-
4, grupo 1	-	-	-	+ SC	-
5, grupo 1	+ LO, HO (DS)	-	-	-	-
1, grupo 2	-	-	-	+ DS	-
2, grupo 2	++ NO, PO (SC)	-	+ SC	-	-
3, grupo 2	++ NO, PO (DP y SC)	+ SC	+ SC	-	-
4, grupo 2	++ NO, PO (SC)	-	-	-	-
5, grupo 2	++ NO, PO (SC)	++ SC	-	-	-
1, grupo 3	+ LO (DP), MC (PV)	-	++ DP, SC	-	-
2, grupo 3	-	-	-	-	-
3, grupo 3	+ HO (SC)	-	-	-	+ SC
4, grupo 3	+ HO (M)	-	-	-	-
5, grupo 3	+ HO (SC)	-	-	-	-

Grados de lesión: + leve; ++ moderado; +++ grave.

Células inflamatorias: LO linfocitos; HO histiocitos; NO neutrófilos; PO pocios; MC mastocitos.

Localización: DP dermis profunda; DS dermis superficial; SC tejido subcutáneo; M músculo; PV perivasculare.

7.- Discusión.

En la última década se ha generado un importante auge en diseño farmacéuticos partir de los conceptos de congruencia PK/PD y utilizando moléculas existentes en el mercado. Uno de los objetivos más perseguidos es generar nuevas formulaciones que permitan una liberación modificada generalmente de larga acción (LA) mediante la manipulación de los vehículos. Una tecnología de naturaleza está guiada por factores como: aumentar y mejorar actividad terapéutica de fármacos ya existentes, mejorar las variables PK/PD de los medicamentos, extender la vida de las patentes de las moléculas, evitar resistencias por subdosificaciones. Y disminución en el manejo de los animales. Además la relación del costo beneficio que brindan estos preparados que resultan evidentes por el manejo. En la actualidad se puede afirmar que más del 40% de los preparados farmacéuticos están diseñados como LA y sus principales usos terapéuticos son el tratamiento de enfermedades respiratorias, aumentar la eficacia alimenticia y mejorar el crecimiento y producción de leche¹³².

En cuanto a los productos encontrados en el mercado con principio activo de florfenicol es importante resaltar que el pionero recomienda un intervalo de dosificación de 48 horas, y otros genéricos se recomiendan cada 72 horas, aunque no se han publicado los datos que sustenten tal indicación.

Los resultados obtenidos con el prototipo 4 elaborado a base de β -ciclodextrina, carbopol y poloxamero y puede considerarse de larga acción para el florfenicol en ratas mostró una mejor farmacocinética del florfenicol de referencia. Por ejemplo para el preparado florfenicol-LA (chitosan), se logró una C_{max} de $114.20 \pm 15 \mu\text{g/ml}$ y un T_{max} de 2.19 ± 0.9 h. Además, las concentraciones séricas permanecieron arriba de $0.1 \mu\text{g/ml}$ por 120 h y una MRT de 4.39 ± 0.2 h y para el preparado florfenicol-LA (BCP), se logró una C_{max} de $41.13 \pm 8 \mu\text{g/ml}$ y un T_{max} de 9.03 h. Además, las concentraciones séricas permanecieron arriba de $0.1 \mu\text{g/ml}$ por 120 h y una MRT de 18.06 ± 3 h, dichos resultados a pesar de que no son

comparables, si es de interés mencionar que este valor supera a los encontrados en previos estudios en otras especies, como becerros y en cabras. Así mismo, ninguno de los antes mencionados estudios reportados supera una $t_{1/2\beta}$ más larga que la alcanzada con Florfenicol-LA (2.7 h).

Con el propósito de definir la efectividad terapéutica del Florfenicol en base a su PK/PD tiempo-dependiente, concentraciones ligeramente superiores a la CMI de 2 a 4 veces durante al menos el 60% del intervalo de dosificación), se midió el tiempo a lo largo del cual la concentración sérica de florfenicol fueron mantenidas, según las CMI reportadas en rumiantes fueron categorizadas como S = para las bacterias susceptibles, cuando las CMIs se encuentran $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$, MR = para bacterias medianamente resistentes, cuando las CMIs se encontraron arriba de $1.0 \mu\text{g/mL}$ y R = para bacterias resistentes, cuando las CMIs se encuentran $> 2 \mu\text{g/mL}$. El preparado Florfenicol-LA (chitosan), alcanzó una C_{max} de $4.28 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ y un T_{max} de $0.96 \pm 0.003 \text{ h}$ en las cabras, después las concentraciones séricas decrecieron lentamente, pero siempre excediendo el límite menor fijado de $0.5 \mu\text{g/mL}$ hasta completar 120 horas con un MRT de $1.92 \pm 0.08 \text{ h}$. El preparado Florfenicol-LA (BCP), alcanzó una C_{max} de $3.76 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ y un T_{max} de $4.11 \pm 0.9 \text{ h}$ en las cabras, después las concentraciones séricas decrecieron lentamente, pero siempre excediendo el límite menor fijado de $0.5 \mu\text{g/mL}$ hasta completar 120 horas con un MRT de $8.23 \pm 0.9 \text{ h}$. (ver figura 15)

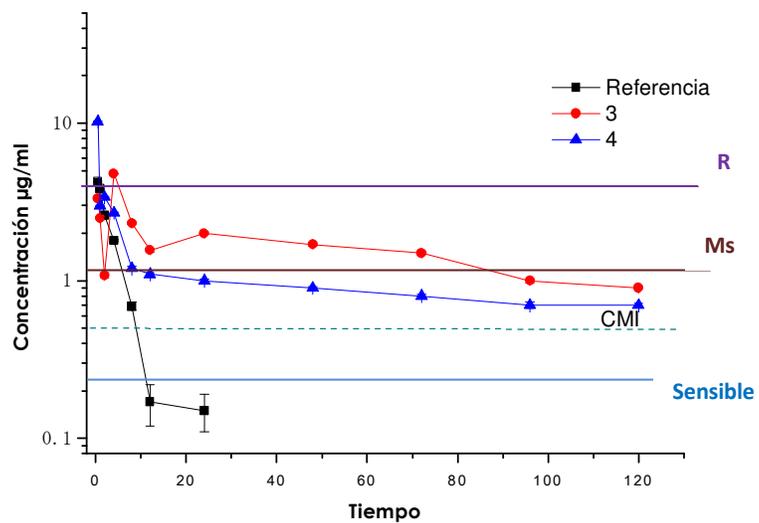
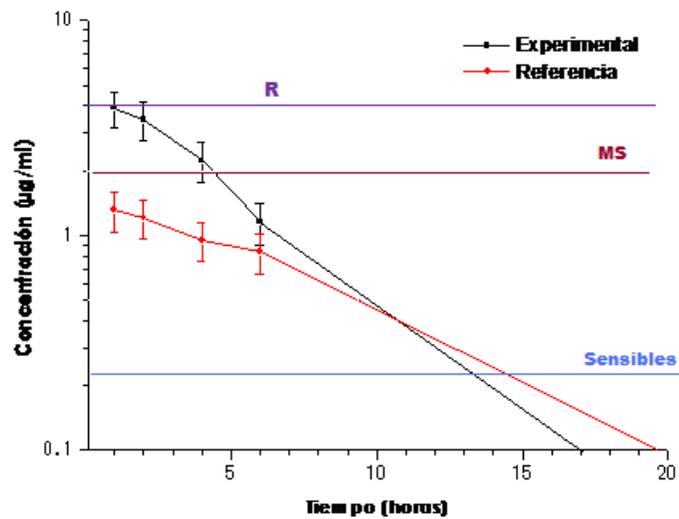


Figura 14. Niveles Terapéuticos de los preparados de florfenicol chitosan y β -ciclodextrina, Carbopol y Poloxámero.

Si se comparan estos resultados con otros ensayos realizados en cabras, se puede afirmar que los 2 preparados de Florfenicol-LA lograron concentraciones por encima de estos

valores, y que provee niveles terapéuticos adecuados y se piensa, que es en parte debido a un incremento en la absorción causada por la β -ciclodextrina y chitosan, ya que se ha reportado que en cabras tratadas con 20 mg/kg única dosis por vía intramuscular C_{\max} de 1.21 ± 0.10 y una T_{\max} 1.13 ± 0.13 (Ali 2003) en otro estudio C_{\max} 0.859 ± 0.025 y T_{\max} 1.220 ± 0.045 (Atef, 2001) ambos estudios realizados en animales sanos. Como se muestra en la figura 14.

Cabe hacer mención de los valores de C_{\max} y T_{\max} obtenidos en otras especies como: perros a dosis de 20 mg/kg vía oral fueron C_{\max} 6.18 ± 1.07 y T_{\max} de 0.94 ± 0.43 (Byung-kwon park, 2008), en conejos vía oral e intramuscular respectivamente a una dosis de 30 mg/kg; C_{\max} 15.14 ± 4.47 , T_{\max} de 0.50 ± 0.0 y C_{\max} 21.65 ± 2.57 , T_{\max} de 0.50 ± 0.0 (Abd El-Aty, 2004), en otro trabajo en conejos a una dosis de 20 mg/kg vía oral obtuvieron una C_{\max} 7.96 ± 2.75 y T_{\max} de 0.90 ± 0.38 (Park); en patos a dosis de 30 mg/kg vía IM, sanos la C_{\max} 2.99 ± 0.023 y T_{\max} de 68.76 ± 0.613 y en patos de desecho C_{\max} 1.32 ± 0.066 y T_{\max} de 68.4 ± 1.92 (El-Banna); En pollos a dosis de 15 y 20 mg/kg vía IM respectivamente C_{\max} 3.50 ± 1.13 , T_{\max} de 37 ± 0.22 y C_{\max} 6.79 ± 1.38 y T_{\max} de 44 ± 20 y vía oral C_{\max} 4.36 ± 1.66 , T_{\max} de 55 ± 26 y C_{\max} 5.82 ± 2.43 y T_{\max} de 81 ± 26 (Shen); En pollo infectados con *E.coli* a dosis de 30 mg/kg IM C_{\max} 8.85 ± 1.20 , T_{\max} de 46 ± 31 y vía oral C_{\max} 7.90 ± 3.00 y T_{\max} de 66 ± 0.26 (Jianzohong Shen, 2002); En ganado bovino a dosis de 20 mg/kg vía IM los valores encontrados fueron: C_{\max} 3.07 y T_{\max} de 200 (min) (Lobell); en otro estudio C_{\max} 2.3 y T_{\max} de 180 (min) (Soback) y en cerdos especie en la que más se ha estudiado la farmacocinética de florfenicol: Por vía IM y oral a dosis de 15 mg/kg respectivamente C_{\max} 7.3 , T_{\max} de 2.3 y C_{\max} 14.8 y T_{\max} de 3.0 (Voorspoels, 1999), en cerdos sanos e infectados con *actinobacillus pleuropneumoniae* vías IM y VO respectivamente; C_{\max} 3.20 ± 0.61 , T_{\max} de 0.91 ± 0.32 ; C_{\max} 4.00 ± 0.76 , T_{\max} de 0.78 ± 0.27 y C_{\max} 10.87 ± 2.71 , T_{\max} de 1.35 ± 0.71 ; C_{\max} 8.11 ± 2.72 , T_{\max} de 1.92 ± 0.54 (Liu 2003).

La vida media de eliminación obtenida en cabras, fue de 0.66 ± 0.005 horas para Florfenicol-LA (chitosan); y de $2.85 \text{ h} \pm 0.4$ para la Florfenicol-LA (BCP) y de 1.47 ± 0.2 para Florfenicol de referencia. Las diferencias entre estas medias fueron estadísticamente significativas en todas las comparaciones ($P < 0.001$). Los valores obtenidos con Florfenicol-LA superan en mucho a los encontrados para Florfenicol por Ali (2003) y M.

Atef (2001) ($T_{1/2\beta}$ de 127.4 ± 11.0 min y 132.84 ± 3.68 min) después de la administración intramuscular en cabras. También fue superior a los obtenidos con la administración IV de florfenicol en caprinos ($T_{1/2\beta}$ de 71.1 ± 8.9 min).

Se ha reportado que las desventajas de los preparados LA-LS son: presencia de residuos titulares, reacciones adversas en tejidos, inyectabilidad del producto, su retención en el sitio de aplicación y estabilidad del producto.

Se observó una respuesta inflamatoria ligera en el sitio de inyección con los preparados de Florfenicol-LA (chitosan y BCP). Los animales no mostraron ningún signo de dolor o malestar con ellos.

En el examen histopatológico del sitio de inyección a las 120 h para el grupo medicado con Florfenicol-LA (chitosan y BCP) comparando con del grupo tratado con el preparado de referencia. Cabe resaltar que el grupo que presento menor número de lesiones al examen histopatológico fue el del preparado 3 elaborado por la combinación de polímeros como: β -Ciclodextrina, Carbopol y Poloxamero aunado a una liberación prolongada mayor a comparación preparado de referencia y chitosan.

8.- Conclusiones.

Con el preparado matricial inyectable Florfenicol-LA realizado a base de la combinación de Florfenicol + Chitosan y Florfenicol + β -Ciclodextrina + Carbopol 971+ Poloxámero 407 se obtuvieron 2 preparados que no son irritantes a la administración, además de mantener una liberación lenta del activo. De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación farmacocinética y con base a la eficacia clínica reportada para el florfenicol de acuerdo a su relación PK/PD se puede concluir que se cuenta con dos productos novedoso de Florfenicol-LA (chitosan y BCP) para uso parenteral en cabras y cuyo intervalo de dosificación es de 5 días (120 h). Sin embargo, para tener un control óptimo de los preparados obtenidos falta realizar pruebas más específicas de toxicidad en las especies a las que va dirigido (rumiantes) y evaluación de residuos de los preparados.

9.- Literatura citada

1. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Volumen 7, México (DF), SSA, 1999.
2. United States Pharmacopeia Drug Information for the Health Care Professional. Vol. 1, 15th edition. USA, 1997.
3. Improving the Ethical Review Process. Int. J. of Pharm Med. 1997; 11 (3) 119.
4. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Industria Farmacéutica en México, México (DF), SECOFI, 2000.
5. Novoa HG. Ética y reglamentación de la investigación clínica de medicamentos en México, Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas. 1999; 30 (2): 32-34.
6. Spilker B. Guide to clinical trials. Raven Press. 1991.
7. Bernad, BMJ. Dendrimeros. Nuevos Sistemas de liberación de fármacos. Informaceútico. 2002; 9 (3) 13-18.
8. Vargas ED. Farmacocinética sérica en porcinos medicados con una nueva molécula de la familia de las cefalonas (CQMEPCT). Tesis de maestría, FMVZ, UNAM, México, 2001.
9. Jaamela SR, Misra A and Jayakrishnan A. Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 1994; 6 (7) 621-632.
10. Domenech J, Martínez J. and Pla JM. Biofarmacia y Farmacocinética. Vol II. Biofarmacia. Editorial Síntesis, España, 1998.
11. Polishchuk AY and Zaikov GE. Multicomponent transport in polymer systems for controlled release. Vol. 3. Gordon and Breach Science Publishers. Amsterdam. 1997.
12. Sumano, LH and Ocampo, CL *Tetraciclinas*. In Farmacología Veterinaria. 3rd pp 235-262. McGrawHill/Interamericana, Mexico City. 2006.
13. Donald C. Plumb. Veterinary Drug Handbook, fourth edition, p.p. 603,604.

14. Voorspoels, E. D'Haese, B. Pharmacokinetics of florfenicol after treatment of pigs with single oral or intramuscular doses or with medicated feed for three days. *Veterinary Record* (1999), (145) p. 397-399.
15. Priebe, S and Schwarz, In Vitro Activities of Florfenicol against Bovine and Percine Respiratory Tract Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Aug. 2003, p. 2703-2705.
16. Park, B. K, Lim. J.H. Pharmacokinetics of Florfenicol and its metabolite, florefenicol amine, in dogs. *Research in Veterinary Science*. 2008 (84) p. 85-89.
17. Lobell. R.D. Verma. K.J. Pharmacokinetics of Florfenicol following intravenous and intramuscular doses to cattle. *J.vet. Pharmacol. Therap*. 1994. (17) p. 253-258.
18. Neu. H.C. Fu. K.P. In Vitro Activity of Cloramphenicol and Thiamphenicol Analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Aug. 1980, p. 311-316.
19. Atef. M, El-Gendi. Y. Disposition Kinetics of Florfenicol in Goats by Using Two Analytical Methods. *J. Vet. Med. A*. 2001 (48) p. 129-136.
20. Moore. E. Therapeutic Review. Florfenicol. *J. of Exotic Pet Med*. 2007 (January) Vol 16, No 1, p. 52-54.
21. Park. B.K., Lim. J.H., Kim. M.S. Pharmacokinetics of Florfenicol and its major metabolite, florfenicol amine, in rabbits.
22. Jianzhong. S., Xiubo. L., Haiyang. J. Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in healthy sheep. *J. Vet. Pharmacol. Therap*. 2004 (27) p. 163-168.
23. Ali. B. H., Qarawi-Al. A. A. Comparative Plasma Pharmacokinetics and Tolerance of Florfenicol following Intramuscular and Intravenous Administration to Camels, Sheep and Goats. *Veterinary Research Communication*. 2003 (27) p. 475-483.
24. Aty-El. A.M., Goudah. A., Zorba. H. Y. Pharmacokinetics and Bioavailability of Florfenicol Following Intravenous, Intramuscular and Oral Administration in Rabbits. *Veterinary Research Communications*. 2004 (28) p. 515-524.
25. Switala. M. Hrynyk. R. Smutkiewicz. A. Pharmacokinetics of florfenicol, thiamphenicol, and cloramphenicol in turkeys. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2007 Vol. 30. Issue. 2, p. 145-150.

26. El- Banna. H. A. Pharmacokinetics of florfenicol in normal and *Pasteurella*-infected Muscovy ducks. *British Poultry Science*. 1998 (39) p. 492-496.
27. Craene. B. A., Deprez. P. Pharmacokinetics of Florfenicol in Cerebrospinal Fluid and Plasma of Calves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997 (Sep) p. 1991-1995.
28. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit. Florfenicol (Extension to Pigs) 1999. April.
29. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit. Florfenicol (Extension to all food producing species) 2002. January.
30. Shin. S. J. Kang. S.G. Evaluation of the Antimicrobial activity of florfenicol against bacteria isolate from bovine and porcine respiratory disease. *Veterinary Microbiology*. 2005 (106) p. 73-77.
31. Arriaga. P. J.M. Pabello. G. J.A. Efficacy of Florfenicol Premix in Weaning Pigs Experimentally Infected with *Actinobacillus pleuroneumoniae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2000 (42) p 27-33.
32. Liu. J., Fung. F.K., Chen. Z. Pharmacokinetics of florfenicol in Healthy Pigs Experimentally Infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 2003 (Feb) p. 820-823.
33. Shen. J., Wu. X., Hu. D. Pharmacokinetics of florfenicol in healthy and *Escherichia coli*-infected broiler chickens. *Research in Veterinary Science*. 2002 (73) p.137-140.
34. Shen. J., Wu. D., Coast. J. Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *J. vet. Pharmacol. Therap*. 2003 (26) 337-341.
35. Lane. V.M., Wetzlich. S., Taylor. I. Intravenous and subcutaneous pharmacokinetics of florfenicol in sheep. *J. vet. Pharmacol. Therap*. 2004 (27) 191-1196.
36. Kehrenberg. C., Mumme. J., Wallmann. J. Monitoring of florfenicol susceptibility among bovine and porcine respiratory tract pathogens collected in Germany during

- the years 2002 and 2003. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004 (July) p.572-575.
37. Meunier. D., Baucheron. S., Dancla-Chaslus. E. Florfenicol resistance in *Salmonella enteric* serovar Newport mediated by plasmid related to R55 from *Klebsiella pneumonia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (2003) 51, 1007-1009.
 38. Schwarz. S., Kehrenberg. C., Doublet. B., Cloeckaert. A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews* 28 (2004) 519–542.
 39. Vogelmann, B and Craig W. Kinetics of antimicrobial activity. *The Journal of Pediatrics*. 1986; 108(2):835-840.
 40. Andes, D and Craig W. In vitro activities of amoxicillin and amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae*: application to breakpoint determination. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42:2375-2379.
 41. Craig W A. Pharmacokinetic /Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men. *Clinical Infectious Diseases*. 1998; 26 1–12.
 42. Craig, W. Does the Dose Matter? *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 33(Suppl. 3):S233-237.
 43. Rasma. C. Bioavailability, Bioequivalence, and Drug Selection. *Basic Pharmacokinetics REV.* 99.4.25
 44. Iniesta. F. J., López. G. P., Mateos-Pita.A. J., Cargas. S. Limitaciones de los estudios de Bioequivalencia: Aspectos Prácticos. *El Ensayo Clínico en España*. 89-92.
 45. Meier. W. Taubert. A. Functionalized Polymer Nanocontainers for Targeted Drug Delivery. Uni-Basel. Buenos Aires Argentina, 2006, p.1-22.
 46. Aulton. M. E. Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. El-Servier 2004, p. 5-11.
 47. Mahato. R. I. *Pharmaceutical Dosage Form and Drug Delivery*. CRC. Press. 2007, p. 47-73,173-181, 2002-225.

48. Sáez. V. Hrnández. L.L. Liberación Controlada de Fármacos. Aplicaciones Biomédicas. Revista Iberoamericana de Polímeros. 4(2), Abril 2003.
49. Papich. M. G. Drug Compounding for Veterinary Patients. The AAPS Journal 2005 (2) p. E281-E287.
50. Medlicott. N. J., Waldron. N. A. Sustained release veterinary parenteral products. Advances Drug Reviews 2004 856) p. 1345-1365.
51. Ghandehari. H. Materials for advanced drug delivery in the 21 st century: a focus area for Advanced Drug Delivery Reviews. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008 (60) p. 956.
52. Sun. Y., Scruggs. D. W., Peng. Y. Issue and Changes in developing long-acting veterinary antibiotics formulations. Advanced Drug Delivery Reviews 2004 (56) p. 1481-1496
53. Rathbone. M. Veterinary drug delivery: Part VI. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004 (56) p. 1339-1344.
54. Rathbone MJ and Gurny R. Controlled Release Veterinary Drug Delivery 1a ed. Elsevier. Amsterdam 2000.
55. Ahmed. I. Kasraian. K. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002 (54) p. 871-882.
56. Acemoglu. M. Chemistry of polymer biodegradation and implications on parenteral drug delivery. International Journal of Pharmaceutics. 2004 (277) 133-139.
57. Gruet P, Maincent P, Berthelot X and Kaltsatos V. Bovine mastitis and intramamary drug delivery: review and perspectives. Advanced drug delivery reviews. 2001; 50(3); 245-259.
58. Polishchuk AY and Zaikov GE. Multicomponent transport in polymer systems for controlled release. Vol 3. Gordon and Breach Science Publishers. Amsterdam. 1997.
59. Winzenburg. G. Schmidt. C. Fuchs. S. Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004 (56) p. 1453-1466.

60. Brayden. D.J Novel drug delivery strategies in veterinary medicine. Irish Veterinary Journal Volume 56 (6): June, 2003
61. Controlled Drug Delivery: Challenges and Strategies; Park, K., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1997.
62. Remington. Farmacia (Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina. 1998.
63. Chul. S., Kim. J. Development and Biopharmaceutical Evaluation of Quinupramine-EVA Matrix Containing Penetration Enhancer for the Enhanced Transdermal Absorption in Rats. Pharmaceutical Development and Technology. 2007 (12) 429-436.
64. Rowe. R. C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Fifth Edition. Pharmaceutical Press. 2006.
65. Chenite S, Chaput V, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, Leroux JC, Atkinson BL, Finette F, and Selmani A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. Biomaterials.2000; 21: 2155-2161.
66. Dodane V and Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. 1998; 1: 246-253.
67. Ko JA, Park HJ, Hwang SJ, Park KJ, Lee JS. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. Int. J. Pharm. 2002; 249: 165-174.
68. Onishi H and Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. Biomaterials. 1999; 20: 175-182.
69. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. Advanced drug delivery reviews (2004) Elsevier (article in press) Available online at www.sciencedirect.com.)
70. Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K and Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. International journal of pharmaceutics. (2003) Elsevier (article in press) Available online at www.sciencedirect.com.

71. Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery drug development and industrial pharmacy. 1998; 24 (11)979-993.
72. Dodane. V., Vilivalam. D. V. Pharmaceutical applications of chitosan. PSTT. Vol 1, No. 6, September 1998.
73. Senel. S., McClure. S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004 (56) p. 1467-1480.
74. Borchard. G. Modern drug delivery applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001 (52) p. 103.
75. Khor. E. Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in solid State and Materials Science*. 2002 (6) p. 313-317.
76. Khor. E. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003 (24) p. 2339-2349.
77. Dodane V and Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. 1998; 1: 246-253.
78. Kelli HM, Deasy PB, Ziaka E and Claffey N. Formulation and preliminary in vivo dog studies of a novel drug delivery system for the treatment of periodontitis. *International journal of pharmaceutics*. (2004) Elsevier (article in press) Available online at www.sciencedirect.com.
79. Kofug K, Akamine H, Quian CJ, Watanabek K, Togan Y, Nishimura M, et al. Therapeutic efficacy of sustained drug release from chitosan gel on local inflammation. *Int. J, Pharm*. 2004; 272: 65-78.
80. Khor E and Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003, 24: 2339-2349.
81. Tanaka Y, Tanioka S, Tanaka M, Tanigawa T, Kitamura Y, Minami S, Okamoto Y, Miyashita M and Nanno M. Effects of chitin and chitosan particles on BALB/s mice by oral and parenteral administration. *Biomaterials*. 1997; 18: 591-595.
82. Khan. A. T. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J. Pharm Pharmaceut Sci*. 2002 5:3 p. 205-212.
83. Jones SP, Grant DJW, Hadgraft J. and Parr GD. Cyclodextrins in the pharmaceutical sciences. Part II. Pharmaceutical, biopharmaceutical, biological and

- analytical aspects, and applications of cyclodextrin and its inclusion compound. *Acta pharmaceutica technologica*. 1984; 30 (4).263-277.
84. Escobar LL. Interacciones no covalentes analgésicos antiinflamatorios / ciclodextrinas. Doctorado en ciencias químicas. Fac.Quim.UNAM. 1998.
 85. Szeman, J, Stadier-Szoke, A, Vikmon, M and Szejtli, J. Stabilization of prostacilin and furosemide by cyclodextrins. *Chemical Abstracts*. 1988; 108, 392.
 86. Martínez PR, Las ciclodextrinas y su importancia en la industria química. Facultad de Química. UNAM. Licenciatura Ingeniero Químico, México.D.F. 2000.
 87. Brewster. M.E., Sompkins. J.W. The potential use of ciclodextrins in parenteral formulations. *J Parenter Sci Technol* 1989; 43: 231-240.
 88. Loftsson. T., Ducene. D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006.
 89. Szejtli, J. Molecular entrapment and release properties of drugs by cyclodextrins. In *Controlled drug bioavailability*. Vol 3, Eds Smolen V.F. & Ball, L.A. pp 365-421. John-Wiley and sons, New, York. 1985.
 90. Uekama K and Otagiri M. Cyclodextrins in drug carrier systems. *CRC Critical Reviews in Therapeutic Carrier Systems*. 1987; 3(1). 1-40
 91. Bekers O, Uijtendaal EV, Beijnen JH, Bult A and Undeberg WJM. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug development and industrial pharmacy*. 1991; 17:1503-1549.
 92. Uekama, K, Hirayama, F and Irie, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chemistry Reviews*. 1998; 98, 2045 - 2076.
 93. Yoshida, A, Yamamoto, M, Itoh, T, Irie, T, Hirayama, F and Uekama, K. Utility of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in an intramuscular injectable preparation of nimodipine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1990; 38, 176 – 179.
 94. Otero-Espinar FJ, Anguiano-Igeas S, Blanco-Méndez J and Vila-Jato JL. Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm*. 1991; 70: 35-41.

95. Arellano A, Santoyo S, Martin C and Ygartua P. Influence of propylene glycol and isopropyl myristate on the in vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from carbopol gels. *J. Pharm. Sci.*1998; 7.129-135.
96. Welin-Berger K, Neelissen JSM, Bergenstahi B. The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001; 13.309-318.
97. Alonso BMT. Estudios de liberación del trimetoprim por su incorporación en ciclodextrinas con matrices carbomericas. Tesis de licenciatura de la Facultad de Química. para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga en la Universidad Nacional Autónoma de México México, D.F. 2002.
98. Ikechukwu UM, Exaud S, Van den Mooter G, Verbeke N and Kinget R. Bioavailability of apomorphine following intranasal administration of mucoadhesiva drug delivery systems in rabbits. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1999; 9.213-219.
99. Batchelor. H Bioadhesive Dosage Forms for Esophageal Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, Vol. 22, No. 2, February 2005.
100. Akers. M. J. Excipient–Drug Interactions in Parenteral Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 91, No. 11, November. 2002
101. MacLean DS, Robertson JD, Jay M and Stalker DJ. Noninvasive measurement of protein release from subcutaneous depo formulations in vivo using X-ray fluorescence. *J. Control Res.*1995; 34(2)167-173.
102. Ikechukwu UM, Exaud S, Van den Mooter G, Verbeke N and Kinget R. Bioavailability of apomorphine following intranasal administration of mucoadhesiva drug delivery systems in rabbits. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1999; 9.213-219.
103. Doliwa A, Santoyo S, Ygartua P. Effect of passive and iontophoretic skin pretreatments with terpenes on the in vitro skin transport of piroxicam. *Int. J. Pharm.*2001; 229.37-44.

104. Tenreiro. R. C., Bueno. D.L., Concheiro. A. Cyclodextrin/carbopol micro-scale interpenetrating (ms-IPNs) for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2007 (123) p. 56-66.
105. Kabanov, AV, Batrakova, EV, Melik-Nubarov, NS, Fedoseev, NA, Dorodnich, TY, Alakhov, VY, Chekonin, VP, Nazarova, IR, Kabanov, VA. A new class of drug carriers: micelles of poly (oxyethylene) - poly (oxypropylene) - poly (oxyethylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain. *Journal of Controlled Release*. 1992; 22, 141-158.
106. Lawrence MJ. Surfactant systems microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. *European journal of drug and pharmacokinetics*. 1994; 19, 257-259.
107. Sherlund M, Welin-Berger K, Brodin A, Malmsten M. Local anaesthetic blocks copolymer system undergoing phase transition dilution with water. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001 ; 14:53-61.
108. Tarr, BD & Yalkowsky, SH. A new parenteral vehicle for the administration of some poorly water soluble anti-cancer drugs. *Journal of parenteral science and technology*. 1987; 41, 31-33.
109. Passerini N, Albertini B, González-Rodríguez ML, Cavallari C, Rodríguez L. Preparation and characterisation of ibuprofen-poloxamer 188 granules obtained by melt granulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002; 15:71-78.
110. Schmolka, IR. Poloxamers in the pharmaceutical industry. In *Polymers of controlled drug delivery*. Ed. Tarcha, P.J. pp 189-214. CRC Press, Boca Raton, Fl. 1991.
111. Sherlund M, Brodin A, Malmsten M. Micellization and gelation in block copolymer systems containing local anesthetics. . *Int. J. Pharm.* 2000; 211:37-49
112. Gilbert JC, Richardson JL, Davies MC and Palin KJ. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F127 solutions for controlled drug delivery. *J. Control Res.* 1987; 5(2):113-118.
113. Sherlund M, Brodin A, Malmsten M, Holmquist P, Brodin A. Thermosetting microemulsions and mixed micellar solutions as drug delivery systems for periodontal anesthesia. *Int. J. Pharm.* 2000; 194:103-116.

114. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. *Int. J. Pharm.* 1999; 184: 189-198.
115. Blonder MJ, Baird L, Fulfs JC and Rosenthal GJ. Dose-dependent hyperlipidemia in rabbits following administration of poloxamer 407 gel. *J. Pharm. Sci. Tech.* 1999.
116. Veyries ML, Couarraze G, Geiger S., Agnely F, Massias L., Kunzli B, Faurison F and Rouveix B. Controlled release of vancomycin from Poloxamer 407 gels. *International Journal Pharmaceutics.* 1999 ; 192, 183-193.
117. Esposito E, Carotta V, Scabbia A, Trombelli L, Antona PD, Menegatti E and Nastruzzi C. Comparative análisis of tetracycline-containing dental ges. Poloxamer- and monoglyceride-based formulations. *Int. J. Pharm.* 1996; 142(1)9-23.
118. Sherlund M, Malmsten M, Brodin A. Stabilization of a thermosetting emulsion system using ionic and non-ionic surfactants. *Int. J. Pharm.* 1998; 173:103-116.
119. American Pharmaceutical Association and the Royal Pharmaceutical Association and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. Edited by A Wade and PJ Weller, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Second edition. A joint publication of the The Pharmaceutical Press London. 1994.
120. Vaughn M. Nace. *Nonionic Surfactants. Poloxyalkylene Block Copolymers.* Marcel Vol. 60. New York, USA. Dekker, Inc. 2000.
121. Johnston T P, Li Y, Jamal A S, Stechschulte DJ and Dileepan K N. Poloxamer 407-induced atherosclerosis in mice appears to be due to lipid derangements and not due to its direct effects on endothelial cells and macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2003;12(3), 147-/155
122. Benet JB., Brodie JL, Benner EJ and Kirby WM, Simplified accurate method for antibiotic assay clinical specimens. *Amer Soc of Microb.* 1966; 14: 170-177.