



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**BIOEQUIVALENCIA DE UN PREPARADO  
DE ENROFLOXACINA CON PROMOTORES  
DE LA BIODISPONIBILIDAD EN PERROS**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A  
**ALMA ALICIA CARRASCOSA OROZCO**

ASESORES:

**MVZ MC DRA. LILIA GUTIERREZ OLVERA  
MVZ MC ESP. JORGE LUNA DEL VILLAR VELASCO**



**MÉXICO. D.F**

**2010**



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.

## **DEDICATORIA**

Dedico este y todos los logros en mi vida a mi muy querido abuelo José Cándido Carrascosa Lázaro, quien nos ha abandonado físicamente mas no espiritualmente.

## AGRADECIMIENTOS

“Noble institución de ilustres personajes  
mujeres y hombres luchando por la mejor educación,  
el conocimiento y la verdad.

Alma Mater en dorado y azul  
yo te agradezco de todo corazón.”

“A mis asesores Dra. Lilia Gutiérrez Olvera y Dr. Jorge Luna del Villar Velasco un  
agradecimiento muy especial por el invaluable apoyo durante la realización de  
este trabajo”.

“A mis queridos padres, por creer en mi, muchas gracias”.

# CONTENIDO

	Pagina
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	4
HIPOTESIS, OBJETIVO.....	22
MATERIAL, MATERIAL BIOLÓGICO Y METODOS.....	23
RESULTADOS.....	30
DISCUSION.....	31
REFERENCIAS.....	36
FIGURAS.....	39
CUADROS.....	42

## RESUMEN

CARRASCOSA OROZCO ALMA ALICIA. Bioequivalencia de un preparado de enrofloxacin con promotores de la biodisponibilidad en perros (bajo la direcci3n de: MVZ MC Dra. Lilia Guti3rrez Olvera y MVZ MC Esp. Jorge Luna del Villar Velasco)

Un cambio que el m3dico veterinario enfrenta a diario en nuestro pa3s es la sustituci3n de medicamentos originales por medicamentos gen3ricos intercambiables o simplemente gen3ricos, sin embargo, en M3xico en el 3rea veterinaria no existen los primeros. A raz3n que justifica la importancia que el profesional disponga de evidencia cient3fica que le permita conocer el desempe1o farmacocin3tico y especialmente, la biodisponibilidad del medicamento sustitutivo con relaci3n al original, lo que se hace a trav3s de estudios de bioequivalencia.

La enrofloxacin es uno de los antimicrobianos más potentes con los que cuenta el especialista en pequeñas especies, por lo que se propone el diseño de un preparado estratégico con promotores de la biodisponibilidad (nanopartículado) que cubra los requerimientos farmacocinéticos y farmacodinámicos de la enrofloxacin, capaz de lograr valores semejantes o superiores a los que presenta la enrofloxacin de referencia de Bayer (Baytril®, Bayer México). Los promotores utilizados en este ensayo no son únicamente un concepto teórico, sino que fueron elegidos con base en su disponibilidad comercial, costo y virtualmente nula toxicidad.

El preparado de enrofloxacin-nanopartículado (e-n) y el de referencia (e-r) se administraron a un total de 50 perros divididos aleatoriamente en dos grupos de 20 perros y un grupo de 10 perros, a los cuales se les tomaron muestras de sangre para posteriormente realizar la farmacocinética sérica mediante un método cuantitativo microbiológico de actividad concentración, se obtuvieron concentraciones séricas máximas en el preparado e-n de 4.4 veces superiores al original y 10 veces superior en área bajo la curva (AUC).

El preparado de e-n no fue bioequivalente, ya que los resultados sugieren que se cuenta con un preparado con una farmacocinética superior en potencia al producto original, lo cual le confiere una actividad clínica superior durante un mayor tiempo, con lo cual se alargan los tiempos de redosificación, confiriéndole menos dosificaciones por tratamiento. .

Esto abre un amplio campo de investigación aplicada a la clínica de pequeñas especies sobre nuevas formulaciones farmacéuticas y el potencial de contar con antibacterianos con farmacocinéticas mejoradas, que cubren adecuadamente la relación farmacocinética/farmacodinamia, para cada una de las familias antibacterianas existentes en la clínica veterinaria.



## INTRODUCCION

Hace más de dos décadas que se carece de una familia nueva de antibacterianos en medicina veterinaria. La industria farmacéutica ha estimado que para producir un antibacteriano novedoso y al menos tan potente como los ya existentes, se requiere una inversión cercana a los 100 millones de dólares y un periodo de investigación de 5 - 12 años<sup>1</sup>. Evidentemente esto representa un capital de alto riesgo financiero. De tal suerte, es poco probable que en el corto o mediano plazo se genere un grupo de antibacterianos que iguale o supere la potencia de la enrofloxacin, utilizada ya por más de dos décadas en Latinoamérica<sup>1</sup>.

En 1960, Leshner propuso a la comunidad médica la primera quinolona con propiedades antibacterianas, el ácido nalidixico. Hasta mediados de la década de los 70's se introduce a la medicina veterinaria la primer fluoroquinolona, la flumequina, un antimicrobiano que fue muy utilizado en la industria pecuaria. Sin embargo, el medicamento que revolucionó la terapéutica de enfermedades bacterianas en estas especies así como animales de compañía ha sido la enrofloxacin, situación que continua hasta el momento, a pesar de que en la actualidad se cuenta con más de 300 fluoroquinolonas con potencial terapéutico importante.

Tanto en la década de los 80 como de los 90 se hace evidente el incremento en el uso de la enrofloxacin. Las razones son su elevada potencia antibacteriana, quizá 50 ó 100 veces superior a la flumequina, que destruye las bacterias en cuestión de minutos y sus concentraciones óptimas bactericidas *in vitro* son tan solo 2 veces el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI)<sup>2</sup>.

### **Propiedades fisicoquímicas de la enrofloxacin.**

La familia de quinolonas y fluoroquinolonas tiene como núcleo común la estructura 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína (Figura 1). El nitrógeno en posición 1 y el grupo carboxilado en posición 3 son indispensables para la actividad antibacteriana, las fluoroquinolonas poseen un átomo de flúor en posición 6 y un anillo piperacina (norfloxacin, ciprofloxacino, enoxacin) o metilpiperacina (ofloxacin, pefloxacin, amifloxacin) en posición 7, diferenciándose entre sí por el radical en la posición N-1 del núcleo principal y por el radical unido al grupo piperacina<sup>3</sup>.

La enrofloxacin puede encontrarse en 4 isoformas: 1- catión ácido; 2- neutro no ionizado; 3- zwitterion intermedio y 4- ión básico, todos ellos dependiendo del pH al que se encuentren, a pH's bajos tanto el grupo piperazinil como el carboxílico se encuentran protonados y ante un pH alto ninguno de ellos se encuentra protonado, la mayor fracción de disociación corresponde al ácido carboxílico, después el amino y la menor proporción por las especies neutras (Figura 2).

La máxima solubilidad para la enrofloxacin se logra a un pH de 5.02 y el mayor porcentaje de transferencia de fase acuosa a fase orgánica se encuentra a un pH de 7.0.

Cuando el pH del medio está cercano a la neutralidad se favorece el ingreso de enrofloxacin a las bacterias en forma de zwitterion a través de canales de porinas hidrofílicas, ante pH ácido se encuentra en forma ionizada y no puede entrar a la bacteria por difusión, ni por los canales de porinas<sup>3</sup>. En general, las quinolonas y en especial las de tercera generación se inactivan poco en presencia de suero y otros fluidos orgánicos, actúan independientemente del tamaño del inóculo y pueden ejercer efecto antibacteriano a nivel intracelular. Las fluoroquinolonas penetran y alcanzan concentraciones intracelulares muy elevadas, tanto en las células fagocíticas, como en las no fagocíticas<sup>2</sup>.

## **Farmacodinamia**

Las quinolonas y fluoroquinolonas actúan fundamentalmente en la inhibición de la síntesis de DNA bacteriano, provocada por el bloqueo de la subunidad A de la ADN girasa (topoisomerasa II), enzima perteneciente al grupo de las topoisomerasas, las cuales en número de cuatro, son esenciales para la duplicación del ADN. Además de la inhibición de la topoisomerasa II existe inhibición de la topoisomerasa IV, encargada de separar la parte replicada del ADN.

El bloqueo de esta última tiene su mayor importancia en las bacterias Gram positivas, ya que al ser inhibidas las topoisomerasas y quedar sin reparación porciones dañadas del ADN, se desencadena un proceso de endonucleosis (producción de endonucleasas), aunado a esto se induce un sistema de síntesis no replicante de ADN e inhibición de la división celular sobre toda la filamentación, seguida de muerte celular y por ende, una efectiva acción bactericida. A diferencia de las quinolonas las fluoroquinolonas actúan tanto en la subunidad A como en la B de la topoisomerasa II, esta característica les confiere una actividad en las que las bacterias tienen menos mecanismos de resistencia<sup>2</sup>.

### **Farmacocinética de la enrofloxacin en perros**

Las fluoroquinolonas tienen una biodisponibilidad oral que supera el 50% (norfloxacin, ciprofloxacina) en todos los compuestos y se aproxima a 100 % en algunos (temafloxacina, lomefloxacina)<sup>3</sup>. De manera particular la enrofloxacina tiene una biodisponibilidad cercana al 60% por vía oral y una buena penetración a tejidos<sup>3</sup>. Los estudios farmacocinéticos han demostrado que las concentraciones de enrofloxacina en el suero y en los tejidos se encuentran arriba de los CMI en la mayoría de los microorganismos Gram negativos y positivos sensibles, lo que valida su eficacia. Su relativa buena biodisponibilidad por vía oral ha permitido el paso de una vía parenteral a la oral cuando las condiciones del paciente lo permiten. Esto ha hecho que la vía oral sea de uso común en perros.

Los alimentos no reducen de manera sustancial la absorción de las fluoroquinolonas, siempre y cuando estos no contengan iones bivalentes que permitan la formación de complejos dímeros o trímeros con las quinolonas, lo que reduciría la biodisponibilidad y por tanto, la concentración sérica máxima lograda. La combinación de quinolonas y fluoroquinolonas con otros medicamentos como las sales de aluminio, de magnesio o de hierro impiden que se alcancen concentraciones séricas elevadas. En condiciones normales tienen buena difusión a los tejidos a nivel intracelular, atraviesan la barrera hematoencefálica, sobre todo si está inflamada, y alcanza buena concentración en la próstata. Penetran bien al interior de macrófagos y polimorfonucleares, por lo que son antibióticos adecuados para tratar infecciones producidas por gérmenes intracelulares. Las concentraciones en orina, tejido renal, prostático, materia fecal, bilis, pulmón, macrófagos y neutrófilos suelen superar las concentraciones séricas. En contraste con las concentraciones que alcanzan en saliva, hueso y líquido cerebro espinal que son más bajas que en el suero<sup>2</sup>.

La enrofloxacin es parcialmente metabolizada en el hgado en otros metabolitos entre los que destaca la ciprofloxacina, fluoroquinolona utilizada ampliamente en humanos, algunos de sus metabolitos inactivos o con baja actividad son: (I) enrofloxacin 3-, 6-, y 8-hidroxiato, que posee una nula o muy baja actividad antibacteriana; (II) enrofloxacin 5, 6- (ó 6, 8-), 5, 8-, y 7, 8 - dihidroxiato, por biotransformación oxidativa; (III) compuestos tipo-isatin, así como los derivados del ácido antranílico, que tiene directamente una hendidura del anillo heterocíclico de la enrofloxacin; y (IV) 1-etilpiperazin; con el congénere amino-7 y desetilen-enrofloxacin, que representan tanto la molécula de degradación como de eliminación del segmento piperazinilo<sup>14</sup>. La excreción renal es la mayor ruta de eliminación de la enrofloxacin y sus metabolitos, tanto por filtración como por excreción tubular<sup>3</sup>.

En comparación con la absorción oral (60%), la velocidad de absorción de la enrofloxacin es más rápida después de la aplicación subcutánea (SC) o intramuscular ( $T_{1/2}$  abs IM = 0.37 h;  $T_{1/2}$  abs SC, 0.36 h y  $T_{1/2}$  abs PO, 0.92 h). Se calculan los porcentajes de biodisponibilidad en: IM = 87.51%; SC = 80.78% y PO = 60%%<sup>5</sup>.

En perros después de una administración PO y EV de 5 mg/kg se obtienen los siguientes valores farmacocinéticos (véase cuadro 1).

En el hígado se alcanzan las concentraciones máximas de enrofloxacin, seguido de pulmón y riñón y la más baja en cerebro. La enrofloxacin desaparece completamente de todo el tejido después de 3 días. No obstante, debe considerarse que cada preparado comercial debe determinar sus variables farmacocinéticas, en virtud de que los vehículos pueden modificar sustancialmente las tasas de absorción y con ello el tiempo de depuración<sup>5</sup>.

En perros dosificados a 7.5, 10 y 20 mg/kg la C<sub>max</sub> obtenida para enrofloxacin es de 2.12± 0.59, 2.1±0.34 y 4.74 ±1.05 µg/ml respectivamente y para ciprofloxacina (su principal metabolito) 1.30 ± 0.31, 1.30 ± 0.32 y 1.86 ± 0.35 µg/ml respectivamente, con una vida media muy parecida entre las tres dosis con un rango de 4.6 a 5.2 horas para enrofloxacin y de 8.8 a 10.7 horas para ciprofloxacina<sup>7</sup>.

En una farmacocinética realizada en perros con pioderma se observó que se concentra más la enrofloxacin en piel en perros con pioderma que en perros sanos por lo que se alcanzan concentraciones terapéuticas superiores a las 3 horas en los enfermos, siendo 12.5 veces la CMI de los *Staphylococcus intermedius* aislados en este estudio<sup>8</sup>.

## **Relación de farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD) de la enrofloxacin.**

En la terapia antibacteriana es de suma importancia el conocimiento tanto del patógeno implicado como de el sitio de infección, lo cual no solamente facilita la decisión terapéutica, si no que además, puede proporcionar una guía para prevenir reinfecciones<sup>1</sup>. También, es importante considerar que algunas infecciones bacterianas son secundarias a otras patogenias, lo que implica que la causa puede ser el alimento, el agua, la presencia de plagas como ratas, ratones, insectos nocivos etc., o incluso la presencia de otros animales de compañía, por tal motivo, el médico veterinario encargado de aplicar los medicamentos a los animales requiere conocer una serie de datos para un uso racional de antibacterianos, y es de suma importancia la relación (PK/PD)<sup>1</sup>. Con base en la relación PK/PD se ha dividido a los antibacterianos en: 1) dependientes de la estancia (tiempo dependiente), y 2) los dependientes de la concentración<sup>1</sup>. En otras palabras, para lograr una eficacia clínica óptima, respecto a los primeros, se requiere lograr concentraciones plasmáticas del medicamento 2 a 4 veces por arriba de la concentración mínima inhibitoria (CMI) o a ese nivel pero de preferencia durante todo el intervalo de dosificación.



En contraste los antimicrobianos dependientes de la concentración alcanzan su máxima eficacia clínica cuando las concentraciones pico o  $C_{max}$  son por lo menos de 8 a 10 veces el valor de CMI para los aminoglicósidos, y de 10 a 12 veces para las fluoroquinolonas <sup>1</sup>.

En el caso de las fluoroquinolonas, adicionalmente se ha asignado que la relación del área bajo la curva (AUC), dividido entre la CMI del patógeno en cuestión, debe generar un factor superior o igual a 125 ( $AUC/CMI \geq 125$ ) <sup>2</sup>.

## **Bioequivalencias**

El médico veterinario enfrenta día con día la necesidad de sustituir medicamentos originales por medicamentos genéricos intercambiables o genéricos, sin embargo, en el área veterinaria se carecen de medicamentos genéricos intercambiables. A efectos de llevar a cabo la sustitución correcta se precisa disponer de la evidencia científica que le permita el conocer el desempeño farmacocinético y especialmente, la biodisponibilidad de este medicamento sustitutivo lo que requiere de los estudios sobre la bioequivalencia para dar respuesta mas adecuada y aportar la evidencia respecto a la sustitución mas adecuada.

La premisa de la cual se parte es demostrar que el principio activo del medicamento genérico tiene el mismo desempeño farmacocinético que el original, y de esta manera se considera como intercambiable y mediante la evidencia de la eficacia clínica<sup>9</sup>.

Es pertinente en este momento decir que “dos medicamentos son equivalentes farmacéuticos si contienen él o los mismos principios activos en semejante forma farmacéutica para la misma vía de administración y cumplen con los requisitos establecidos en la farmacopea (identidad, potencia, pureza, uniformidad del contenido, velocidad de disolución, etc.)”. Dos productos son equivalentes biológicos o bioequivalentes cuando la diferencia entre la magnitud y la velocidad de absorción (biodisponibilidad) del principio activo en ambos productos no es estadísticamente significativa en una misma matriz biológica. Dado lo anterior se puede decir que una equivalencia químico-farmacéutica no implica necesariamente una bioequivalencia, pero un bioequivalente si implica equivalencia química<sup>9</sup>.

Al realizar estudios de bioequivalencias se busca que la biodisponibilidad de él o los productos evaluados no difieran en más de un 20% con respecto al de referencia. Se ha evaluado que una tolerancia con este porcentaje carece de consecuencias clínicas relevantes en un tratamiento farmacológico, el sobrepasar estos límites en mayor o menor grado representa diferencias clínicamente relevantes en la intensidad del efecto terapéutico, o en efectos colaterales.

Los principales parámetros de biodisponibilidad evaluados para definir la existencia o falta de bioequivalencias son el área bajo la curva (AUC), concentración máxima ( $C_{MAX}$ ), (se han propuesto reemplazarla por  $C_{MAX}/AUC$ ), y la vida media de eliminación ( $T_{1/2}$ ), como valores de cuantificación de la cantidad y velocidad de absorción y eliminación del fármaco.<sup>1</sup> En el cuadro 2 se muestran los criterios aceptados por diversos países para determinar bioequivalencias en las formulaciones<sup>9</sup>. La FDA asigna límites de confiabilidad del 90% en bioequivalencia cuando los valores para el AUC y  $C_{MAX}$  con respecto al producto de referencia se encuentra en un 80 a 125%, con lo cual acepta una variación del 20 a 25%<sup>10</sup>. (Véase cuadro 2)

## **Resistencias bacterianas**

Las resistencias bacterianas son un grave problema tanto en salud pública como en medicina veterinaria, lo que hace que principios activos de alta efectividad se vuelvan totalmente inútiles clínicamente. Cada familia de antibacterianos y aún más, dentro de cada familia bacteriana las bacterias generan resistencias a diversas velocidades y por varios mecanismos, como panorama general se menciona que los principales mecanismos por los cuales se desarrollan resistencias a las quinolonas y fluoroquinolonas son:

- a. Alteración en las enzimas blanco, al modificarse alguno de los aminoácidos que conforman a dichas enzimas disminuye la actividad de la fluoroquinolona.
- b. Existen diferentes potencias en unión y especificidad a la ADN girasa y Topoisomerasa IV, se ha encontrado que la ADN girasa es el principal sitio de acción en bacterias Gram negativas y la Topoisomerasa IV para las Gram positivas
- c. Por alteraciones en el acceso a las fluoroquinolonas a sus sitios blanco, recientemente se han identificado una gran variedad de sistemas de eflujo\* mediante bombas especializadas ubicadas principalmente en la membrana y con alcance desde el citoplasma. Estas bombas pueden sacar determinado antibiótico de la bacteria y algunas denominadas como bombas de resistencias multifármacos (MDR, *multidrug resistance pumps*) pueden sacar varios antibióticos simultáneamente<sup>11</sup>.

\*Anglicismo derivado de "Efflux" termino que se refiere a la propiedad de las bacterias de expulsar activamente una sustancia desde el citosol hacia el exterior.

En particular para las fluoroquinolonas el desarrollo de resistencias bacterianas puede estar dado por alteraciones espontáneas poco frecuentes en genes ya existentes (mutación) principalmente por errores de la polimerasa durante la replicación del DNA. Se considera que esto se da aproximadamente en una de cada millón de bacterias y dentro de estas son pocas las que son específicas de resistencia a fluoroquinolonas. Se sabe que la resistencia a las quinolonas es más rápida que a las fluoroquinolonas. De manera natural la resistencia a las fluoroquinolonas de tercera generación tiene una frecuencia de mutación inferior a  $1 \times 10^{-9}$ . Estas mutaciones, a veces denominadas ligeras, son suficientes para mantener la infección en fluidos y tejidos de individuos que recibieron dosis convencionales de fluoroquinolonas <sup>12</sup>.

### **Modificaciones estratégicas de los fármacos**

El estudio de los sistemas de transporte de fármacos a través de membranas y el diseño de vehículos que modifiquen su liberación a partir del sitio de administración están destinados a jugar un papel importante en la generación de nuevas formulaciones. Teóricamente se podrán desarrollar moléculas acopladas a transportadores o mejorar las ya existentes con vehículos estratégicos que favorezcan transportadores específicos de ingreso o evitar que sean expulsados por las bombas de eflujo\*, con lo cual se lograría mejorar la biodisponibilidad de todos ellos<sup>13</sup>.

El principio básico de los fármacos con liberación modificada es proporcionar concentraciones constantes de un componente en el organismo, llevarlo directamente al sitio de acción y que su actividad farmacéutica sea adecuada para mejorar la efectividad de su acción. 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<sup>13</sup>. Actualmente existen técnicas que permiten modificar y controlar la liberación de principios activos por cualquier vía de administración; oral, transdérmica y subcutánea son las que mediante modificaciones han alcanzado mayores éxitos terapéuticos<sup>13</sup>. Para lograrlo se lleva la sustancia activa al sitio de acción modificando su bio-distribución mediante partículas de sustancia activa entrampadas en transportadores como nanoesferas, nanocapsulas, nanopáticas o liposomas<sup>14</sup>.

La necesidad de encapsulación surge de la inestabilidad de muchos principios activos 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 principios activos es la pobre solubilidad de algunos principios activos en medios orgánicos. La encapsulación del activo se diseña con acarreadores o transportadores para protegerlo de condiciones hostiles como el pH, temperatura, entre otros.

. Adicionalmente en muchos casos la absorción puede ser mejorada y los efectos terapéuticos en el sitio de acción pueden ser superiores<sup>14</sup>.

Por el momento se encuentra en auge el rediseño farmacéutico de moléculas que han existido en el mercado por muchos años, se han generado nuevas formulaciones que permiten una liberación controlada o sostenida mediante la manipulación de los vehículos. De la misma manera, la industria farmacéutica de la salud animal es pionera en la aplicación de tecnología de fármacos de liberación, ingeniería y biotecnología para el desarrollo de productos. La necesidad de nueva tecnología de medicamentos de liberación para la salud animal está guiada por siete factores importantes<sup>14</sup>:

- Mejorar la farmacocinética/farmacodinamia de los antibacterianos ya existentes
- Aumentar la vida útil de los principios activos
- Proporcionar diferenciación del producto
- Garantizar la actividad terapéutica del fármaco durante un tiempo específico
- Seguridad del animal
- Evitar subdosificaciones
- Disminución del número de aplicaciones

Dentro de los diseños de nuevos preparados farmacéuticos como sistemas de liberación de fármacos, las nanopartículas están siendo las más utilizadas dado que al ser su tamaño tan pequeño supone menor problema inmunológico, buena biodegradabilidad, alto grado de encapsulamiento, además de que su facilidad para alcanzar ciertos órganos y tejidos se ve incrementada<sup>15</sup>.

Las nanopartículas son partículas coloidales en el rango de tamaños entre 10 y 1000 nm, están hechas de material macromolecular, preferentemente biodegradable en el cual el fármaco está disuelto, atrapado o encapsulado y puede ser adsorbido o unido. La elección del polímero, tamaño y método de preparación dependerá de la bioaceptabilidad del mismo, las propiedades fisicoquímicas del fármaco, del polímero y de la meta terapéutica<sup>16</sup>.

Para que el sistema de liberación sea efectivo es necesario que sea capaz de encapsular el fármaco de manera eficiente. Esto dependerá directamente de la solubilidad del fármaco en el lípido, de la naturaleza química y estructura y de el polimorfismo del lípido: ante la posibilidad de diferentes modos de cristalización, se encuentra que el lípido cristaliza diferente en el seno de la disolución, que en el proceso de manufactura de nanopartículas y por ende, durante la producción de SLN (sistemas de liberación nanoparticulados) el fármaco puede ser expulsado del seno lipídico para formar una red cristalina más perfecta<sup>16</sup>.



Una vez formado el sistema de liberación, éste debe ser capaz de liberar el fármaco de manera controlada. La liberación va a depender del tamaño de partícula, la matriz lipídica, concentración de tensoactivo y los parámetros de proceso<sup>16</sup>.

## **Justificación**

Con base en lo expuesto y dado que la enrofloxacin tiene una biodisponibilidad oral aproximadamente del 60% en gatos y perros, existe la posibilidad de optimizar la absorción al menos en un 40%.

En aves se ha logrado incrementar su biodisponibilidad mediante la adición de la *capsaicina*<sup>5</sup> o mediante la adición estratégica (previa dosificación del antibacteriano) de calcio<sup>6</sup>. Esto permite inferir que mediante el manejo de promotores de biodisponibilidad o de vehículos que modifiquen su liberación, es posible mejorar la biodisponibilidad de la enrofloxacin por diferentes vías de administración en perros, si se considera que es un fármaco concentración dependiente, esto mejoraría su actividad terapéutica, amén de disminuir el surgimiento de resistencias bacterianas. En la actualidad el mal uso ha dado paso a la aparición de cepas resistentes que ha generado disminución de la eficacia clínica. Así mismo se ha demostrado en México, como en gran parte del mundo, la ausencia de bioequivalencia (BE) de la enrofloxacin en diversas especies pecuarias<sup>7</sup>.

Considerando que una dosificación inadecuada ya sea por falta de bioequivalencias (preparados de mala calidad) o un mal uso terapéutico (malos regímenes de dosificación o subdosificación) generan fallas en la actividad clínica de los productos, por tanto se propone el diseño de un preparado estratégico en nanopartículas que cubra los requerimientos PK/PD de enrofloxacin capaz de lograr valores genéricos o superiores a los que presenta la enrofloxacin de referencia de Bayer (Baytril®, Bayer México)<sup>17</sup>.

## **HIPOTESIS**

Los valores de biodisponibilidad y el valor de  $C_{max}$  logrados por la enrofloxacina-nanopartículas (E-n) serán iguales o superiores a los obtenidos con la enrofloxacina base del preparado de referencia en perros después de su administración por vía oral.

## **OBJETIVO**

Evaluación de un preparado nanoparticulado para dosificación en perros que logre concentraciones plasmáticas y área bajo la curva superior a las del producto de referencia en un estudio de bioequivalencias.

## **MATERIAL, MATERIAL BIOLÓGICO Y MÉTODOS**

Se utilizaron un total de 50 perros divididos aleatoriamente en 3 grupos; 20 perros para el grupo 1 y 2 respectivamente y 10 perros para el grupo 3. Los perros que se utilizaron en el estudio son los mismos que se emplearon en el desarrollo de las prácticas de Cirugía 1 durante el transcurso del semestre 2009-2 (proporcionados por la FMVZ, UNAM) y fueron alojados en la Sección de Enseñanza Quirúrgica del Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies de la FMVZ-UNAM. Se les practicó un examen clínico completo en la sala de preparación de los quirófanos de enseñanza, se les tomaron muestras de sangre para realizar un hemograma y perfil bioquímico completo descartando así procesos infecciosos por la presencia de leucocitosis o linfopenia, asimismo, insuficiencia hepática y renal. Se excluyeron aquellos animales enfermos clínica y subclínicamente. A todos los perros se les desparasitó con prazicuantel, pirantel y febantel (Dontral Bayer®) y permanecieron en jaulas individuales de aislamiento de la citada sección con alimento Premium de Hills (Science Diet) y cuidados en su higiene y bienestar apegados a los lineamientos y especificaciones para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999<sup>18</sup>. Cabe mencionar que se les proporcionó un periodo de adaptación de 5 días.

Los animales se conformaron en 3 grupos de la siguiente manera:

G1. Enrofloxacin oral Baytril®. (20 perros). La dosis se ajusto rebajando la tableta hasta obtener la relación perro-dosis lo más exacta posible.

G2. Enrofloxacin experimental oral (e-n). (20 perros). Las cápsulas se prepararon sobre el peso correspondiente a una dosis de 10 mg/kg.

G3. Enrofloxacin EV (Baytril®). (10 perros). - La dosis se administró exacta al peso por vía endovenosa.

Todos los animales fueron dosificados a razón de 10 mg/kg de enrofloxacin.

En algunos casos se administró el medicamento a los animales el día previo a la práctica de cirugía, en el cuadro 3 se refieren las dosificaciones y el tiempo correspondiente de toma de muestras. El día de la práctica de cirugía los perros se tranquilizaron con acepromacina a dosis de 0.1mg/kg por la vía intramuscular, una vez obtenido el efecto del tranquilizante, se les aplicó meloxicam a una dosis de 0.2 mg/kg por la vía subcutánea como protocolo preanestésico. A los animales del grupo 3 se les administró el medicamento a través de la vena cefálica previa canalización con catéter endovenoso calibre 20 a 22 (Becton Dickinson) este mismo cateterismo sirvió para la administración de la anestesia de inducción.

La anestesia inyectable de inducción se realizó con propofol a dosis de 6mg/kg, que permitió poder realizar el sondeo vía endotraqueal y la sujeción del paciente a la mesa de cirugía. El mantenimiento de la anestesia se realizó a través de un sistema de circuito cerrado para la administración de un anestésico volátil como es el isoflurano a una concentración inicial de 5% y 3% para mantenimiento (anestesia inhalada) hasta obtener el plano anestésico en la etapa y plano quirúrgicos. Acto seguido, se procedió a colocar un catéter heparinizado (10 UI) en la vena cefálica del otro miembro torácico de 10 cm de longitud, calibre 20 a 22 (Becton Dickinson) lo que permitió facilitar la obtención de las muestras.

El muestreo fue realizado en los tres grupos durante el tiempo que el animal permaneció anestesiado, esto tuvo una duración aproximada de cuatro horas que es el tiempo requerido para la realización de la práctica de cirugía I. Cabe señalar que los estudiantes concluyeron la práctica apegados a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999<sup>18</sup>, por lo que realizaron la eutanasia mediante la aplicación de una sobredosis anestésica con pentobarbital sódico.

Los tiempos de sangrado propuestos para los tres grupos fueron de: 0.16, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 horas. El muestreo se llevó a cabo dependiendo del tiempo de dosificación, ya que la variable a considerar es el tiempo de sangrado posterior a la dosificación del fármaco.

Este tiempo se ajustó a las clases de cirugía I. Los animales que se dosificaron en la noche o en la madrugada no requirieron de cuidados posteriores ya que no se les realizó ningún manejo adicional (ver cuadro3) para tiempo de sangrado y dosificación). Se obtuvieron en cada muestreo 2 ml de sangre en Vacutainer con heparina. Se centrifugaron las muestras y se separó el plasma. Cada muestra se identificó y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis que fue realizado dentro de los primeros cinco días posteriores.

La determinación de enrofloxacin en cada muestra de plasma se llevó a cabo mediante un método microbiológico cualitativo / cuantitativo de difusión en agar, descrito por Bennet et al<sup>19</sup>.

### **Método de Bennet et al<sup>19</sup>.**

Se empleó agar MacConkey (Bioxon) preparado a razón de 50g/l., siguiendo las indicaciones que marca el producto.

### **Cultivo bacteriano**

Se utilizó una cepa bacteriana ATCC (*American Type Culture Collection*) 25922 de *Escherichia coli*.

## **Estándar bacteriano**

En un tubo de tapón de rosca se colocaron 5 ml de agua destilada y una asada del cultivo bacteriano joven resembrado de *Escherichia coli*, 24 horas antes. Por medio de los estándares de Mc Farland<sup>2</sup> se realizaron los ajustes necesarios a la dilución hasta obtener una concentración al 0.5 de Mc Farland.

La turbidez al 0.5 de Mc Farland se obtuvo por medio de una espectrofotometría a una transmitancia del 60-65%, que corresponde a una concentración bacteriana de  $1 \times 10^{14}$ .

## **Preparación de las placas**

En un refractario tipo Pirex® de 21 x 20 cm estéril, se colocaron 300 ml de agar y se dejó enfriar durante 10 minutos. Una vez frío se colocaron 400 µl de la suspensión bacteriana por medio de un hisopo estéril se distribuyó homogéneamente sobre todo el agar.

## **Preparación de las diluciones**

Se pesó 20 g de estándar de enrofloxacin (98% de pureza), se colocó en un matraz y se aforó a 100 ml con agua desionizada (para su disolución fue necesario agregar 0.5 ml de una solución de 0.1 N de NaOH, previo a la adición del agua desionizada). Se marcaron 10 tubos de 5 ml (del 1 al 10) y uno de 15 mililitros con el número 0.



En el tubo marcado con el número 0 se colocaron 9 ml de agua desionizada y en los demás tubos se introdujo 1 ml en cada uno. Del matraz se tomo 1 ml y se agregó en el tubo 0, se homogeneizó y de este se tomo 1 ml y se agrego al tubo 1, se homogeneizó y se tomo 1 ml y se agrego al tubo 2 y así se continuó hasta completar los 10 tubos.

### **Lectura de la placa**

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

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

### **Procesamiento de los resultados**

Se obtuvieron medias y desviaciones estándar del diámetro de halo de inhibición de cada una de las diluciones. Posteriormente con ayuda de los programas Microcal Origin<sup>20</sup> y Excel<sup>21</sup>, se obtuvieron las gráficas correspondientes a los milímetros de halo de inhibición vs la concentración.

Enseguida se empleo el software farmacocinética de WinNonlin 5.1<sup>22</sup> para obtener las variables farmacocinéticas correspondientes. Los valores farmacocinéticos obtenidos en los tres grupos fueron evaluados por el programa JMP®<sup>23</sup>.

## RESULTADOS

El límite de detección del método microbiológico fue de 0.02 µg/mL y el límite de cuantificación de 0.05 µg/mL.

En la figura 3 y cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos para la enrofloxacin nanoparticulada utilizada y el comparativo con el producto original de referencia.

En el cuadro 5 se presentan el cuadro de bioequivalencia entre los dos preparados (valores farmacocinéticos).

## DISCUSION

Dada la importancia que tiene el que los clínicos veterinarios dispongan de productos farmacéuticos que brinden una efectividad terapéutica en base a sus propiedades PK/PD, es importante llevar a cabo estudios de bioequivalencia para preparados que tengan la necesidad de cubrir rangos farmacocinéticos precisos; en este caso  $C_{max}$  y  $AUC /CMI^1$ .

Los datos cinéticos de este ensayo difieren sustancialmente entre la e-n y la e-r, considerando que la e-n no es bioequivalente a la e-r. No obstante cabe destacar que la relación de  $AUC/CMI$  para la enrofloxacin, considerando una *E. coli* medianamente sensible de  $0.1 \mu\text{g/mL}$ , es de 549 y solo se requieren 125 para tener un efecto ideal, lo cual hace 4.4 veces mas potente a la e-n, amen de actuar sobre bacterias que serían resistentes a la e-r. Para bacterias de menos sensibilidad a la enrofloxacin, como un *Staphylococcus aureus* medianamente sensible ( $0.4 \mu\text{g/mL}$ ), esta relación aún será útil: 137. Por tanto, los resultados sugieren que se cuenta con un preparado excepcionalmente potente gracias a la adición de los promotores de la biodisponibilidad. (Cuadro 6).

Es claro que el preparado no resultó ser bioequivalente, pero presenta una potencia antibacteriana mayor, lo cual le confiere una actividad clínica superior al producto original, además de presentar actividad antibacteriana durante 48 horas y el producto original únicamente lo ejerce durante 12 horas. Esto hace más eficiente al preparado experimental evaluado, así que se podría inferir que se cuenta con un preparado de enrofloxacin de cualidades farmacocinéticas excepcionales y que por lo mismo brindará eficacia clínica notable

Las fluoroquinolonas en general tienen una absorción oral en animales de regular a buena (con la excepción de los rumiantes y probablemente de los equinos) 60% en aves y 75% en perros y una absorción parenteral buena (mayor al 80%). No obstante estas cifras dejan lugar para mejorar esta variable. Las vidas medias de eliminación fluctúan entre especies pero en general son de 3 horas hasta 10 horas y se distribuyen bien a diversos tejidos con valores de volumen de distribución área de 2 a 4 L/kg, dependiendo la especie<sup>24</sup>.

Vancutsem et al.<sup>25</sup> informaron que el tiempo de aparición del pico de concentración plasmática (Tmax) de enrofloxacin administrada en forma oral a caballos, perros, pavos, pollos y terneros fue de 0,5; 0,9; 1,4; 2,5 y 5,4 horas, respectivamente y los valores de Cmax en la estas especies a dosis de 10 mg/kg alcanzan cifras que fluctúan entre 2.5 y 4 µg/mL, pero no más, en este trabajo se logró obtener concentraciones plasmáticas de 10.84±0.29 las cuales se ajustan a la relación PK/PD de un fármaco concentración dependiente como lo es la enrofloxacin de forma ideal, sin llegar a ser una concentración tóxica. Scheer<sup>26</sup> encontró que la enrofloxacin es fácil y rápidamente absorbida luego de la administración parenteral en terneros, cerdos, perros, gatos, pollos y pavos, alcanzándose concentraciones máximas dentro de las 0.5 a 2 horas y nuevamente los valores de Cmax fluctúan alrededor de 3 µg/mL.

Hace ya más de dos décadas que la comunidad científica internacional no ha logrado generar una idea de un antimicrobiano que satisfaga los estándares de organismos regulatorios de países líderes de opinión. Esto ha dado lugar a que no se haya permitido introducir un nuevo antibacteriano para uso en medicina veterinaria en dicho tiempo<sup>1</sup>. Aunque cada vez es más difícil generar nuevas opciones antibacterianas, siguen generándose ideas y nuevos enfoques para tratar las enfermedades bacterianas; sin embargo, el costo y el riesgo financiero implícitos en satisfacer todas las demandas de organismos como la FDA o la Comunidad Europea, hacen poco probable que en el corto plazo se tengan nuevas opciones antibacterianas disponibles para el clínico.

Entonces, resulta necesario hacer un uso óptimo de los recursos antibacterianos hasta ahora disponibles<sup>2</sup>. En el área veterinaria de pequeñas especies se han tomado pasos para formalizar el conocimiento sobre el uso de antibacterianos, tanto a nivel internacional como en Latinoamérica<sup>3</sup>. Sin embargo, es sabido que se abusa del uso de estos agentes en Latinoamérica y que a menudo se cuestiona la calidad y no se evalúa bioequivalencia de los genéricos. Las consecuencias predecibles y observadas son el aumento de las resistencias bacterianas y la reducción en la eficacia clínica. Un enfoque que contribuiría a mejorar las concentraciones plasmáticas y por ende la actividad antibacteriana y por ello la respuesta clínica es la utilización de promotores para la absorción de los antibacterianos usados a la fecha.

En este trabajo se han presentado los primeros resultados de investigaciones realizados en perros de la promoción de la absorción de enrofloxacin en perros. Los resultados son alentadores y pueden, desde ya, aplicarse para mejorar la respuesta clínica. Pero quizá más importante que lo anterior, es el hecho, de que el uso de los promotores de la absorción o vehículos de liberación modificada pueden mejorar múltiples presentaciones farmacéuticas de antimicrobianos para ésta y otras especies, tanto para aplicación oral como por otras vías pues parte de estos fenómenos se repiten a otros niveles. Esto abre, un amplio campo de investigación aplicada y el potencial de contar con formulaciones de antimicrobianos con farmacocinéticas mejoradas.

Si la industria farmacéutica veterinaria mexicana, adopta la promoción de la absorción de antimicrobianos como una oportunidad esta acción será indudablemente motor de la evaluación de bioequivalencia entre productos genéricos, dando lugar a una competencia por la calidad a través del diseño inteligente de presentación farmacéutica de antimicrobianos.

Los promotores utilizados en este ensayo no son únicamente un concepto teórico, sino que fueron elegidos con base en su disponibilidad comercial, costo y virtualmente nula toxicidad. No obstante, el campo a explorar en la promoción de la absorción de promotores es muy amplio y puede ser una gran oportunidad para el progreso de la industria farmacéutica veterinaria.



## REFERENCIAS

- 1.-Sumano LH, Ocampo CL. Farmacología Veterinaria. 3era ed. México DF: Mc Graw-Hill Interamericana, 2006.
- 2.-Mckellar QA, Clinical relevance of the pharmacologic properties of fluorquinolones. Suppl Compend Contin Educ Pract Vet 1996; 18 (2): 14-21.
- 3.-Otero JL, Mestorino N, Erreclade JO, Enrofloxacin una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria Parte II. Farmacocinética Veterinaria. Analecta Vet 2001; 21 (1):42-49.
- 4.-Shlosberg A, Ershov E, Bellaiche M, Hanji V, Weisman Y, Soback S. The inhibitory effects of the fluorquinolone antimicrobials norfloxacin and enrofloxacin on hepatic microsomal cytochrome P-450 monooxygenases in broiler chickens. Drug Metabol Drug Interac 1997; 14 (2):109-122.
- 5.-Heinen E. Comparative serum pharmacokinetics of the fluoroquinolones enrofloxacin, difloxacin, marbofloxacin and orbifloxacin in dogs after single oral administration. Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics 2002; 25:1-5.
6. - K. L. Kung, J.-L. Riond and M. Wanner, Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite, ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 1993; 16: 462–468.
7. - American Journal of Veterinary Research 1998 (Dec); 59(12):1599-604.
- 8.-Prescott J. Quinolones and fluoroquinolones. In Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 3rd ed. Iowa State University Press: Ames, 2000.
- 9.-Sumano LH, Ocampo CL, Gutiérrez OL. Bioequivalence of 9 trademarks of enrofloxacin and Baytril® in cows. Dtsch Tierarzt Wochenschrift 2001; 108: 311-314.

- 10.- Biodisponibilidad y Bioequivalencia Implicaciones Clínicas. 2004; 2(10):247-459. Available from: URL:<http://www.abcmedicus.com/articulo/medicos/id/272/>
11. - Piddock LJV. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones. *Drugs* 1995; 49 (Supl 2): 29-35.
12. - Hooper, DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases (Suppl)* 2000; 2: S24–8.
- 13.-Cox SK, Cottrell MB, Smith L, Papich MG, Frazier DL, Bartges J. Allometric analysis of ciprofloxacin and enrofloxacin pharmacokinetics across species. *Journal of Veterinary Pharmacological and therapeutics* 2004; 27: 139-146
- 14.-Sumano LH, Negrón G, Fernández G. Consideraciones prácticas y farmacológicas para medicación de antibacterianos en avicultura. *Revista Científica. Fac. de Ciencias Vet. Universidad de Zulia*. 2000; X (3):251-266.
- 15.-Ahmed I, Kasraian Ka. Pharmaceutical Challenges in veterinary product development. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (2002) 871-882.
- 16.-Quintana RM, et al. Nanopartículas principios y aplicaciones. *Revista ciencia y desarrollo*.2008; 34(221): 62-67.
- 17.-Altreuther P. Data on chemistry and toxicology of Baytril. *Veterinary Medicine Reviews* 1998; 2: 87-89.
18. - Aline SA. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gaceta Médica Mexicana* 2002; 138:295-298.
- 19.- Bennet JB, Brodie J, Benner E, Kirby W. Simplified accurate method for antibiotic assay. *Clinical Specimens. American Society for Microbiology* 1996; 14: 170-177.
20. - Microcal Origin version 4.0 Scientific and Technical Graphics in Windows. Microcal Software Inc.
21. - Microsoft Excel. 1985-97.
- 22.- WinNonlin Professional versión 5.1 ( Cía. de Pharsight CA, EE.UU.)
- 23.- [www.jmp.com/software/](http://www.jmp.com/software/)

24.-MCCRACKEN KJ, UNSWORTH EF, WYLIE ARG. Energy metabolism of farm animals. Department of Agricultural and Environmental Science. The Queen's University of Belfast, UK 1998; 464.

25.-Vancutsem PM, Babish JG. In vitro and in vivo study of the effects of enrofloxacin on hepatic cytochrome P-450. Potential for drug interactions. *Veterinary and Human Toxicology* 1996; 38 (4): 254-259.

26. - Scheer M. Concentrations of active ingredient in the serum and tissue after oral and parenteral of Baytril ®. *Veterinary Medicine Review*. 1987; 2:104-118.

## FIGURAS

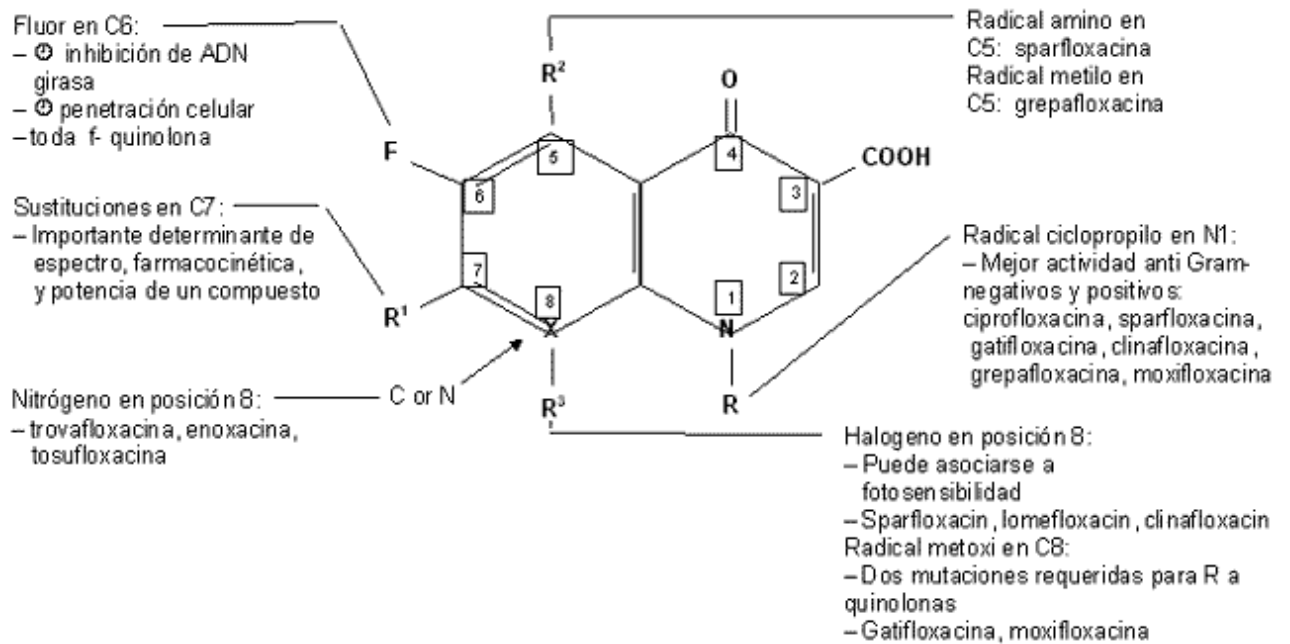


Figura 1. Núcleo básico de las quinolonas y fluoroquinolonas.

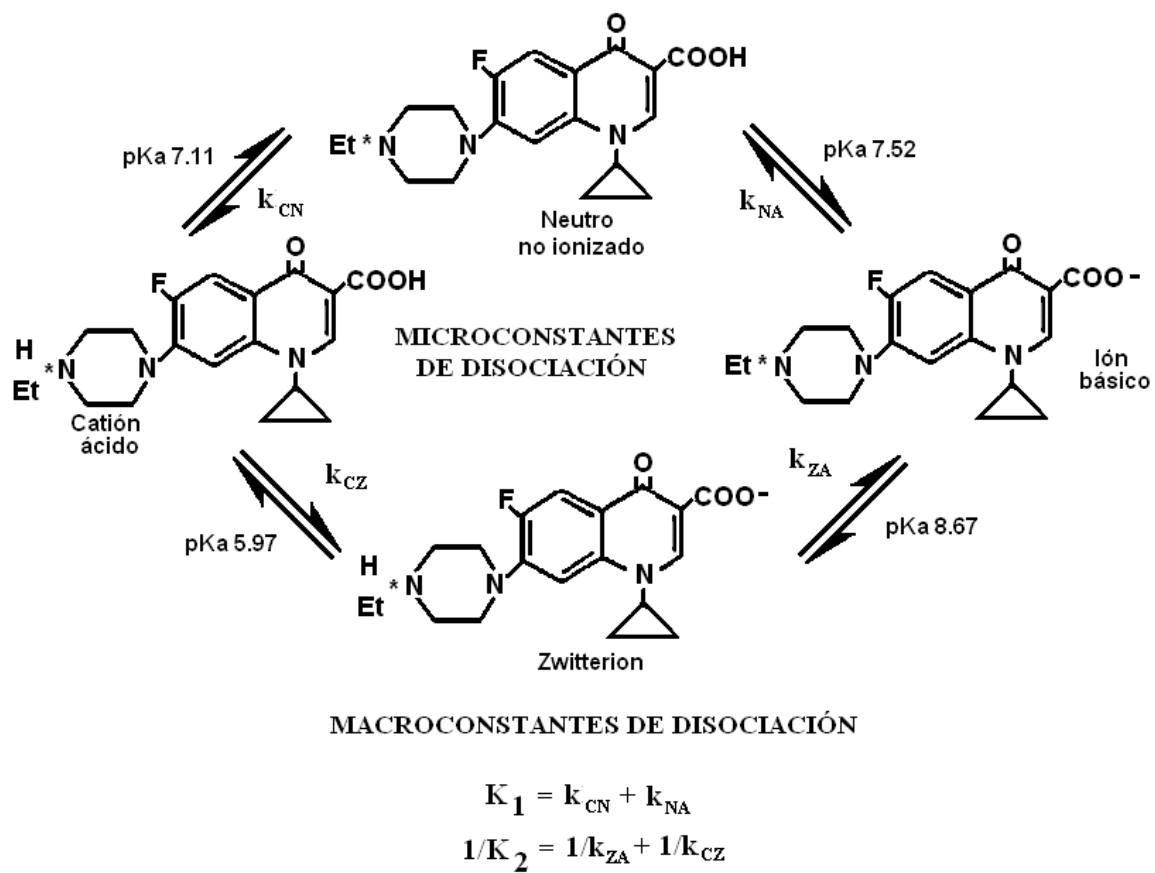


Figura 2. Esquema estructural de las 4 isoformas de la enrofloxacin.

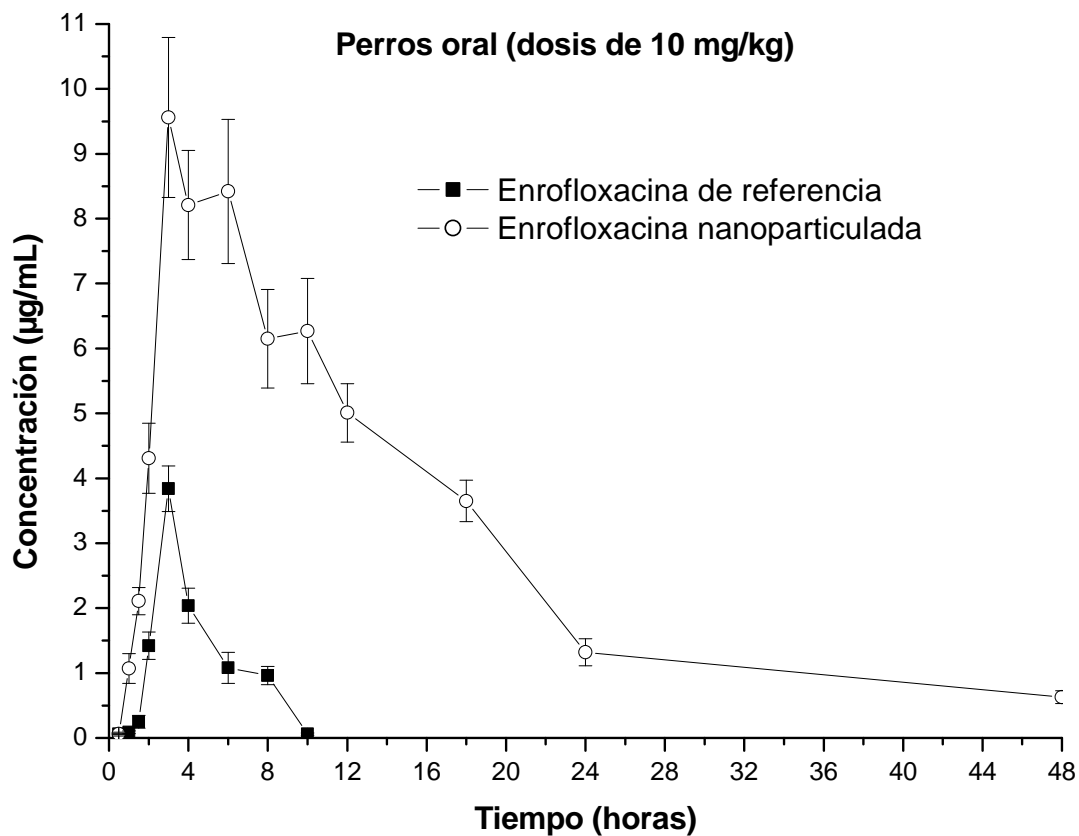


Figura 3. Perfiles séricos de enrofloxacina y metabolitos activos expresados como actividad-concentración en perros posterior a la administración oral de una dosis de 10 mg/kg en perros en ayuno de enrofloxacina de referencia y una enrofloxacina nanoparticulada

## CUADROS

	EV	PO
$K_{el}$ ( $h^{-1}$ )	$0.29 \pm 0.1$	$0.28 \pm 0.06$
$V_{d_{ss}}$ (l/kg)	$7.0 \pm 6.4$	-----
$Cl_s$ (ml/h·kg)	$27.1 \pm 16.2$	-----
AUC ( $\mu g \cdot h/mL$ )	$3.9 \pm 2.3$	$1.28 \pm 1.3$
$C_{max}$ ( $\mu g/mL$ )	-----	$1.15 \pm 0.6$
$T_{max}$ (h)	-----	$0.9 \pm 0.8$

Cuadro 1. Valores farmacocinéticos de enrofloxacin en perros posterior a la administración de 5 mg/kg vía oral y endovenosa<sup>6</sup>.

Evaluación	FDA	TPD	EMEA
Principales parámetros de evaluación	$C_{MAX}$ , $AUC_0$ , $AUC_{inf}$	$C_{MAX}$ , $AUC_0$	$C_{MAX}$ , $AUC_0$ , $AUC_{inf}$
$C_{MAX}$	Si, 80 - 125	Si, 80 - 125	Si, 80 – 120
Metabolitos	Como soporte cuando se forma durante/después del el proceso de absorción	No usualmente	Si, cuando el fármaco es un profármaco y el metabolito ayuda a mejorar su eficacia
Estado estable	No	Si, cuando los valores de $AUC_x/ AUC_{inf}$ son inferiores al 80%	Si, cuando la formulación es de liberación sostenida o transdermal
Efecto del alimento	Si, siempre y cuando el alimento afecte los niveles	Si, siempre y cuando el alimento afecte los niveles	Si, siempre y cuando el alimento afecte los niveles
Porcentaje mínimo de la AUC observada	Mayor al 88%	Mayor al 80%	Mayor al 80%

Cuadro 2. FDA = Estados Unidos de Norteamérica. (“Food and drug administration”); TPD = Canada. (“Therapeutic Products Directorate”); EMEA = Comunidad Económica Europea (“European Agency for the Evaluation of Medicinal Products”).



Tiempo de dosificación	Tiempo de sangrado
7 a.m. mismo día de la clase de cirugía	0.16, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 4 horas
2 a.m. mismo día de la clase de cirugía	5, 6 y 8 horas
8 p.m. día previo a la clase de cirugía	10 horas
7 p.m. día previo a la clase de cirugía	12 horas

Cuadro 3. Tiempos de dosificación y sangrado de los perros para los 3 grupos

Tiempo de muestreo	PO			
	e-r		e-n	
	prom	± DE	Prom	± DE
0.5	0.06	0.01	0.06	0.01
1	0.09	0.03	1.07	0.09
1.5	0.25	0.08	2.11	0.11
2	1.42	0.12	4.31	0.13
3	3.84	0.17	9.56	0.21
4	2.04	0.11	8.21	0.11
6	1.08	0.1	8.42	0.18
8	0.96	0.05	6.15	0.13
10	0.06	0.02	6.27	0.12
12	ND	ND	5.01	0.14
18	ND	ND	3.65	0.11
24	ND	ND	1.32	0.1
48	ND	ND	0.63	0.01

Cuadro 4. Perfiles séricos de concentración de enrofloxacin vs tiempo en perros después de la aplicación de la e-n y de la e-r, administradas vía SC y oral a dosis de 5 mg/kg. (ND= no detectado).

Constante farmacocinética	Enrofloxacinade referencia	Enrofloxacinanoparticulas
Cmax	2.36±0.6	10.84±0.29
Tmax	1.5±0.35	3.47±0.34
AUC	12.45±1.24	114.86±20.45
AUMC	20.83±2.32	312.45±15.36

Cuadro 5. Promedio ± 1 DE de los valores farmacocinéticos de e-r y e-n.

Constante farmacocinética	Rango de referencia	Obtenidos	Bioequivalencia
Cmax	1.89 - 2.83	10.27	No bioequivalente
AUC	9.96 - 14.94	114.86	No bioequivalente

Cuadro 6. Valores estadísticos del comportamiento de bioequivalencia de un preparado de enrofloxacin con promotores de la biodisponibilidad.