



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE PREPARADOS ALTERNOS DE ENROFLOXACINA PARA
OPTIMIZAR LA RELACIÓN FARMACOCINETICA/FARMACODINAMICA EN PERROS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSÉ AGUSTÍN MEDINA LÓPEZ

TUTOR: HECTÓR SALVADOR SUMANO LÓPEZ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS OCAMPO CAMBEROS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DR. ENRIQUE FLORES GASCA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DR. JUAN CARLOS VAZQUEZ CHAGOYAN

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

DRA. HEIDY ZOZAYA DOERING

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

México D.F.

Enero 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I.	Introducción.....	1
II.	Fluoroquinolonas.....	1
III.	Farmacocinética de la enrofloxacin en perros.....	7
IV.	Liberación modificada en formas farmacéuticas.....	9
V.	Polímeros biodegradables como sistemas de liberación modificada.....	11
VI.	Chitosan como sistema de liberación.....	12
VII.	Carbopol.....	15
VIII.	Poloxámero.....	17
IX.	Las ciclodextrinas como sistemas de liberación.....	20
X.	Justificación.....	22
XI.	Hipótesis.....	23
XII.	Objetivos.....	23
XIII.	Material y Métodos.....	24
XIV.	Flujograma.....	26
XV.	Elaboración de prototipos de enrofloxacin de liberación moderada.....	27
XVI.	Pruebas <i>in vivo</i> en animales de laboratorio (ratas).....	29
XVII.	Técnica analítica para determinación de enrofloxacin.....	30
XVIII.	Manejo de los datos analíticos para la obtención de variables farmacocinéticas.....	32
XIX.	Pruebas <i>in vivo</i> en perros.....	32
XX.	Técnica analítica para la determinación de enrofloxacin.....	33
XXI.	Manejo de datos analíticos para la obtención de variables farmacocinéticas.....	33
XXII.	Resultados.....	33
XXIII.	Curvas de recuperación de la enrofloxacin en suero de ratas y suero de perros.....	33
XXIV.	Resultados Experimentales.....	39
XXV.	Evaluación visual de estabilidad de prototipos	41
XXVI.	Resultados de las evaluaciones farmacocinéticas de prototipos en ratas y elección de las mejores opciones para su evaluación en perros.....	41
XXVII.	Resultado de la farmacocinética de enrofloxacin de referencia en perros.....	47
XXVIII.	Discusión.....	48

XXIX. Conclusiones.....	54
XXX. Referencias.....	55

DISEÑO Y EVALUACION DE PREPARADOS ALTERNOS DE ENROFLOXACINA PARA OPTIMIZAR LA RELACION FARMACOCINETICA/FARMACODINAMICA EN PERROS.

1.0 Introducción

Es evidente que en la terapia antibacteriana es de suma importancia el conocimiento del patógeno implicado y el sitio de infección. Con estos elementos se facilita la decisión terapéutica y se puede actuar a fin de prevenir reinfecciones. Un tercer factor a considerar es la correcta elección del antibacteriano. Ésta debe contemplar aspectos tales como su farmacocinética, toxicidad, intervalo de dosificación y obediencia potencial del dueño a seguir las instrucciones del médico. Adicionalmente se habrá de ponderar la posible resistencia bacteriana y el impacto de su uso en la salud pública. Así para hacer uso racional de antibacterianos, resulta esencial ponderar lo anterior e integrarlo con la relación farmacocinética-farmacodinamia (PK/PD) del principio activo. Con base en los valores de PK/PD se han dividido a los antibacterianos en: 1) dependientes de la estancia o tiempo dependientes (t-d), y 2) los dependientes de la concentración (c-d)¹. En otras palabras, para lograr una eficacia clínica óptima con los antibacterianos t-d se requiere lograr concentraciones plasmáticas del medicamento equivalentes o ligeramente superiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI), durante todo el intervalo de dosificación o el mayor tiempo posible. En contraste, los antimicrobianos c-d alcanzan su máxima eficacia clínica cuando las concentraciones pico o C_{max} son las más elevadas posible. Por ejemplo, para aminoglucosidos en el plasma el valor de C_{max} debe ser por lo menos 8 a 10 veces superior al valor de la CMI y de 10 a 12 veces para la enrofloxacin ($C_{max} > 10-12 \text{ CMI}$)¹. En el caso de las fluoroquinolonas, adicionalmente se ha asignado que la relación del área bajo la curva (AUC) de la concentración sérica vs tiempo, dividida entre la CMI del patógeno en cuestión, debe resultar en un factor superior o igual a 125 ($AUC/CMI \geq 125$)².

1.1 Fluoroquinolonas

En 1960, Leshner, puso a la disposición de la comunidad médica la primera quinolona antibacteriana, el ácido nalidíxico, medicamento que pronto encontró un lugar en la terapéutica de las vías urinarias.² Sin embargo, con el tiempo se encontró que generaba rápidamente resistencias bacterianas, lo que limitó su uso en medicina humana y en veterinaria, Es posible que dicha resistencia haya sido confundida, al menos en parte, con el paradójico comportamiento

que muestra, pues a dosis terapéuticas tiene efecto bactericida mientras que a dosis mayores pierde casi toda acción antibacteriana².

En 1981 se empezó a trabajar con las quinolonas de segunda generación, que contenían un átomo de flúor en la posición 6 del anillo quinolónico y que tienen farmacocinética de mayor distribución y tienen vida media de eliminación más prolongada, Adicionalmente, tienen un mayor espectro de acción ².

Las quinolonas tienen como núcleo común la estructura 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína (véase figura 1). El nitrógeno en posición 1 y el grupo carboxilado en posición 3 son indispensables para la actividad antibacteriana. Como se dijo, las fluoroquinolonas poseen un átomo de flúor en posición 6 y un anillo piperacina (norfloxacin, ciprofloxacino, enoxacino) o metilpiperacina (ofloxacino, pefloxacino, amifloxacino) en posición 7 o etil piperacina, como la enrofloxacina. Se diferencian entre sí por el radical en la posición N-1 del núcleo principal y por el radical unido al grupo piperacina o piperacínilo (véase figura 2)³.

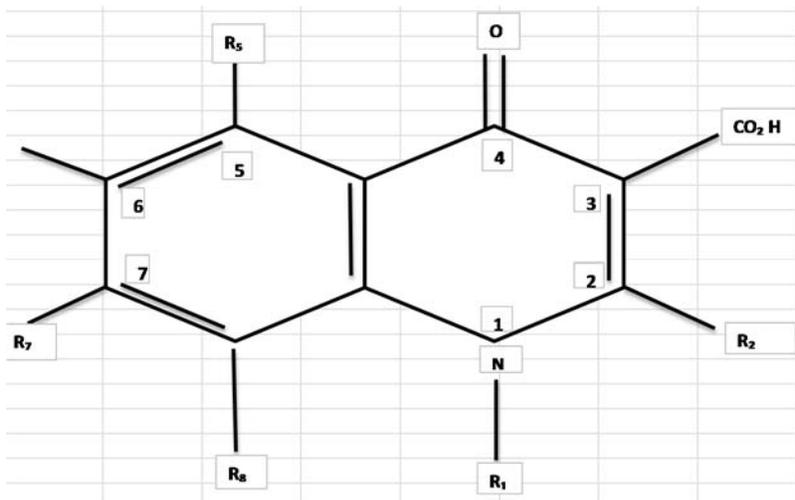


Figura 1 Núcleo común de las quinolonas

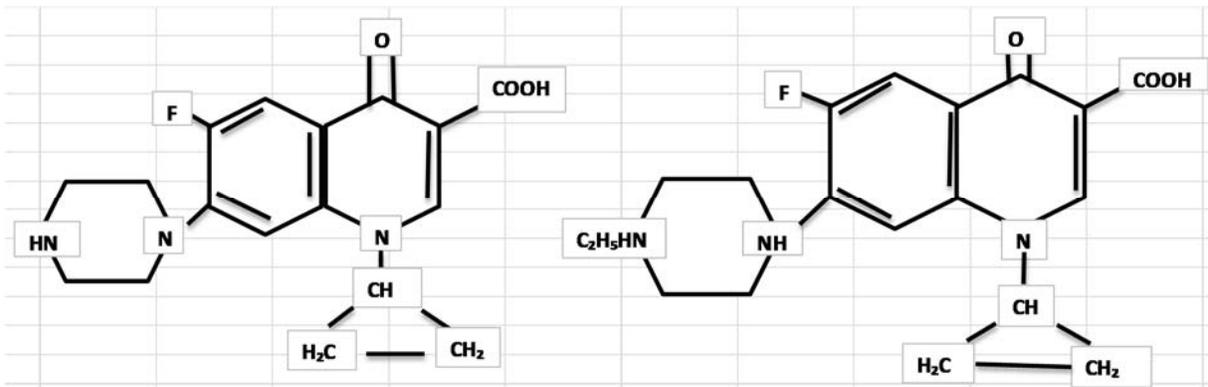


Figura 2 formula estructural de la ciprofloxacina y de la enrofloxacina

El inicio de la utilización de las quinolonas en medicina veterinaria data de la década de los 60's con la aparición del ácido nalidixico, el cual fue utilizado primero en becerros y posteriormente en aves. Hasta mediados de la década de los 70's se introduce a la medicina veterinaria la primer fluoroquinolona, la flumequina. Aunque la flumequina fue un antimicrobiano muy utilizado en la industria avícola, el medicamento que revolucionó la terapéutica de enfermedades bacterianas en esta especie fue y aún es la enrofloxacina.⁴

La enrofloxacina es uno de los antimicrobianos más potentes con los que cuenta el especialista en pequeñas especies, por lo que se les ha incluido en una gran variedad de esquemas terapéuticos debido a la sensibilidad que existe entre microorganismos (véase cuadro 1 y 2 y figura 3)^{4,35}

Cuadro 1. Sensibilidad a Enrofloxacina de los diferentes tipos de bacterias³⁵

Tipo de Bacteria	CMI (mg/ml)	Sensibilidad
Gram negativo	< 0.5	Muy sensibles
Gram positivo	< 2	Medianamente sensibles
Anaerobios obligados	> 4	Resistentes

Cuadro 2. CMI 50 y CMI 90 de los microorganismos sensibles a Enrofloxacina ³⁵

Microorganismo	CMI 50 (µg/ml)	CMI 90 (µg/ml)
<i>Staphilococcus intermedius</i>	0.25	1
<i>Streptococcus spp</i>	0.5	2
<i>Salmonella spp</i>	0.06	0.25
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0.5	1
<i>Proteus mirabilis</i>	0.125	0.5
<i>Pasteurella multocida</i>	0.125	0.5
<i>Klebsiella spp</i>	0.06	0.5
<i>Escherichia coli</i>	0.125	0.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.5	2
<i>Ehrilicha canis</i>	s/d	2
<i>Chlamydia psittaci</i>	s/d	1
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0.125	0.5
<i>Brucella canis</i>	0.06	0.25
Anaerobios obligados	1	16

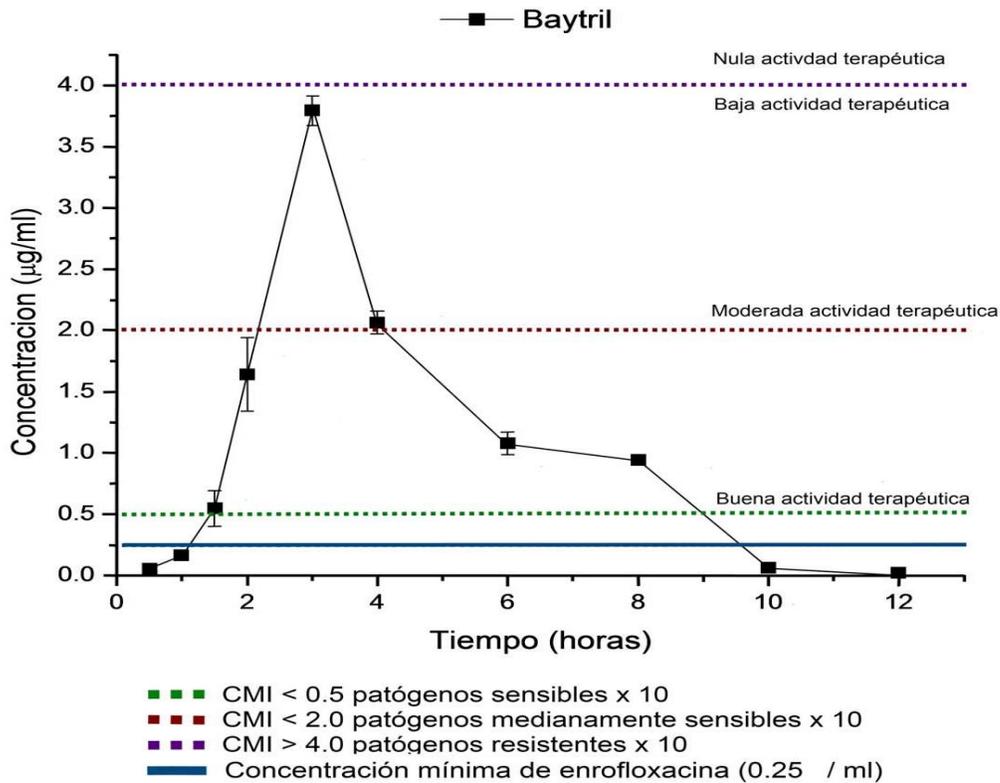


Figura 3. Curva de concentración V.S. tiempo de AUC/CMI

Así a partir de la década de los 80's se hace evidente el incremento en el uso de este agente antibacteriano. Las razones de su popularidad 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 2-3 veces el valor de la concentración mínima inhibitoria.²

La enrofloxacinina puede encontrarse en 4 formas: 1- catión ácido; 2- neutro no ionizado; 3- zwitterion intermedio y 4- ión básico, todos ellos dependiendo del pH al que se encuentren (figura 2). A pH's bajos tanto el grupo piperazinilo o como el carboxílico se encuentran protonados y a pH's altos ninguno de ellos se encuentra protonado. En solución, las especies catiónicas y aniónicas se acercan a la concentración total de enrofloxacinina en pH's altos o bajos, respectivamente, y las especies neutras logran su máxima concentración en pH's isoelectricos, y la mayor fracción de disociación corresponde al ácido carboxílico, después el amino y la menor proporción por las especies neutras. La máxima solubilidad para la enrofloxacinina 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 7.00, entonces cuando el pH del medio está cercano a la neutralidad se favorece el ingreso de enrofloxacinina a las bacterias en forma de zwitterion a través de canales de porinas hidrofílicas, mientras que al encontrarse en pH's ácidos se encuentra en forma ionizada y no puede entrar a la bacteria por difusión ni por los canales de porinas. En la figura 4 se plantea esquemáticamente esta relación ².

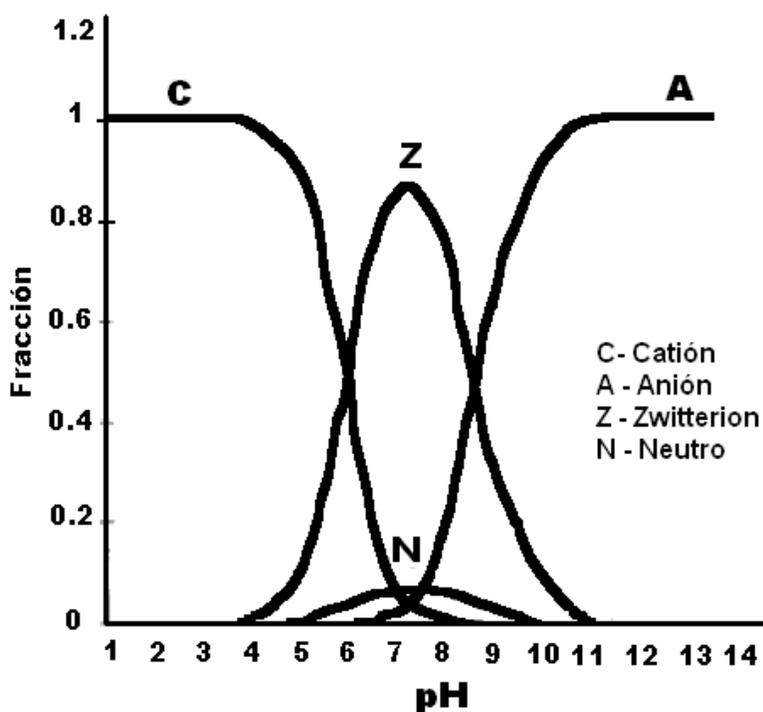


Figura 4 Distribución de las 4 formas en las cuales se puede encontrar la enrofloxacinina en función del pH.

En el cuadro 3 se presentan los valores de pK asociados con las microconstantes, macroconstantes y las fracciones de enrofloxacinina asociada en un pH isoelectrico.

<i>Microconstantes, macroconstantes y fracciones de enrofloxacin</i>	<i>pK</i>
pK ₁	5.94
pK ₂	8.70
pI = (pK ₁ + pK ₂)/2	7.32
pK _{CN}	7.11
pK _{CZ}	5.97
pK _{NA}	7.52
pK _{ZA}	8.67
[C]	0.0385
[A]	0.0385
[N]	0.9231
[N]	0.0620
[Z]	0.8611
[Z] / [Z]	13.86

Cuadro 3 valores de pk asociados a microconstantes y macroconstantes y las fracciones de enrofloxacin asociadas con un ph isoelectrico.

En general, las quinolonas y en especial las fluoroquinolonas denominadas de tercera generaci3n se inactivan poco en presencia de suero y otros fluidos org3nicos, actúan independientemente del tamaño del in3culo y pueden ejercer efecto antibacteriano a nivel intracelular ². Las fluoroquinolonas penetran y alcanzan concentraciones intracelulares muy elevadas tanto en las c3lulas fagoc3ticas como en las no fagoc3ticas. ²

Al igual que las dem3s fluoroquinolonas, la enrofloxacin actúa directamente sobre enzimas implicadas en la replicaci3n del ADN (topoisomerasa IV y ADN girasa o topoisomerasa II) que evitan que se reproduzca la bacteria y genera un bloqueo metab3lico. Adem3s, se forma un complejo que provoca una ruptura irreparable en el ADN de lo cual se deriva su gran poder bactericida. A diferencia de las quinolonas no fluoradas actúa tanto en la subunidad A como en la B de la topoisomerasa II. Esta caracter3stica le confiere una actividad a la cual las bacterias tienen menos mecanismos de resistencia ².

1.1.1 Farmacocin3tica de la enrofloxacin en perros

La enrofloxacin tiene una biodisponibilidad cercana al 80% por v3a oral y una buena penetraci3n a tejidos. Los estudios farmacocin3ticos con la dosis de 5 mg/kg/d3a han demostrado que las

concentraciones de enrofloxacin en el suero y en los tejidos se encuentran arriba de los CMI de la mayoría de los microorganismos Gram negativos, y Gram positivos, validando así su eficacia ³.

La enrofloxacin es parcialmente metabolizada en el hígado en otros metabolitos entre los que destaca la ciprofloxacina, fluoroquinolona utilizada ampliamente en humanos. La excreción renal es la mayor ruta de eliminación de la enrofloxacin y sus metabolitos, tanto por filtración como por excreción tubular. Algunos de sus metabolitos inactivos o con baja actividad son: I) congéneres de enrofloxacin 3-, 6-, y 8-hidroxiato, los cuales poseen una nula o muy baja actividad antibacteriana; II) congéneres 5, 6- (ó 6, 8-), 5, 8-, y 7, 8 - dihidroxiato, los cuales sufren una transformación autooxidativa; 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, el congéneres amino-7, y desetilen-enrofloxacin, que representan tanto la molécula de degradación como de eliminación del segmento piperazinilo ⁵. (Véase figura 4) No obstante, una parte de los metabolitos es la ciprofloxacina ⁷⁵, En los bovinos se ha postulado que la acción conjunta de enrofloxacin mas ciprofloxacina llegan a ser sinérgicos in vivo⁷⁵

La evaluación de la farmacocinética de enrofloxacin, después de inyección intravenosa de 10 mg/kg se ajusta idealmente a un modelo de dos compartimientos, en el que primero se distribuye en órganos muy perfundidos y sangre (fase de distribución rápida) y posteriormente se distribuye a tejidos de menor perfusión. Sus volúmenes aparentes de distribución son elevados. Por ejemplo el volumen aparente de distribución al estado estable (V_{dss})= 2.43 l/kg y (V_{dAUC})= el volumen aparente de distribución área bajo la curva de concentración plasmática, 2.7 l/kg, indican una eficiente distribución de enrofloxacin fuera del plasma. La vida media de eliminación ($T_{1/2\beta}$) observada en perros fluctúa entre 4.05 h y 10 horas ⁵, lo que garantiza concentraciones tisulares importantes, al menos por 24 horas. El porcentaje de transferencia de enrofloxacin del compartimento central al periférico ocurre, aparentemente, de manera tan rápida como en dirección inversa ($K_{12}=K_{21}$), lo que confirma su elevada capacidad de difusión y liposolubilidad ⁵.

Este 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. Se utilizaron un total de 21 perros divididos aleatoriamente en 3 grupos; 7 perros para cada grupo. Los perros que se utilizaron en el estudio son de propietarios que acudieron a clínicas particulares

de la zona de Xochimilco durante el transcurso de un año (2013) (se les mostró una carta con los procedimientos a realizar en sus mascotas) y se les mencionó que serían alojados en sus casas como habitualmente lo hacían. Se les practicó un examen clínico completo y se les tomó una muestra de sangre para realizar un hemograma y perfil bioquímico completo para descartar un proceso infeccioso o alguna diferencia de los valores basales por insuficiencia hepática o renal. Se excluyó a cualquier animal enfermo clínica o subclínicamente. A todos los perros se les desparasitó con prazicuantel, pirantel y febantel (Drontal Bayer®) y permanecieron en sus casas, fueron alimentados con (Hills Science Diet) y sus cuidados en su higiene y bienestar estuvieron apegados a los lineamientos y especificaciones para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.⁷⁰

1.3 Liberación modificada en formas farmacéuticas.

Las formas farmacéuticas de liberación modificada de fármacos (FFLM) son aquellas que no liberan sus componentes activos de manera inmediata, también son llamadas de liberación controlada o sostenida. Además se les considera como capaces de lograr pautas posológicas adecuadas al mejorar el perfil farmacocinético y a menudo reduciendo los efectos adversos; Estas son presentaciones en las que la liberación de la sustancia o sustancias activas es diferente a la de la forma farmacéutica de liberación convencional, administrada por la misma vía.

Existen diferentes métodos para conferirle propiedades de sistema de liberación sostenida a un preparado. Por ejemplo, los métodos fisiológicos que consisten en incorporar sustancias que regulen la absorción o eliminación, tal es el caso de añadir epinefrina para inducir vasoconstricción y reducir la absorción de lidocaína y con ello mejorar la anestesia local

Métodos Químicos: que retrasan la absorción transformando el activo en un producto menos soluble por ejemplo añadir procaína a la molécula básica de bencilpenicilina

Métodos Tecnológicos: que intervienen en la forma farmacéutica, incluyendo excipientes que disminuyan la velocidad de absorción o por el contrario que contiene promotores de la absorción

6.

A las FFLM se les subdivide en:

Sistemas de liberación acelerada; por ejemplo: formas orales liofilizadas o formas farmacéuticas con promotores de la absorción.

Sistemas de liberación diferida: sistemas de cubierta entérica gastrorresistente y de liberación pulsátil o secuencial.

Sistemas de liberación prolongada como los comprimidos y parches matriciales.

En el cuadro 3 se presenta una relación de algunos activos a los que se les ha incluido en diversas formas farmacéuticas de liberación modificada.

Cuadro 4. CARACTERISTICAS PRINCIPALES Y EJEMPLOS DE LAS FORMAS FARMACEUTICAS DE LIBERACION MODIFICADA.

Tipo de sistema FFLM	CARACTERISTICAS PRINCIPALES	EJEMPLO DEL MEDICAMENTO COMERCIALIZADO
Sistemas de liberación acelerada	Disolución rápida del fármaco sin necesidad de administración de líquidos. No se prolonga el efecto terapéutico.	Efferalgan Odis® (comprimidos bucodispersables de paracetamol). Zofran Zydys® (ondansetron) Enrofloxacin + capsaicina ⁷⁶
Sistemas de liberación Diferida	Retardadas: diseñadas para salvar el pH gástrico o para evitar gastrolesividad del fármaco. No prolongan el efecto terapéutico. Pulsátil: liberación secuencial del medicamento.	<ul style="list-style-type: none"> • Omeprazol 20mg Belmac EFG (cápsulas duras gastrorresistentes). • Moxatag® (amoxicilina PULSYS®, sistema pulsátil)⁷⁶. Amoxicilina-clavulanato de potasio.
Sistemas de liberación prolongada	Diseñados para prolongar la concentración plasmática (Cp) del fármaco o para mejorar las características farmacocinéticas del medicamento.	Adalat Oros®, Adalat retard® (nifedipino). <ul style="list-style-type: none"> • MST Continus® (morfina). • Omnic OCAS® (tamsulosina). Tilmicosina, Doxiciclina
Sistemas flotantes	Diseñados para aumentar el período de residencia gástrico.	Madopar® Retard (levodopa + benserazida). Amoxicilina + calvulanato de potasio

6.

1.3.1 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, y con ello la liberación del principio activo.⁷

Los polímeros biodegradables liberan al fármaco por 3 mecanismos diferentes. 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 días o 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 esta área son los poliorto-ésteres (POE) que se han incorporado y desarrollado desde 1970. 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.^{7,9}

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.⁸

En la actualidad las matrices poliméricas siguen siendo de gran importancia. Se les denomina comúnmente como microesferas 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, que las reacciones adversas que normalmente se producen, sean mínimas, que se coloquen fácilmente y que no requieran remoción manual. Dado el potencial que tienen estas FFLM en medicina veterinaria, 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.¹⁰

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 meses 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 predecir su tasa de liberación. Los poliésteres arriba mencionados tienen una característica en común: la sensibilidad a la hidrólisis a nivel de 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. Diversos ensayos muestran la conveniencia de utilizar politartratos para controlar la liberación de los fármacos. Sin embargo, hasta ahora estos politartratos no han recibido suficiente atención comercial ^{10, 11 y 12}.

1.3.1.1 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. Véase figura 5¹³

Categoría funcional: Agente de revestimiento, desintegrante, agente formador de películas, mucoadhesivo, cubierta de tabletas, agente que incrementa la viscosidad.¹³

El chitosan es un polímero parcialmente desacetilado obtenido a partir de desacetilación 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.²⁰

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.²¹⁻²³

El quitosán 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 C₆ formados. Debido a la disponibilidad de los grupos amino libres de quitosán puede protonarse con facilidad positivamente y debido a las fuerzas electrostáticas pueden interactuar con superficies mucosas cargadas negativamente en su superficie o bien quelar metales iónicos (cobalto).^{24, 25}

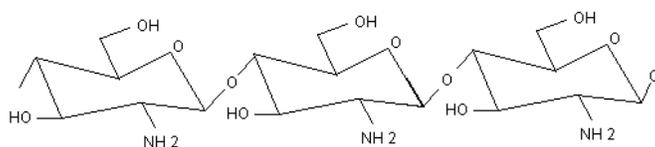


Figura 5.- Estructura química del quitosán

Evidentemente es una base débil y es insoluble en agua y disolventes orgánicos, pero soluble en soluciones ácidas y ligeramente soluble en soluciones alcalinas²⁶. Su formación de gel puede ser obtenido por interacción de quitosán con iones opuestos de bajo peso molecular como polifosfatos, sulfatos y con la unión de glutaraldeído. La propiedad de gelación del quitosán permite un amplio rango de aplicaciones como la de recubrir productos farmacéuticos y alimentos.²⁷⁻²⁹ 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 quitosán presentan un perfil de liberación cercano al orden-cero.²⁸⁻³⁰

Se conoce desde 1859, pero en los últimos 20 años se ha investigado sobre este polímero como un sistema de liberación.¹⁴ Recientemente se han considerado a las microesferas o nanoesferas de quitosán 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 (DL₅₀ 16 g/kg administrado por vía oral en ratones) y además posee alta densidad de carga de principios activos.¹⁵⁻¹⁹

Las microesferas o nanoesferas de quitosán 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 quitosán 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.²⁹

El uso de quitosán 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. Jamela et al. (2000), encontraron al usar toxoide de difteria (DT)- cargado esto demuestra en quitosán, que la producción de anticuerpos se mantuvo constante por 5 meses. El potencial del quitosán en microesferas como vehículo de liberación de fármacos de larga acción. Se ha preparado prednisolona en perlas de gel de quitosán, 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 quitosán es biodegradado naturalmente por hidrólisis con lisozima. El producto de degradación es atóxico, no inmunogénico y no carcinogénico. Onishi y Machida^{17,31} encontraron en una investigación in vivo la biodegradación del quitosán soluble en agua en ratones. Los resultados muestran que aproximadamente el 50% del material fue desacetilado y no se reportó bioacumulación de estos productos.^{17,31}

1.3.1.2 Carbopol

Sinónimos: acritamero, polímero de ácido acrílico, carbopol, carboxi polimetileno, ácido poliacrílico, polímero carboxivinílico, permuten, ultrez.¹³

Categoría Funcional: bioadesivo, agente emulsificante, agente que modifica la liberación, agente suspensor, cubierta de tabletas, agente que incrementa la viscosidad.¹³

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 fármacos⁴⁴ adicionalmente, se sabe que generan en la mayoría de los casos, preparados de liberación de orden cero.⁴⁵

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, aunque solo se usa por vía oral, pero no parenteral en preparados comerciales. 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 6.⁴⁶

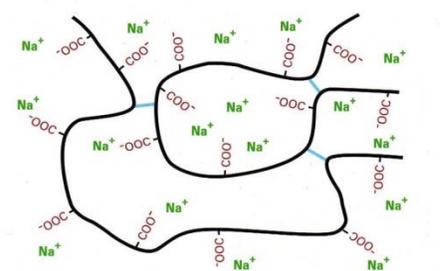


Figura 6.- Estructura de carbopol

En años recientes, las resinas carboméricas han tenido gran éxito como matrices para la liberación controlada de fármacos administrados por vía oral.⁴⁷ El carbopol es compatible con gran variedad de ingredientes activos y excipientes, lo que permite diseñar presentaciones con características de liberación-absorción especiales.^{48, 49} Ha sido usado como matriz en suspensiones, cremas para uso externo o como matriz bioadhesiva para formulaciones bucales, rectales y nasales. MacLean.⁵⁰ 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, Ikechukwi⁵¹ investigó la formulación de carbopol 971 conteniendo apomorfina, (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 piroxicam⁵² y al diclofenaco sódico.⁴⁴

A pesar de lo dicho, se sabe que la FDA no recomienda a aún su uso por vía parenteral, aunque no se especifica ningún argumento, las proporciones para el uso de este excipiente están expresadas en el cuadro 7

Cuadro 5.- Proporciones de Carbopol para sus diferentes usos.¹³

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

1.3.1.3 Poloxámero

Sinónimos: Lutrol F127, Pluronic, Monolan, Pcloxalkol, Copolímero polietilen-propilenglycol, Copolímero polioxietilen-polioxipropilen, Supronic, Synperonic.¹³

Categoría Funcional: Agente Emulsificante, Solubilizante e Humidificante.¹³ 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%.

Estos copolímeros han sido utilizados en formulaciones farmacéuticas como matrices-vehículos para liberación de fármacos debido a su habilidad para agregarse formando micelas, microemulsiones o fases líquidas cristalinas. Pueden mejorar la solubilidad de principios activos, reducir su degradación hidrolítica y pueden lograr una liberación controlada y mejoran la biodisponibilidad.⁵³⁻⁵⁶ Las micelas poseen un centro hidrófobo de óxido de propileno y una corona hidrofílica de óxido de etileno capaces de solubilizar sustancias hidrofóbicas. 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) y aumento de viscosidad. 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.^{13, 57-59}

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 se mejora el aspecto debido a la transparencia de la formulación. Las propiedades de gelación pueden ser controladas al incrementar la concentración de solutos adicionados a la formulación⁶⁰, o mediante la adición de alcoholes (Monzon y Sumano, 2007)⁸³.

Las emulsiones oleosas en agua presentan 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 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 estables en solución. 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 con el 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 agua en aceite o bicontinua.⁶¹

Se ha investigado al poloxámero como vehículo para fármacos, tanto para la aplicación oral como parenteral.⁶²⁻⁶⁴ Por ejemplo 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. Estos estudios mostraron que ambos poloxámeros y geles monoglicéridos pueden ser aplicados subgingivalmente y producen la liberación sostenida de fármacos.⁶⁵ 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 ⁶², 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 con una relación inversa; esto es la formulación mostró baja viscosidad a temperatura ambiente y gelificación rígido-elástica a temperatura corporal.

Estas presentaciones se aplican fácilmente, debido a la baja viscosidad a temperatura ambiente y la gelación asegura 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.⁶⁶, Entre otras formulaciones que se han preparado destacan el ibuprofeno y la doxiciclina.⁵⁷ Estos estudios demuestran que el poloxámero como vehículo para la aplicación parenteral incrementa la estabilidad de los fármacos lábiles y para prolongar la liberación generando farmacocinéticas tipo “flip – flop”. En los cuadros 6 y 8 se presentan algunas propiedades del poloxámero 407.

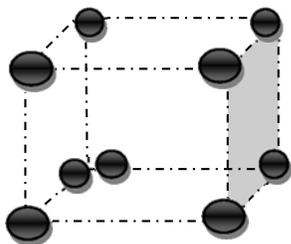


Figura 7.- Estructura tridimensional de poloxámero.

Cuadro 6.-Usos que se le dan al poloxámero 407 y sus porcentajes recomendados⁶⁷

Uso	Concentración Recomendada(%)
Agente gelante	15-50
Agente estabilizante	1-5
Agente Humectante	0.01 – 5

Cuadro 7.- Concentraciones recomendadas de poloxámero por la FDA ¹³

Vía	(%)
Oftálmico	0.16-0.2
Oral	5-12.6
Tópico	1-15.5

Cuadro 8.- Usos del poloxámero 407 en diferentes especies y toxicidad reportada.⁶⁸

Seguridad	Vía	Dosis	Tiempo del Tratamiento	Toxicidad
Conejos y perros	IV	0.5 g/kg/día	14 días	No se observó

1.3.1.4 Las ciclodextrinas como sistemas de liberación

Sinónimos: beta-cicloamilosa, betadex, beta-dextrina cicloheptaamilosa, cicloheptaglucono, ciclomaltoheptosa, kleptosa.¹³

Categoría Funcional: solubilizante, estabilizante.¹³

Las ciclodextrinas son carbohidratos cíclicos formados por glucosa unidas mediante enlaces α -(1,4) glucosídicos. Las CD presentan forma conoidal 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 tendientes a ser liposolubles en medio sólido, líquido y con algunos gases.³²

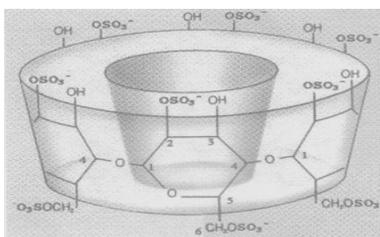


Figura 8.- Forma estructural de las ciclodextrinas.

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 ambos³⁰. Se han utilizado como acarreadores de fármacos ya que mejoran algunas propiedades físicas como la solubilidad en agua y disminuyen la inestabilidad del fármaco³³. 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.^{34,35}

Los complejos de inclusión fármaco-ciclodextrina son preparados generalmente en un medio líquido, los métodos dependen esencialmente de las propiedades de la molécula huésped. 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 polar³⁶. 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 sustrato libre generando un equilibrio termodinámico y cinético.³⁷ 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 agua.³⁷ 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 de preparados farmacéuticos son:

1.- El mejoramiento de la absorción que 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.^{37, 38, 39}

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.^{36, 37}

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.^{40, 41}

3.- 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-O-(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.^{42, 43}

Las porciones máximas de los excipientes son reguladas por la FDA (Food and Drugs Administration) como se muestra en el cuadro 9 que incluye las máximas de beta ciclodextrina.

Cuadro 9: Proporciones máximas de beta-ciclodextrina aprobadas por la FDA en medicamentos.¹³

Vía	(%)
IM	44.1%
IV	0.4 %
ORAL	
OTROS	

2.0 Justificación

Se reconoce que la biodisponibilidad oral de la enrofloxacin en perros es de 80% con enrofloxacin en forma de tableta³ Si se mejora este valor mediante la adición de ciertos vehículos, es factible obtener una Cmax más elevada o un valor de AUC₀₋₂₄/CMI mayor o ambos. Con ello se lograría un preparado farmacéutico que cumpliría de manera más congruente con las variables PK/PD para este fármaco; esto es: Cmax ≥10-12 CMI y un valor de AUC/CMI ≥125.

A la fecha, solo existe la forma farmacéutica de tableta para pequeñas especies y la forma inyectable (IM o SC). Esta última es poco recomendable dado el pH de los preparados farmacéuticos (10.4 a 11) y en función de que su aplicación depende del médico, lo que se complica en esquemas de dosificación prolongados.

Dada la naturaleza promotora de la biodisponibilidad de algunos de los vehículos descritos en la introducción, resulta factible pensar que se pueden mejorar una o las dos variables descritas de PK/PD y con ello adecuar la enrofloxacin a las necesidades clínicas en perros.

3.0 Hipótesis

Es posible formular a la enrofloxacin con excipientes que modifiquen su liberación, a fin de obtener patrones de absorción en perros que aumenten la congruencia farmacocinética/farmacodinámica en términos de un C_{max} elevado y con un valor de AUC/CMI mayores al preparado referente, lo que permitiría un intervalo de dosificación mayor a 24 hrs o que el efecto clínico sea más congruente con la variables $C_{max} \geq 10-12 \text{ CMI}$ y/o $AUC_{0-24}/CMI \geq 125$

4.0 Objetivos

1.- Formular prototipos de enrofloxacin de liberación modificada para administración en forma de pasta oral con jeringa graduada a base de:

- a. chitosan+ enrofloxacin
- b. chitosan+ ciclodextrina+ enrofloxacin
- c. poloxamero+ enrofloxacin
- d. poloxamero+ ciclodextrina+ enrofloxacin

2.- Realizar estudios piloto en ratas para determinar los mejores prototipos en cuanto a su farmacocinética.

3.- Realizar la farmacocinética base del preparado de referencia Baytril tableta en perros.

4.- Llevar a cabo estudios farmacocinéticos en perros de los mejores prototipos derivados del estudio en ratas.

5.- Comparar farmacológicamente y estadísticamente los datos obtenidos con énfasis en el preparado de referencia y con base en las variables PK/PD conocidas para enrofloxacin: $AUC_{0-24}/CMI \geq 125$ y $C_{max} > 10-12 \times CMI$.

5.0 Material y Métodos

Procedimiento para la elaboración de una pasta de enrofloxacino al 10 % en una base de polxámero (prototipo 1).

- 1) En un vaso de precipitados de 250 ml, se adiciona: 100 mL de agua purificada, 20 mL de propilenglicol y 20 mL de alcohol etílico y calentar a temperatura de 50 a 60 °C.
- 2) Adicionar lentamente y hasta completa incorporación 1 gramo de Pemulen Tipo B.
- 3) Al vaso del paso anterior adicionar lentamente, con agitación mecánica y manteniendo la temperatura, 30 gramos de Poloxámero.
- 4) Posteriormente y manteniendo la temperatura adicionar 20 gramos de Enrofloxacino y dispersar a 10000 rpm durante 10 minutos.
- 5) A la mezcla anterior se le adiciona el metilparabeno con agitación mecánica y constante hasta su completa incorporación y el propilparabeno de igual forma, se deja enfriar esta mezcla a 40°C.
- 6) Aforar con agua a 200 mL.
- 7) Mantener la agitación y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 8) Mantener la agitación durante 5 minutos y retirar.

Procedimiento para la elaboración de una pasta de enrofloxacino al 10 % con ciclodextrina en una base de poloxámero.

- 1) En un vaso de precipitados de 250 ml, se adiciona: 100 mL de agua purificada, 20 mL de propilenglicol y 20 mL de alcohol etílico y calentar a temperatura de 50 a 60 °C.
- 2) Adicionar lentamente y hasta completa incorporación 1 gramo de Pemulen Tipo B.
- 3) Adicionar 5 gramos de beta-ciclodextrina y agitar hasta su completa incorporación.
- 4) Al vaso del paso anterior adicionar lentamente, con agitación mecánica y manteniendo la temperatura, 30 gramos de Poloxámero.
- 5) Posteriormente y manteniendo la temperatura adicionar 20 gramos de Enrofloxacino y dispersar a 10000 rpm durante 10 minutos.

- 6) A la mezcla anterior se le adiciona el metilparabeno con agitación mecánica y constante hasta su completa incorporación y el propilparabeno de igual forma, se deja enfriar esta mezcla a 40°C.
- 7) Aforar con agua a 200 mL.
- 8) Mantener la agitación y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 9) Mantener la agitación durante 5 minutos y retirar.

Procedimiento para la elaboración de una pasta de enrofloxacino al 10 % con chitosan en una base de poloxámero.

- 1) En un vaso de precipitados de 250 ml, se adiciona: 100 mL de agua purificada, 20 mL de propilenglicol y 20 mL de alcohol etílico y calentar a temperatura de 50 a 60 °C.
- 2) Adicionar lentamente 2 gramos de chitosan.
- 3) Adicionar 2.5 mL de ácido acético glacial y agitar hasta la completa disolución del chitosan
- 4) Al vaso del paso anterior adicionar lentamente, con agitación mecánica y manteniendo la temperatura, 30 gramos de Poloxámero.
- 5) Posteriormente y manteniendo la temperatura adicionar 20 gramos de Enrofloxacino y dispersar a 10000 rpm durante 10 minutos.
- 6) A la mezcla anterior se le adiciona el metilparabeno con agitación mecánica y constante hasta su completa incorporación y el propilparabeno de igual forma, se deja enfriar esta mezcla a 40°C.
- 7) Aforar con agua a 200 mL.
- 8) Mantener la agitación y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 9) Mantener la agitación durante 5 minutos y retirar.

6.0 Flujograma

Figura 9. Presenta un flujograma que describe la secuencia del presente trabajo.

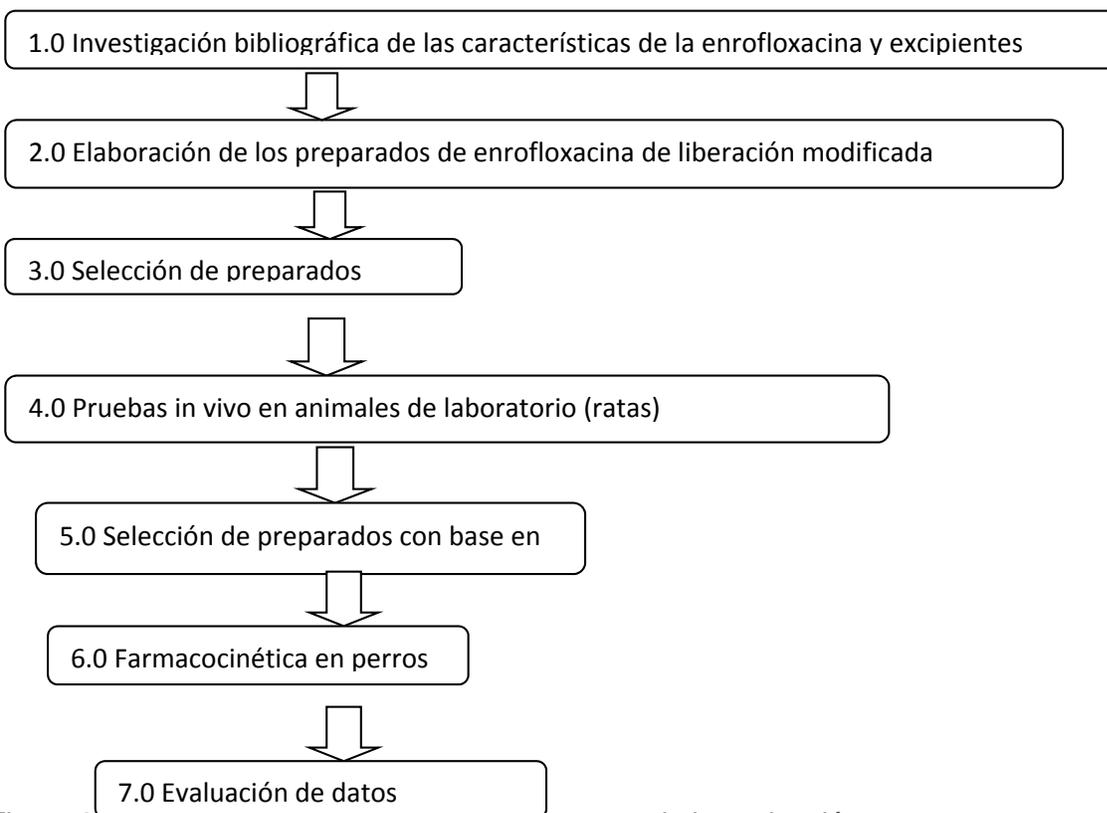


Figura 9. Flujograma de actividades en el proyecto de investigación

6.1 Elaboración de prototipos de enrofloxacin de liberación moderada

Procedimiento para la elaboración de un pasta de Enrofloxacin al 10 % con chitosan en una base de Poloxámero. (protipo 1 chito-enro)

- 1) En un vaso de precipitados de 250 ml, se adiciona: 100 mL de agua purificada, 20 mL de propilenglicol y 20 mL de alcohol etílico y calentar a temperatura de 50 a 60 °C.
- 2) Adicionar lentamente 2 gramos de chitosan.
- 3) Adicionar 2.5 mL de ácido acético glacial y agitar hasta la completa disolución del chitosan
- 4) Al vaso del paso anterior adicionar lentamente, con agitación mecánica y manteniendo la temperatura, 30 gramos de Poloxámero.
- 5) Posteriormente y manteniendo la temperatura adicionar 20 gramos de Enrofloxacin y dispersar a 10000 rpm durante 10 minutos.

6) A la mezcla anterior se le adiciona el metilparabeno con agitación mecánica y constante hasta su completa incorporación y el propilparabeno de igual forma, se deja enfriar esta mezcla a 40°C.

7) Aforar con agua a 200 mL.

8) Mantener la agitación y dejar enfriar a temperatura ambiente.

9) Mantener la agitación durante 5 minutos y retirar.

Procedimiento para la elaboración de una pasta de enrofloxacino al 10% con ciclodextrina y chitosan (prototipo 2 chito-ciclo-enro)

1) En un vaso de precipitados de 250 ml, se adiciona: 100 mL de agua purificada, 20 mL de propilenglicol y 20 mL de alcohol etílico y calentar a temperatura de 50 a 60 °C.

2) Adicionar lentamente y hasta completa incorporación 1 gramo de Pemulen Tipo B.

3) Adicionar lentamente 2 gramos de chitosan.

4) Adicionar 2.5 mL de ácido acético glacial y agitar hasta la completa disolución del chitosan

5) Adicionar 5 gramos de beta-ciclodextrina y agitar hasta su completa incorporación.

6) Al vaso del paso anterior adicionar lentamente, con agitación mecánica y manteniendo la temperatura, 30 gramos de Poloxámero.

7) Posteriormente y manteniendo la temperatura adicionar 20 gramos de Enrofloxacino y dispersar a 10000 rpm durante 10 minutos.

8) A la mezcla anterior se le adiciona el metilparabeno con agitación mecánica y constante hasta su completa incorporación y el propilparabeno de igual forma, se deja enfriar esta mezcla a 40°C.

9) Aforar con agua a 200 mL.

10) Mantener la agitación y dejar enfriar a temperatura ambiente.

11) Mantener la agitación durante 5 minutos y retirar.

Procedimiento para la elaboración de un pasta de Enrofloxacino al 10 % en una base de polxámero. (prototipo 3 poloxa-enro)

1) En un vaso de precipitados de 250 ml, se adiciona: 100 mL de agua purificada, 20 mL de propilenglicol y 20 mL de alcohol etílico y calentar a temperatura de 50 a 60 °C.

2) Adicionar lentamente y hasta completa incorporación 1 gramo de Pemulen Tipo B.

3) Al vaso del paso anterior adicionar lentamente, con agitación mecánica y manteniendo la temperatura, 30 gramos de Poloxámero.

4) Posteriormente y manteniendo la temperatura adicionar 20 gramos de Enrofloxacino y dispersar a 10000 rpm durante 10 minutos.

5) A la mezcla anterior se le adiciona el metilparabeno con agitación mecánica y constante hasta su completa incorporación y el propilparabeno de igual forma, se deja enfriar esta mezcla a 40°C.

6) Aforar con agua a 200 mL.

7) Mantener la agitación y dejar enfriar a temperatura ambiente.

8) Mantener la agitación durante 5 minutos y retirar.

Procedimiento para la elaboración de un pasta de Enrofloxacin al 10 % con Ciclodextrina en una base de Poloxámero. (prototipo 4 poloxa-ciclo- enro)

- 1) En un vaso de precipitados de 250 ml, se adiciona: 100 mL de agua purificada, 20 mL de propilenglicol y 20 mL de alcohol etílico y calentar a temperatura de 50 a 60 °C.
- 2) Adicionar lentamente y hasta completa incorporación 1 gramo de Pemulen Tipo B.
- 3) Adicionar 5 gramos de beta-ciclodextrina y agitar hasta su completa incorporación.
- 4) Al vaso del paso anterior adicionar lentamente, con agitación mecánica y manteniendo la temperatura, 30 gramos de Poloxámero.
- 5) Posteriormente y manteniendo la temperatura adicionar 20 gramos de Enrofloxacin y dispersar a 10000 rpm durante 10 minutos.
- 6) A la mezcla anterior se le adiciona el metilparabeno con agitación mecánica y constante hasta su completa incorporación y el propilparabeno de igual forma, se deja enfriar esta mezcla a 40°C.
- 7) Aforar con agua a 200 mL.
- 8) Mantener la agitación y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 9) Mantener la agitación durante 5 minutos y retirar.

6.2 Pruebas *in vivo* en animales de laboratorio (ratas)

Se seleccionaron los preparados estables (en aspecto intacto la formulación granulada a temperatura ambiente de laboratorio y contenidos en envase ámbar durante al menos un mes posterior a su preparación). Posteriormente se realizaron pruebas en vivo en animales de laboratorio; se utilizaron ratas Winstar obtenidas del bioterio del instituto de Fisiología Celular de la UNAM. En el anexo A se presentan los datos técnicos de los vehículos y de la enrofloxacin utilizada.

Estudio *in vivo*

Las ratas, las cuales se dividieron en 5 grupos de 15 cada uno; tratados de la siguiente forma: grupo 1 preparado de quitosan + enrofloxacin, grupo 2: quitosan + ciclodextrina + enrofloxacin, grupo 3: poloxámero + enrofloxacin, grupo 4: poloxámero + ciclodextrina + enrofloxacin, grupo 5 con los preparados de referencia. A todos los grupos se les administró una dosis de 10 mg x kg vía oral y se tomaron muestras por punción cardiaca bajo anestesia con éter a los siguientes

tiempos 0.5 horas, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas utilizando 3 ratas en cada sangrado. La sangre se centrifugó inmediatamente a 10, 000 rpm, se separó el suero en tubos Eppendorf etiquetados y se congeló el suero en nitrógeno líquido hasta su análisis

Elección de un preparado de liberación modificada

Posteriormente a las pruebas realizadas in vivo en las ratas (toxicidad, concentraciones séricas, obtención de variables farmacocinéticas, los productos (preparados) que no cumplieron con una liberación modificada (optimizando su farmacocinética y farmacodinámica) prolongándola más allá del producto de referencia, se eliminaron, y se seleccionaron los preparados que si la obtuvieron para realizar los estudios en perros.

Obtenidos los preparados y seleccionadas las formulaciones más adecuadas se formaron 3 grupos de 7 perros cada uno conformados de la siguiente manera:

G1. Poloxamero + Enrofloxacin.

G2. Poloxamero + enrofloxacin + ciclodextrina.

G3. Grupo Testigo (enrofloxacin sol del preparado de referencia).

A todos los animales se les dosificó a razón de 10 mg/kg de enrofloxacin, para lo que se les pesó individualmente previa dosificación.

Los preparados se administraron vía oral en forma de pasta contenida en jeringa graduada a todos los grupos (cuadro 11). Se colocó un catéter heparinizado (10 UI) en la vena radial del otro miembro torácico de 10 cm de longitud, calibre 20 a 22 (Becton Dickinson) lo que facilitó la obtención de las muestras.

6.3. Técnica analítica para determinación de enrofloxacin

Determinación de Enrofloxacin

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.⁶⁹

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 Farland² 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 1×10^{14} .

Preparación de placas

En un refractorio 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 μ l 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 dilución 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 ml 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 tomó 1 ml y se agregó en el tubo 0, se homogenizó y de éste se tomó 1 ml y se agregó al tubo 1, se homogenizó y se tomó 1 ml y se agregó al tubo 2 y así se completó hasta completar los 10 tubos.

Lectura de 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 ⁷¹ y Exel ⁷², se obtuvieron las gráficas correspondientes a los milímetros de halo de inhibición vs la concentración.

6.3.1 Manejo de los datos analíticos para la obtención de variables farmacocinéticas

Análisis y procesamiento de los resultados

De los resultados obtenidos por grupo y por tiempo de sangrado se extrapolaron en la gráfica de concentración contra halos de inhibición obteniendo así los µg/mL de cada una de las muestras de suero. Los análisis farmacocinéticos se procesaron por medio de los programas *Microcal origin* versión *originPro Software*, con el cual se realizó la regresión lineal y *Micromath PKAnalist Scientific Software* en el que se obtuvo el modelo farmacocinético, los parámetros farmacocinéticos que se comparan estadísticamente son aquellos que reflejaron directamente la potencia clínica y significancia de las formulaciones de liberación modificada (enrofloxacina-chitosan, enrofloxacina-chitosan-ciclodextrina, enrofloxacina-poloxámero y enrofloxacina-poloxámero-ciclodextrina-) 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, disponibilidad 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 gráficas de concentración contra tiempo a partir de las cuales se obtuvieron las farmacocinéticas de cada uno de los grupos.

Las variables obtenidas fueron:

C_{max} = concentración sérica máxima

T_{max} = tiempo para lograr C_{max}

$T_{1/2 ab}$ = vida media de absorción

$T_{1/2 \beta}$ = vida media de eliminación

AUC_{0-24} = área bajo la curva de concentración contra tiempo de 0 a 24 h

6.4 Pruebas in vivo en perros

Se probaron los 3 prototipos que mostraron mejorías en PK/PD; los resultados se muestran las figuras 12 y cuadro 14.

6.4.1 Técnica analítica para la determinación de enrofloxacin

Ver punto 6.3.1 PP: 31 del presente texto

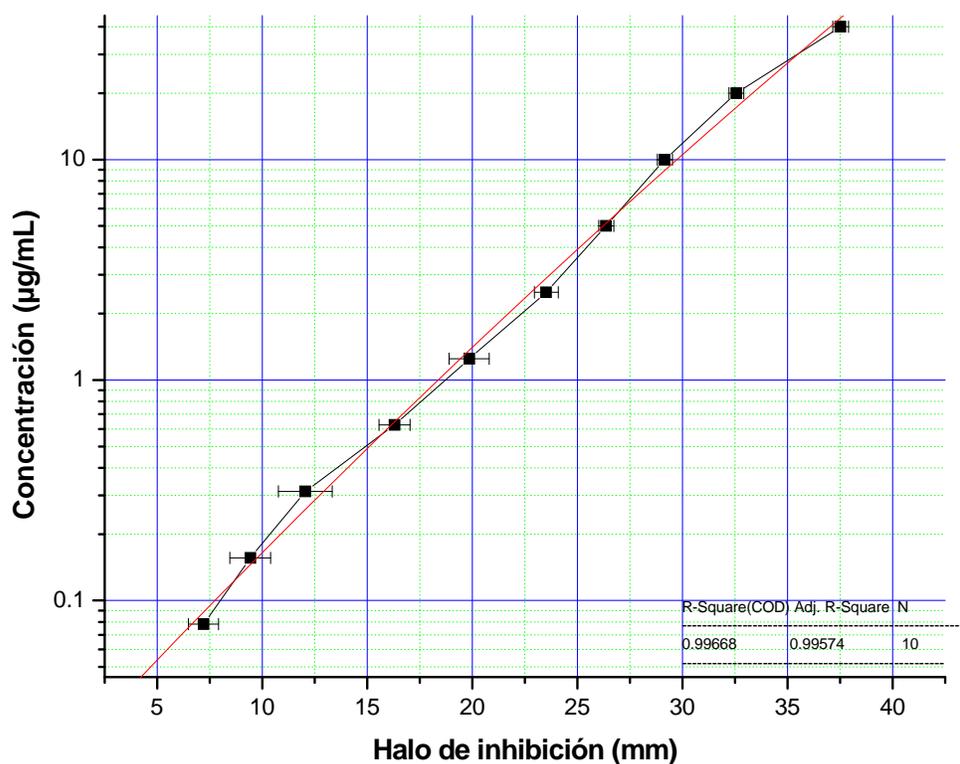
6.4.2 Manejo de datos analíticos para la obtención de variables farmacocinéticas

Ver punto 6.3.2 página 32 del presente texto

7.0 Resultados

7.1 Curvas de recuperación de la enrofloxacin en suero de ratas y suero de perros

En la figura 10, se presenta la curva estándar $\pm 1DE$ y regresión lineal de la sal de enrofloxacin en términos de concentración vs halo de inhibición. Los puntos son los datos experimentales y la línea es el ajuste lineal teórico con los valores del cuadro 11.



Cuadro 11. Concentraciones de la sal pura de enrofloxacina y los halos de inhibición ± 1 DE obtenidas como estándar.

Concentración (µg/mL)	Área bajo la curva	
	Halo de inhibición	± 1 DE
40	37.52	0.38
20	32.56	0.35
10	29.1575	0.36
5	26.3675	0.35
2.5	23.51625	0.56
1.25	19.85	0.95
0.625	16.30125	0.73

0.3125	12.045	0.82
0.15625	9.435	0.96
0.07813	7.21	0.71
0.039016	ND	-

ND = No detectable

En la figura 10 y cuadro 12 se muestran los resultados en perros del prototipo 1 (chitosan + enrofloxacin) y prototipo 2 (chitosan + ciclodextrina + enrofloxacin). En la figura 11 y cuadro 13 se muestran los resultados del prototipo 3 y 4.

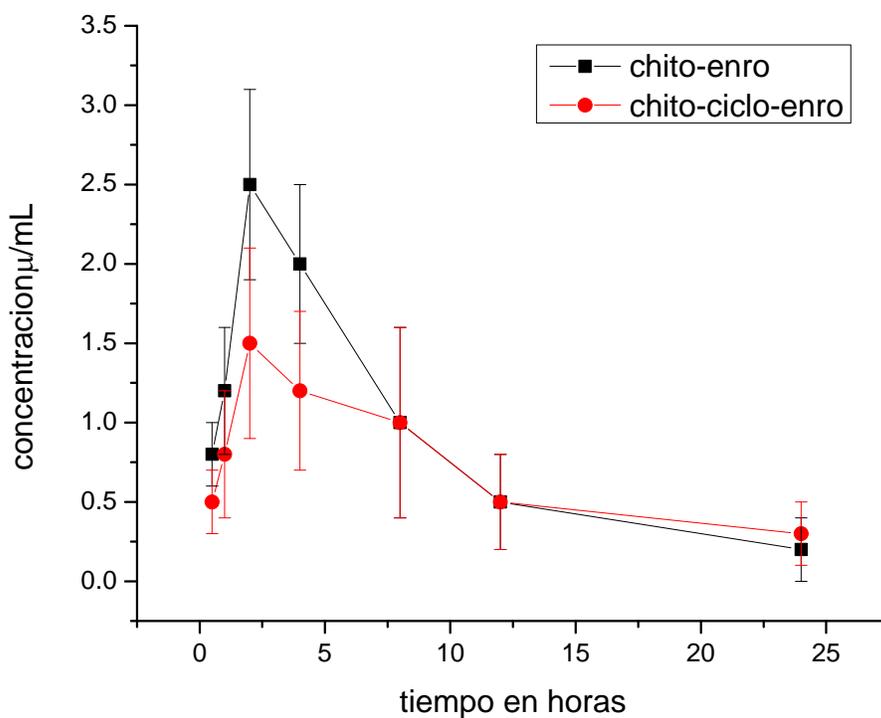


Figura 10. Resultado de los prototipos preparados 1 y 2 en perros

Cuadro 12. Concentraciones séricas del preparado enrofloxacin del prototipo 1 y 2 en perros

Tiempo	Concentraciones séricas			
	Chito-enro	±DE	Chito-ciclo-enro	± DE
0.5	0.8	0.2	0.5	0.2
1	1.2	0.4	0.8	0.4
2	2.5	0.6	1.5	0.6
4	2	0.5	1.2	0.5
8	1	0.6	1	0.6
12	0.5	0.3	0.5	0.3
24	0.2	0.2	0.3	0.2

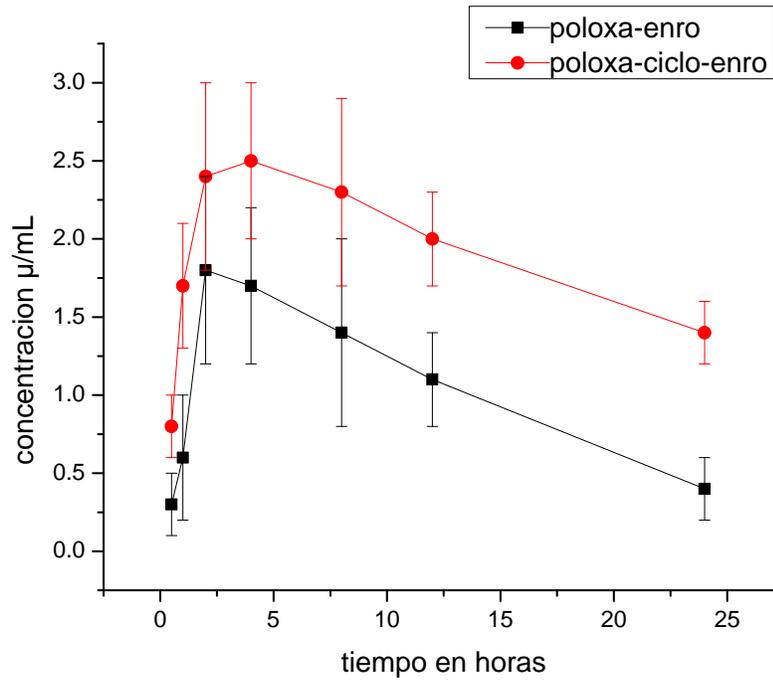
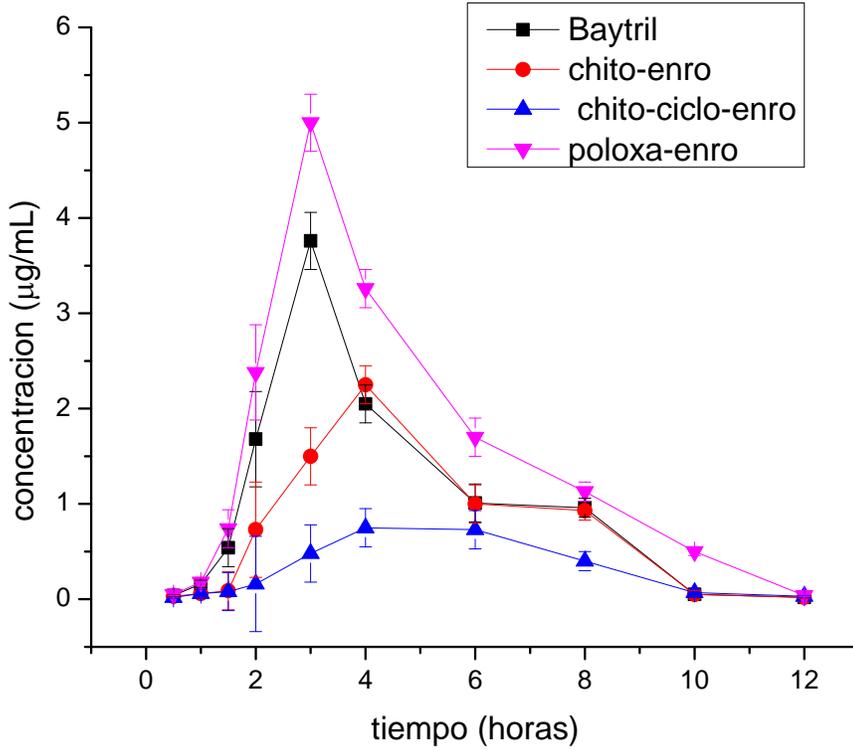


Figura 11. Resultado de los prototipos preparados 3 y 4 en perros

Cuadro 13. Concentraciones séricas del preparado de enrofloxacin prototipos 3 y 4 en perros

Tiempo (horas)	Concentraciones Séricas			
	POLOXA- ENRO	±DE	POLOXA- CICLO- ENRO	±DE
0.5	0.3	0.2	0.8	0.2
1	0.6	0.4	1.7	0.4
2	1.8	0.6	2.4	0.6
4	1.7	0.5	2.5	0.5
8	1.4	0.6	2.3	0.6
12	1.1	0.3	2	0.3
24	0.4	0.2	1.4	0.2



Figura

12.- Comparativo de los 3 mejores prototipos en perros y el de referencia (Baytril)

Cuadro 14. Concentraciones séricas del preparado de referencia (Baytril) y los 3 mejores prototipos en perros.

Tiempo (horas)	Concentraciones séricas							
	Baytril	±DE	Chito-enro	±DE	Chito-ciclo-enro	±DE	Poloxa-enro	±DE
0.5	0.04	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	0.05	0.01
1	0.16	0.04	0.06	0.04	0.06	0.04	0.18	0.04
1.5	0.54	0.2	0.09	0.2	0.08	0.2	0.74	0.2
2	1.68	0.5	0.73	0.5	0.16	0.5	2.38	0.5

3	3.76	0.3	1.5	0.3	0.48	0.3	5	0.3
4	2.05	0.2	2.25	0.2	0.75	0.2	3.26	0.2
6	1.01	0.2	1	0.2	0.73	0.2	1.7	0.2
8	0.96	0.1	0.93	0.1	0.4	0.1	1.13	0.1
10	0.05	0.04	0.05	0.04	0.07	0.04	0.5	0.04
12	0.02	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	0.04	0.01

7.2 Resultados Experimentales

En total se probaron en ratas 4 prototipos las concentraciones de enrofloxacin por grupo se presentan en el cuadro 7 y en la figura 11; de los resultados logrados para ratas, resulta evidente que los resultados más satisfactorios los presentan los grupos de los prototipos 3 y 4; Mismos que se evaluaron en perros y se localizan en el cuadro 13 y la figura 11, Adicionalmente se presentan los resultados en el fármaco de referencia Baytril tabletas; cada tableta es para un perro de 20 kg y se rasuran (cortan) de acuerdo al peso del perro. En la Figura 17, cuadro 21.

Las pastas (preparadas al 10%) se colocaron en jeringas de 5 ml

Se evaluaron 4 preparados

Dado que se buscó preparados con una liberación lo más constate posibles, pero sin retardarla tanto que las concentraciones fueran terapéuticamente deficientes, se eligieron los preparados de poloxamero + enrofloxacin y poloxamero + ciclodextrina + enrofloxacin, a los que se les realizaron pruebas adicionales en la siguiente fase.

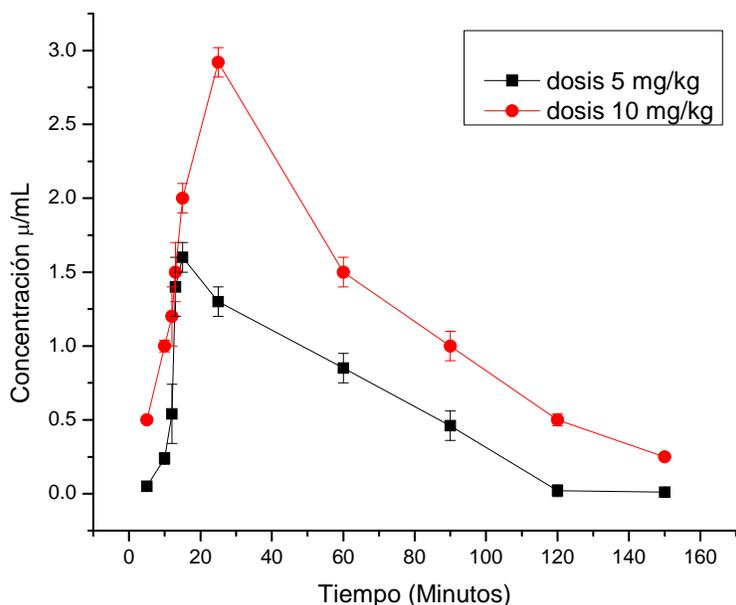


Figura 13. Grafica comparativa para AUC y Cmax en ratas con dosis de 5 mg/kg y 10 mg/kg de enrofloxacin

Cuadro 15. Concentraciones séricas en ratas en concentraciones de 5 mg/kg y 10 mg/kg de enrofloxacin

Tiempo (minutos)	Concentraciones séricas µ/mL			
	5 mg/kg de enrofloxacin	±DE	10 mg/kg de enrofloxacin	±DE
5	0.05	0.01	0.5	0.01
10	0.24	0.04	1	0.04
12	0.54	0.2	1.2	0.2
13	1.4	0.2	1.5	0.2
15	1.6	0.1	2	0.1
25	1.3	0.1	2.92	0.1
60	0.85	0.1	1.5	0.1
90	0.46	0.1	1	0.1
120	0.02	0.04	0.5	0.04
150	0.01	0.01	0.25	0.01

7.3 Evaluación visual de estabilidad de prototipos

Se tomaron en cuenta aspectos físicos como: homogeneidad de la pasta, permanencia del estado físico de la pasta en medio ambiente sin refrigeración (preparados estables en medio ambiente)

7.4 Resultados de las evaluaciones farmacocinéticas de prototipos en ratas y elección de las mejores opciones para su evaluación en perros.

En la figura 14 y cuadro 16 se observan los resultados de las evaluaciones farmacodinámicas y en el cuadro 18 se muestran los resultados de farmacocinéticas realizadas en los prototipos y el preparado de referencia en ratas; nótese que el prototipo con poloxámero y el prototipo con poloxámero y ciclodextrina fueron los que presentaron mejores resultados; mismos que se incluyeron en el estudio en perros para la siguiente fase experimental.

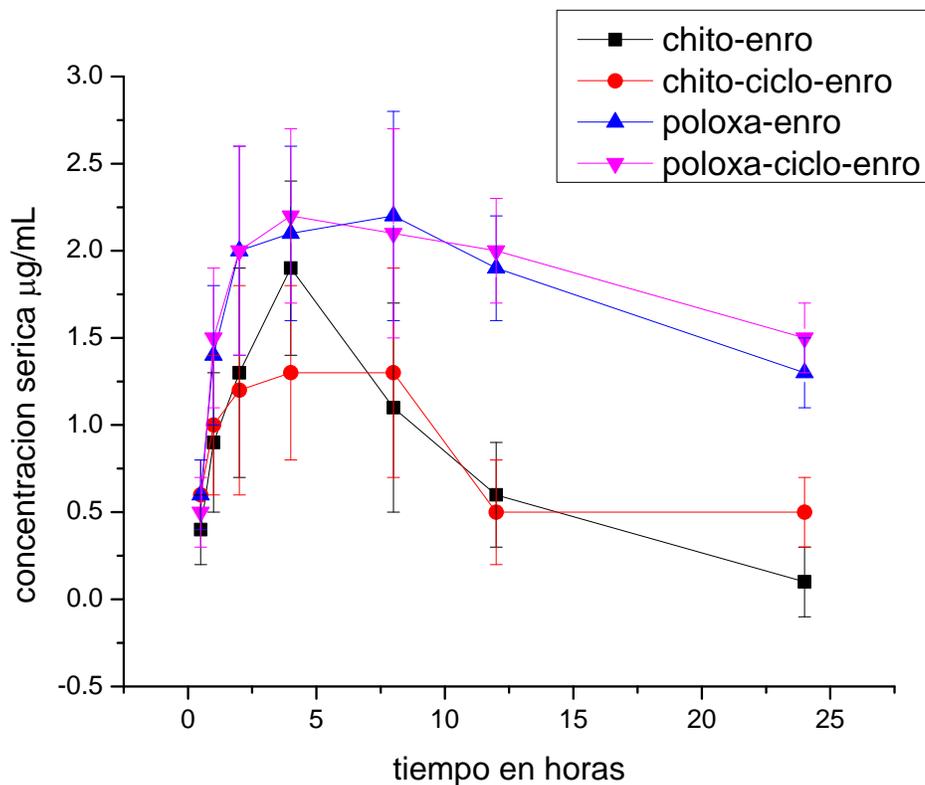


Figura 14. Resultado de los prototipos 1 al 4 en ratas

Cuadro 16.
Concentraciones séricas de los 4 preparados de enrofloxacin en ratas.

Tiempo	Concentración sérica							
	Proto 1	±DE	Proto 2	±DE	Proto 3	±DE	Proto 4	±DE
0.5	0.4	0.2	0.6	0.2	0.6	0.2	0.5	0.2
1	0.9	0.4	1	0.4	1.4	0.4	1.5	0.4
2	1.3	0.6	1.2	0.6	2	0.6	2	0.6
4	1.9	0.5	1.3	0.5	2.1	0.5	2.2	0.5
8	1.1	0.6	1.3	0.6	2.2	0.6	2.1	0.6
12	0.6	0.3	0.5	0.3	1.9	0.3	2	0.3
24	0.1	0.2	0.5	0.2	1.3	0.2	1.5	0.2

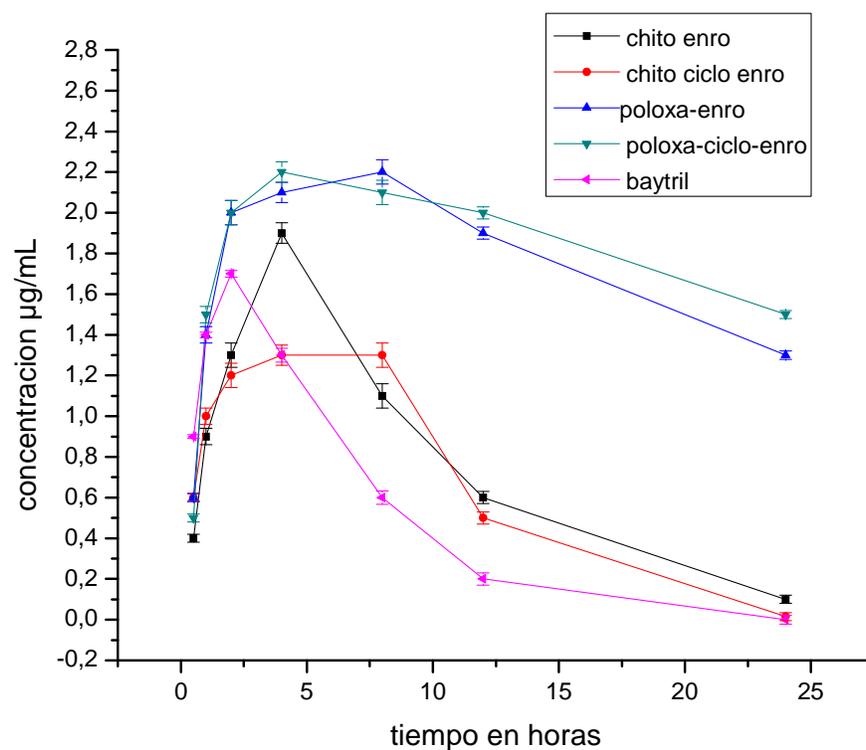


Figura 15. Representación grafica de las concentraciones promedio \pm 1 DE de enrofloxacin en el suero de ratas medicados vía oral con 5 mg/kg de una pasta a base de chitosan-enrofloxacin, chitosan, ciclodextrina-enrofloxacin, otra a base de poloxámero enrofloxacin y poloxamero ciclodextrina enrofloxacin y el referente (baytril) en forma de tableta rasurada para ajustar a peso de los individuos.

Cuadro 17.

Concentraciones promedio \pm 1 DE de enrofloxacin en el suero de ratas medicados vía oral con 5 mg/kg de una pasta a base de chitosan-enrofloxacin, chitosan, ciclodextrina-enrofloxacin, otra a base de poloxámero enrofloxacin y poloxamero ciclodextrina enrofloxacin y el referente en forma de tableta rasurada para ajustar a peso de los individuos.

Tiempo	Prototipo 1 Chito-enro		Prototipo 2 Chito-ciclo- enro		Prototipo 3 Poloxa-enro		Prototipo 4 Poloxa-ciclo- enro		Prototipo de referencia Baytril	
	X	\pm 1 DE	X	\pm 1 DE	X	\pm 1 DE	X	\pm 1 DE	X	\pm 1 DE
0.5	0,38	0,05	0,52	0,11	0,57	0,05	0,47	0,04	0,89	0,02
1	0,89	0,05	1,02	0,06	1,40	0,05	1,48	0,04	1,39	0,02
2	1,28	0,06	1,17	0,08	2,01	0,07	1,98	0,06	1,69	0,01
4	1,87	0,05	1,29	0,05	2,06	0,05	2,14	0,06	1,29	0,01
8	1,08	0,08	1,28	0,04	2,14	0,09	2,06	0,05	0,67	0,25
12	0,51	0,15	0,48	0,05	1,88	0,06	1,96	0,07	0,19	0,01
24	0,19	0,21	0,43	0,06	1,23	0,08	1,45	0,07	0,001	0,004

n= 15 ratas/grupo

Cuadro 18.

Valores farmacocinéticos de enrofloxacin en ratas medicadas vía oral con 5 mg/kg de una pasta a base de chitosan-enrofloxacin (prototipo 1 chito-enro), otra a base de poloxámero enrofloxacin (Prototipo 3 poloxa-enro) y el referente (Baytril) en forma de tableta rasurada para ajustar a peso de los individuos.

VARIABLE	Proto1 chito-enro		Proto 3 poloxa-enro		Proto 4 poloxa-ciclo-enro		Proto de referencia (Baytril)	
	PROMEDIO	± 1DE	PROMEDIO	± 1DE	PROMEDIO	± 1DE	PROMEDIO	± 1DE
AUC	17,040		81,845		105,72		12,015	
AUMC	129,449		2714,754		4671,79		68,683	
Cmax	1,870		2,142		2,13		1,692	
Tmax	4		8		4		2	
T½β	2,632		22,035		29,74		3,218	
T½α	2,632		0,955		0,891		0,743	

AUC= Área Bajo la Curva (µg/ml/h); Cmax= Concentración máxima (µg/ml/h); Tmax = Tiempo máximo (horas); T½β = Tiempo medio de eliminación del fármaco (horas) y T½α = tiempo medio de absorción del fármaco. De 3 prototipos y el preparado de referencia.

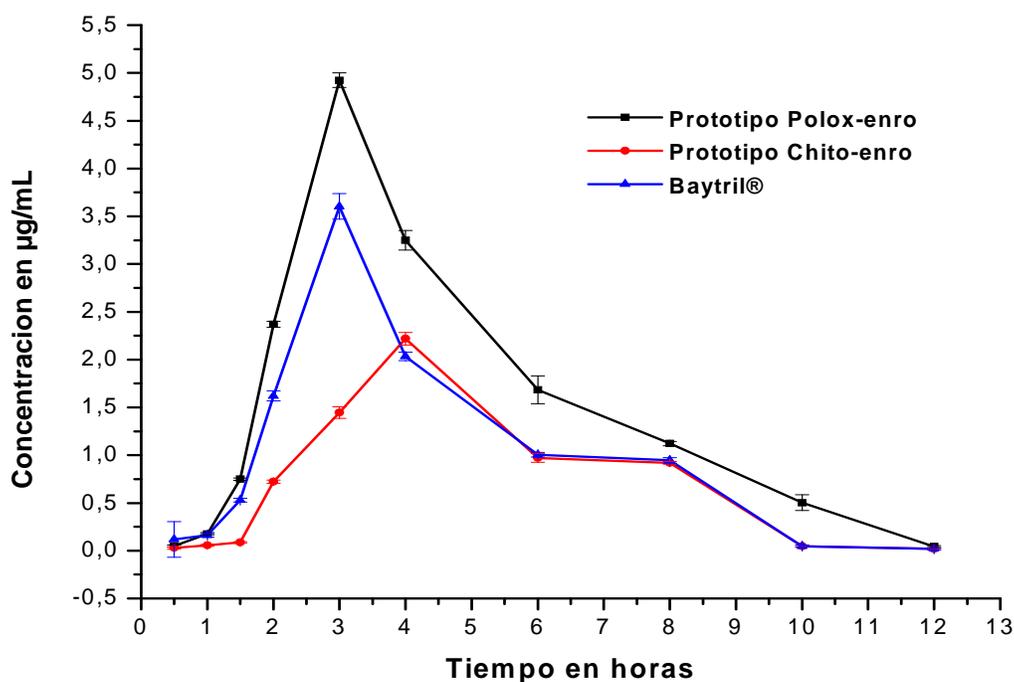


Figura 16. Representación gráfica de las concentraciones promedio \pm 1 DE de enrofloxacin en el suero de perros medicados vía oral con 5 mg/kg de una pasta a base de poloxámero-enrofloxacin (prototipo Polox-enro), otra a base de chitosán enrofloxacin (Prototipo Chito-enro) y el referente en forma de tableta rasurada para ajustar a peso de los individuos.

Cuadro 19.

Concentraciones promedio \pm 1 DE de enrofloxacin en el suero de perros medicados vía oral con 5 mg/kg de una pasta a base de poloxámero-enrofloxacin (prototipo Polox-enro), otra a base de chitosán enrofloxacin (Prototipo Chito-enro) y el referente en forma de tableta rasurada para ajustar a peso de los individuos.

Tiempo	Prototipo Polox-enro		Prototipo Chito-enro		Baytril®	
	X	\pm 1 DE	X	\pm 1 DE	X	\pm 1 DE
0.5	0.04	0.06	0.03	0.5	0.03	0.05
1	0.16	0.17	0.14	0.18	0.14	0.18
1.5	0.54	0.5	0.51	0.55	0.52	0.55
2	1.68	1.59	1.57	1.58	1.61	1.69
3	3.76	3.6	3.5	3.65	3.4	3.71
4	2.05	2.1	2	1.98	2.01	2.06
6	1.01	0.96	1	1.02	1	1.03

8	0.96	0.91	0.91	0.97	0.94	0.98
10	0.05	0.03	0.04	0.06	0.05	0.06
12	0.02	0.01	0.03	0.01	0.01	0.03

n = 6 perros/grupo

Cuadro 20.

Valores farmacocinéticos de enrofloxacin en perros medicados vía oral con 5 mg/kg de una pasta a base de poloxámero-enrofloxacin (prototipo Polox-enro), otra a base de chitosán enrofloxacin (Prototipo Chito-enro) y el referente en forma de tableta rasurada para ajustar a peso de los individuos.

VARIABLE	Prototipo Polox-enro		Prototipo Chito-enro		Baytril®	
	PROMEDIO	± 1DE	PROMEDIO	± 1DE	PROMEDIO	± 1DE
AUC	20,00	1.5	10,23	0.75	6,33	0.55
AUMC	87,71	2.6	53,53	1.7	72,26	2.1
Cmax	3,76	0.5	3,5	0.5	3,4	0.4
Tmax	3	0.4	3	0.3	3	0.3
T_{1/2}β	1,34	0.25	1,05	0.25	2,91	0.75
T_{1/2}α	0,64	0.2	1,01	0.3	2,93	0.70

AUC= Área Bajo la Curva (µg/ml/h); Cmax= Concentración máxima (µg/ml/h); Tmax = Tiempo máximo (horas); T_{1/2}β = Tiempo medio de eliminación del fármaco (horas) T_{1/2}α = tiempo medio de absorción del fármaco.

7.5 Resultado de la farmacocinética de enrofloxacin de referencia en perros

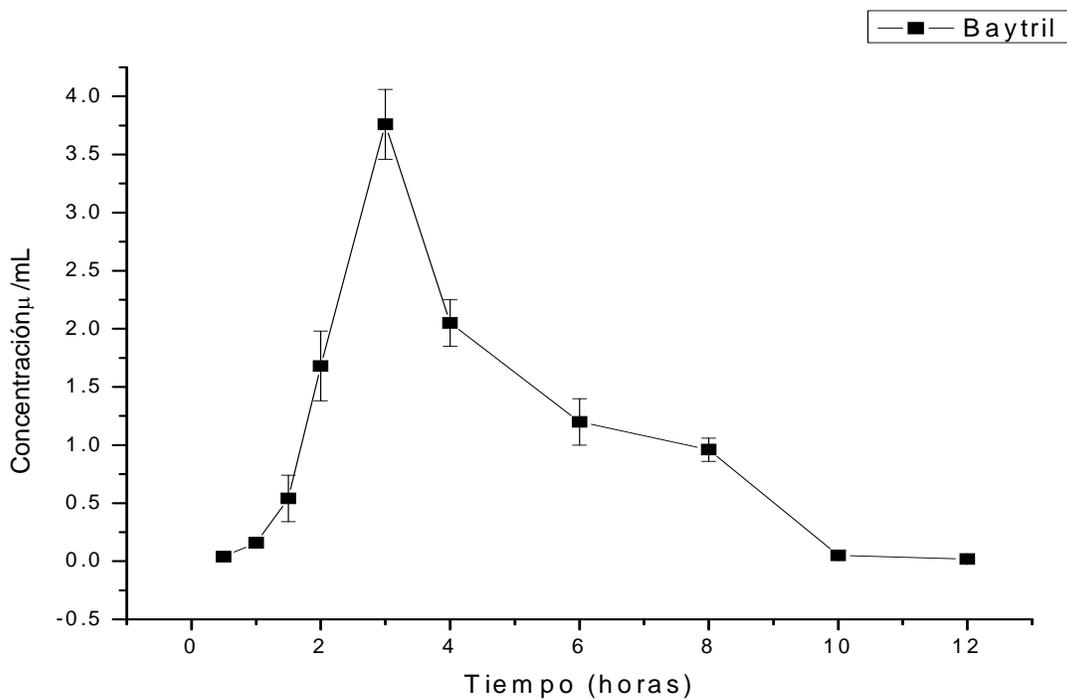


Figura 17. Resultado de la farmacocinética de enrofloxacin del preparado de referencia.

Cuadro 21. Concentraciones séricas del preparado de referencia

Tiempo (horas)	concentración sérica	
	Preparado de referencia (baytril)	±DE
0.5	0.04	0.01
1	0.16	0.04
1.5	0.54	0.2
2	1.68	0.3
3	3.76	0.3
4	2.05	0.2
6	1.2	0.2
8	0.96	0.1
10	0.05	0.04
12	0.02	0.01

8.0 Discusión

Es importante señalar que en este ensayo se utilizó como técnica analítica la determinación cualitativa- cuantitativa de la enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacina en conjunto, por el método Bennett et al.⁶⁹ y validado en este departamento por Sumano et al⁷⁷ y en otros por Souza et al⁷⁸. De acuerdo con estas citas y con lo referido por Kung et al.⁷⁹ la utilización de este método es equivalente a lo logrado por métodos cromatográficos para detectar únicamente a la enrofloxacin. No obstante, se puede destacar para la técnica de difusión en placa que se tiene una percepción más directa de la actividad antibacteriana y con ello se pueden hacer correlaciones de eficacia clínica en virtud del carácter cualitativo del análisis mencionado. Basado en esta observación es posible aceptar los resultados mencionados como altamente repetibles confiables, fenómeno que también se destaca por las desviaciones estándar relativamente homogéneas en la mayoría de las farmacocinéticas realizadas.

Existen en el mercado nacional un número importante de enrofloxacinas indicadas para perro en forma de tableta. Sin embargo, no se tienen datos de su bioequivalencia. En otros estudios y en otras especies, se ha informado de importantes ausencias de bioequivalencias de los supuestos genéricos con los preparados pioneros⁸⁰⁻⁸². Las consecuencias obvias del uso de preparados no bioequivalentes son una menor difusión a los tejidos problema⁸³, con las consecuencias clínicas que esto implica. Por otro lado, las presentaciones en forma de tableta requieren de un tiempo de disolución para que el principio activo se pueda disolver en los fluidos orgánicos. En el caso de los prototipos usados en este ensayo, se tienen formas farmacéuticas distintas a tableta (pastas) que pueden generar valores de Tmax distintos y por lo tanto, este estudio no puede calificarse de una bioequivalencia. No obstante, el punto clave es mejorar la biodisponibilidad (AUC) y la Cmax. En México existe una larga lista de preparados farmacéuticos de enrofloxacin indicados por vía subcutánea y/o intramuscular, véase cuadro 22. No obstante es conocido que las vías IM y SC, particularmente después de dosis repetidas generan fibrosis, alopecias, higromas, etc., en los sitios de administración. Por ello, el preparado referente NO avala su uso por estas rutas de administración. De tal suerte que mejorar la biodisponibilidad de la enrofloxacin en perros no se resuelve con la maniobra simple de cambiar de vía de administración de oral a parenteral. Por esta razón en este estudio se buscó modificar el preparado para administración oral y no otra vía.

Cuadro 22.
Relación de preparados de enrofloxacin en México para uso vía IM, SC o IV.

FÁRMACO	CONCENTRACIÓN	DOSIS REC.	VÍA DE ADMÓN.	CONTRAINDICACIONES	LABORATORIO
Andoflox	5%	1 mL / 10 kg de peso. (5 mg/kg)	SC, IV, IM	En perros no aplicar antes de los 12 meses.	Laboratorios ANDOCI, S.A.
Aquinace	5% y 10%	5 mg/kg de peso (al 5% 1 ml/10 kg, al 10% 1 ml/20 kg)	IM, IV, SC	No administre en perros menores de 1 año. Para evitar al máximo los fenómenos de persistencia bacteriana, con las consecuentes recaídas, se recomienda mantener una terapia por lo menos 3 días consecutivos.	Zoetis México, S. de R.L. de C.V.
Benrol Super	Enrofloxacin 10 % Bromhexina 0.15 %	1 ml por cada 20 a 40 kg de peso (2.5-5 mg/kg)	IM	No administrar en animales jóvenes, hembras gestantes o reproductores (caninos y felinos).	Animal Care Products, S.A. de C.V.
Bioquin	12%	5-20 mg/kg de peso corporal. 2.4 mg/kg	IM O IV lento	No administrar a caninos en fase de desarrollo.	Bio Zoo, S.A. de C.V.
Enfloxil 5% inyectable	5%	1 ml por cada 10 kg de peso. (5 mg/kg)	SC, IM, IV.	No administrarse en caninos menores de 1 año.	Laboratorios Tornel, S.A.
Eco-enroflox	10%	1 ml/ 40 kg de peso. (2.5 mg/kg)	-	-	Laboratorios Ecozoo S.A. de C.V.
Enrofloxacin 10% Sanfer	10%	1 ml / 20 kg de peso. (5 mg/kg)	IM, SC, IV lento.	No administrar a perros hasta concluida su fase de desarrollo	Laboratorios Sanfer S. A. de C. V.
Enrofloxacin GV Iny	10%	1 ml /20 kg de peso. (5 mg/kg)	IM, SC IV lento	-	Genéricos veterinarios, S.A. de C.V.
Enrol	5 %	1 ml/ 20 kg de peso. (5 mg/kg)	IM profunda	No administrar en caninos menores de 1 año ni felinos menores de 8 meses	Laboratorios Veterinarios Halvet, S.A. de C. V.
Enroxil	5 y 10%	Solución inyectable al 5%: 1 mL/20 kg de peso. (2.5 mg/kg) Solución inyectable al 10%: 1 mL/40 kg de peso (2.5 mg/kg)	IM profunda	Solución inyectable no deben administrarse volúmenes mayores a 10 mL en un mismo sitio de aplicación.	Laboratorios Senosiain, S.A. de C. V. División veterinaria.

Enroxol L.A.	15%	1 ml/ 30 kg de peso. (5 mg/kg).	IM, IV O SC	No se recomienda su uso en equinos ni en perros menores a un año de edad.	Laboratorio s Aranda, S.A. de C.V.
Enroxphorte 10%	10%	1 ml/10 kg de peso (10 mg/kg)	IM, SC y IV lento	No se administre en perros menores a 1 año de edad.	Salud y Bienestar Animal, S. A. de C.V.
Enroxphorte 5%	5%	1 ml/10 kg de peso (5 mg/kg)	IM, SC y IV lento	No se administre en perros menores a 1 año de edad.	Salud y Bienestar Animal, S. A. de C.V.
Farvetryl-10%	10%	1 ml/20 kg de peso. (5mg/kg)	IM profunda o SC y Oral en agua de bebida.	-	Química Farvet, S.A. de C.V.
Farvetryl-5%	5%	1ml/10 kg de peso. (5mg/kg)	IM profunda o SC y Oral en agua de bebida.	-	Química Farvet, S.A. de C.V.
Fiotryl 10%	10%	0.5 ml/10 kg de peso (5 mg/kg)	IM o IV	En caninos evitar su aplicación en menores de un año.	Fiori, S.A. de C.V.
Genoflox	10%	Normal: 1 ml por cada 40 kg de peso corporal. (2.5 mg/kg) Caso agudo: 2 ml por cada 20 kg de peso corporal.(5 mg/kg)	IM profunda	Consulte a su Médico Veterinario	Laboratorio s Genovet, S.A. de C.V.
Parfloxacin a 10% LS	10%	1 ml/10 kg de peso.	Solamente SC	-	Parfarm, S.A.
Vedifloxacina	10%	0.25-0.5 mL/10 kg (2.5-5 mg/kg)	IM	No administrar a equinos y cánidos menores de 1 año.	Vedilab S.A. de C.V.
Vedifloxacina	5%	1-2 mL/20 kg (2.5-5 mg/kg)	IM, SC e IV	No administrar en perros menores de 1 año.	Vedilab S.A. de C.V.

La enrofloxacin es un principio activo cuya eficacia optima antibacteriana depende de logra concentraciones elevadas posterior a su administración ($C_{max} \geq 10$ veces la CMI). Considerando esto es factible pensar que se puede obtener una C_{max} si el preparado tiene una forma farmacéutica de rápida disolución. Una pasta tendrá seguramente una velocidad de disolución mayor que una tableta que no contiene dispersantes, pero además es factible incluir en la pasta

vehículos que puedan relacionarse con favorecer la absorción del principio activo, para la enrofloxacin se ha detectado que es posible promover su absorción mediante la adición de algunos vehículos y sustancias en general^{84,85}. con esta posibilidad de mejorar la absorción (biodisponibilidad) de la enrofloxacin en mente se desarrollaron los prototipos:

- chitosan + enrofloxacin (prototipo 1)
- chitosan + ciclodextrina+ enrofloxacin (prototipo 2)
- poloxamero + enrofloxacin (prototipo 3)
- poloxamero + Ciclodextrina + enrofloxacin (prototipo 4)

En cada uno de estos prototipos se esperaba que los excipientes utilizados aportaran características deseadas al preparado; esto es, aumentar AUC y C_{max}, con poca modificación de T_{max}. Para el primer prototipo con chitosan se aventuró la hipótesis de que podría aumentar las variables dichas en función de un aumento en la absorción del PA como se ha manifestado en otros estudios^{22,27-30}. Adicionalmente se especula que el chitosán permite a ciertas concentraciones mejorar la disolución de fármacos²². Para el segundo prototipo (chitosan, ciclodextrina) además de las características propias del chitosan; de transferir incremento en la absorción y mejorar la disolución de fármacos, se buscó se formaran complejos de inclusión; característica que confieren las ciclodextrinas, y que se caracteriza por entrapar moléculas con el fármaco y cambiarlas, eventualmente con moléculas libres, formándose un “equilibrio cinético”. Para el tercer prototipo (poloxámero, enrofloxacin) se buscó la característica de formación de micelas y mediante estas, la liberación controlada del fármaco, además de la mejora en la solubilidad del principio activo. Para el cuarto prototipo (poloxamero ciclodextrina, enrofloxacin) se intentó combinar los 2 vehículos para otorgarle una liberación controlada, por las micelas formadas por el poloxámero y la formación de complejos de inclusión entrapando moléculas del fármaco.

El análisis farmacocinético de los prototipos 1, 3 y 4 Con respecto al preparado de referencia de baytril, en **ratas** mostró que el prototipo a base de poloxámero (prototipo 3) generó en un tiempo 4 veces mayor un aumento en C_{max} de 0.45 y un porcentaje de 681 % mayor de AUC en comparación con el preparado de referencia; También destaca el prototipo 4 a base poloxamero y ciclodextrina que género en un tiempo 2 veces mayor un aumento en C_{max} de 0.44 y un porcentaje de 6,802.25% en comparación con el preparado de referencia; por último el prototipo 1; que generó en un tiempo 2 veces mayor un aumento en C_{max} de 0.18 y un porcentaje de 141.88% en comparación con el preparado de referencia.

El análisis farmacocinético de los prototipos 1 y 3 Con respecto al preparado de referencia de baytril, en **perros** mostró que el prototipo 3; a base de poloxámero generó en el mismo tiempo (3 horas) un aumento en Cmax de 0.42 y un porcentaje de 315.95 % de AUC en comparación con el preparado de referencia; También destaca el prototipo1 a base chitosan que género en el mismo tiempo un aumento en Cmax de 0.16 y un porcentaje de 161.61% en comparación con el preparado de referencia.

Debido a la importancia que tiene la biodisponibilidad en la relación PK/PD de la enrofloxacin PO y por lo tanto de su efecto terapéutico en el paciente, resulta de interés destacar la farmacocinética del prototipo 3 a base de poloxamero. En el presente estudio se puede observar que estadísticamente existe una diferencia entre las variables de Cmax y AUC de este prototipo con las del referente. Adicionalmente se detectaron diferencias en la Tmax entre el referente y el prototipo 3 que indican diferencias en la liberación y disolución del principio activo en los fluidos orgánicos.

Clínicamente la relevancia de estos resultados radica tanto en la relación Cmax/CMI como en la relación AUC/CMI si se consideran las sensibilidades a tres niveles, como se indica en el cuadro Y en el que detallan los puntos de inflexión o *breakpoints* para enrofloxacin.

Cuadro 23. Sensibilidad de grupos bacterianos a enrofloxacin ³⁵

TIPO DE BACTERIA	CMI (µg/ml)	SENSIBILIDAD
Gram negativo	< 0.5	Muy sensibles
Gram positivo	< 2	Medianamente sensibles
Anaerobios obligados	> 4	Resistentes

Por ejemplo: en el caso de la relación Cmax/CMI90, los resultados obtenidos en el presente estudio para el prototipo 3 quedarían de la siguiente manera: Cmax 3.76 µg/ml y CMI90 de 0.06 µg/mL para *Escherichia coli* sensible, lo que da un factor de 62 que obviamente es suficiente para un efecto clínico óptimo. Si la misma *E. coli* es moderadamete sensible, por ejemplo con una CMI90 de 0.5 como se indica en el cuadro 24, entonces la relación será de 7.52, que será

sub-óptima dado el límite sugerido de $C_{max} \geq 10-12$. No obstante esta relación es superior a la de la tableta de referencia que, dado su C_{max} de 3.4 es de 6.8.

Para *Staphylococcus aureus*, esta misma relación arroja un valor de 15 para el prototipo y 13 para la tableta de referencia, considerando el denominado *breakpoint* de este microorganismo³⁵. Ambas proporciones son ideales para este microorganismo. En contraste, para la CMI90 de *Staphylococcus aureus* (1 µg/mL), como se lista en el cuadro 24, las relaciones serían de 3.74 y 3.4 para el prototipo y el referente, respectivamente. Obviamente estos valores son subóptimos y no se recomendaría el uso de estos preparados para una infección causada por patógenos de este nivel de resistencia.

Cuadro 24. CMI 50 y CMI 90 de los microorganismos sensibles a Enrofloxacin³⁵

MICROORGANISMO	CMI 50 (µg/ml)	CMI 90 (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25	1
<i>Streptococcus spp</i>	0.5	2
<i>Salmonella spp</i>	0.06	0.25
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0.5	1
<i>Proteus mirabilis</i>	0.125	0.5
<i>Pasteurella multocida</i>	0.125	0.5
<i>Klebsiella spp</i>	0.06	0.5
<i>Escherichia coli</i>	0.125	0.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.5	2
<i>Ehrilicha canis</i>	s/d	2
<i>Chlamydia psittaci</i>	s/d	1
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0.125	0.5
<i>Brucella canis</i>	0.06	0.25
Anaerobios obligados	1	16

De la misma manera, la relación AUC/CMI es favorable para el prototipo 1 con respecto al referente, aunque las diferencia no son suficientemente grandes como para marcar una diferencia en la clínica. Por ejemplo, para el tratamiento de la traqueítis inespecífica o tos de las perreras por *Bordetella bronchiseptica*, se tienen valores de AUC/CMI para el prototipo 1 de 20.46 y tan solo de 12.66 para la enrofloxacin de referencia. De ahí que predeciblemente se tendrán mejores resultados clínicos con la pasta del prototipo 3 que con la tableta de enrofloxacin del preparado referente. No obstante, sería de valor confirmar esta hipótesis en estudios posteriores.

El preparado que se hizo se probó en dosis única; es necesario es necesario hacer estudios adicionales para determinar las variables farmacocinéticas en estado estable. También es importante determinar si los vehículos generan efectos adversos, porque al administrarlos en múltiples ocasiones. La FDA no reporta reacciones adversas a la administración oral pero es necesario probarlo. Se señala como desventaja para esta pasta del prototipo 3 el sabor, aunque el poloxámero disminuyo en parte el sabor amargo de la enrofloxacin no fue lo suficiente para evitar muestras de desagrado por parte de los perros.

Por lo que habrá que ensayar con saborizantes que otros vehículos bloquean el sabor, por ejemplo con eudragit que se ha usado en medicamentos para medicina humana⁸⁶.

9.0 Conclusiones

Los estudios realizados permiten deducir que es factible modificar la presentación de la tableta y obtener valores farmacocinéticos más adecuados a los requerimientos pk/pd que existen para este principio activo, no obstante el prototipo logrado como ideal en este ensayo no supera de manera significativa a lo logrado por el referente. A pesar de lo anterior la presentación en pasta permite una dosificación más ágil en el perro y con mayor seguridad para el veterinario, pues puede administrar la dosis mediante una jeringa dosificadora. Falta aún mejorar el sabor y la aceptación del preparado.

10. 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 fluoroquinolones. Suppl Compend Contin Educ Prac Vet 1996; 18 (2): 14-21
3. Otero JL, Mesorino N, Erreclade JO, Enrofloxacin una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria Parte II. Farmacocinética Veterinaria. Analecta Vet 2001; 21 (1): 42-49.
4. Altreuther P. Data on chemistry and toxicology of Baytril. Veterinary Medicine Reviews 1998; 2: 87-89.
5. Sumano LH, Negrón G, Fernández G. Consideraciones practicas y farmacológicas para la medición de antibacterianos en avicultura. Revista Científica. Fac de Ciencias Vet. Universidad de Zulia. 2000; X(3):251-266.
6. Lastres García, JL. Nuevos sistemas orales de liberación modificada. Schironia 2002; (1).
7. Mahato. R. I. Pharmaceutical Dosage Form and Drug Delivery. CRC. Press. 2007, p. 47-73, 173-181, 2002-225.
8. 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
9. Meier. W. Taubert. A. Functionalized Polymer Nanocontainers for Targeted Drug Delivery. Uni-Basel. Buenos Aires Argentina, 2006, p.1-22.
10. Brayden. D.J Novel drug delivery strategies in veterinary medicine. Irish Veterinary Journal Volume 56 (6): June, 2003
11. Ahmed. I. Kasraian. K. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002 (54) p. 871-882.,
12. Controlled Drug Delivery: Challenges and Strategies; Park, K., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1997.
13. Rowe. R. C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Fifth Edition. Pharmaceutical Press. 2006.
14. 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.
15. Dodane V and Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. 1998; 1: 246-253.
16. 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.
17. Onishi H and Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. Biomaterials. 1999; 20: 175-182.
18. 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.)

19. 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.
20. Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery drug development and industrial pharmacy. 1998; 24 (11)979-993.
21. Dodane. V., Vilivalam. D. V. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT*. Vol 1, No. 6, Setember 1998. Senel. S., McClure. S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004 (56) p. 1467-1480.
22. Borchard. G. Modern drug delivery applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001 (52) p. 103.
23. Khor. E. Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in solid State and Materials Science*. 2002 (6) p. 313-317.
24. Khor. E. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003 (24) p. 2339-2349.
25. Dodane V and Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. 1998; 1: 246-253.
26. 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.
27. 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.
28. Khor E and Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003, 24: 2339-2349.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Escobar LL. Interacciones no covalentes analgésicos antiinflamatorios / ciclodextrinas. Doctorado en Ciencias Químicas. Fac.Quim.UNAM. 1998.
33. Szeman, J, Stadier-Szoke, A, Vikmon, M and Szejtli, J. Stabilization of prostacilin and furosemide by cyclodextrins. *Chemical Abstracts*. 1988; 108, 392.

34. Martínez PR, Las ciclodextrinas y su importancia en la industria química. Facultad de Química. UNAM. Licenciatura Ingeniero Químico, México.D.F. 2000.
35. Fernando Doti. Uso práctico de los antibióticos en la clínica de pequeños animales. Ed. Intermédica. 2009
35. Brewster. M.E., Sompkins. J.W. The potential use of ciclodextrins in parenteral formulations. J Parenter Sci Technol 1989; 43: 231-240.
36. Loftsson. T., Ducene. D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics. 2006.
37. 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.
38. Uekama K And Otagiri M. Cyclodextrins in drug carrier systems. CRC Critical Reviews in Therapeutic Carrier Systems. 1987; 3(1). 1-40
39. 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
40. Uekama, K, Hirayama, F and Irie, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. Chemistry Reviews. 1998; 98, 2045 - 2076.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. Batchelor. H Bioadhesive Dosage Forms for Esophageal Drug Delivery. Pharmaceutical Research, Vol. 22, No. 2, February 2005.

48. Akers. M. J. Excipient–Drug Interactions in Parenteral Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 91, No. 11, November. 2002
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Lawrence MJ. Surfactant systems microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. *European journal of drug and pharmacokinetics.* 1994; 19, 257-259.
54. Sherlund M, Welin-Berger K, Brodin A, Malmsten M. Local anaesthetic block copolymer system undergoing phase transition dilution with water. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001 ;14.53-61.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Sherlund M, Brodin A, Malmsten M. Micellization and gelation in block copolymer systems containing local anesthetics. . *Int. J. Pharm.* 2000; 211.37-49
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.

63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. Vaughn M. Nace. *Nonionic Surfactants. Poloxyalkylene Block Copolymers*. Marcel Vol. 60. New York, USA. Dekker, Inc.2000.
68. 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
69. 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.
70. Aline SA. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gaceta Medica Mexicana* 2002;138:295-298.
71. Microcal Origin versión 4.0 Scientific and Technical Graphics in Windows. Microcal Software Inc.
72. Microsoft excel. 1985-97.
73. WinNonlin Professional version 5.1 (Cía. de Harsight CA, EE.UU.)
74. www.jmp.com/software/
75. Sumano LH, Ocampo CL, Gutiérrez OL - Non-bioequivalence of various trademarks of enrofloxacin and Baytril in cows. *DTW. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* - Jul 2001; 108(7); 311-4
76. Gutierrez OL, Sumano LH, Zamora QM. Administration of enrofloxacin and Capsaicin to chickens to achieve higher maximal serum concentrations. *Vet Rec* 2002 Mar 16; 150 (11) 350-3
77. Sumano, L.H., Guti_errez, O.L. & Zamora, M.A. (2001) Bioequivalence of four Preparations of enrofloxacin in poultry. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 24, 309–313.
78. Souza, M.J., Bittencourt, C.F. & Souza Filho, P.S. (2004) Microbiological assay for enrofloxacin injection. *International Journal of Pharmaceutics*, 271, 287–291.

79. Küng, K.; Riond, J. L.; Wanner, M.; **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 1993, 16, 4, pp 462-468, 28 ref. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs.
80. Sumano L.H., Ocampo C.L. y Gutierrez O.L. Non-bioequivalence of 9 trademarks of enrofloxacin and Baytril® in cows. *Dtsch. Tierarzt Wochenschrift*. 108: 311-314 (2001a).
81. Sumano L.H., Gutierrez O.L. and Zamora Q.M.A. Bioequivalence of six trademarks of enrofloxacin in poultry. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 24: 309-313 (2001b).
82. Sumano L.H., Ocampo C.L., Gutiérrez O.L. Bioequivalence of six generic preparations of enrofloxacin in pigs. *The Pig Journal* 51: 64-73 (2003).
83. Sumano LH, Ocampo CL y Gutierrez OL Serum bioequivalence and difusión to milk of 12 trade marks of enrofloxacin and Baytril in cows. Abstract En: XXII World Buiatrics Congress. Hannover, Germany. 18-23 Agosto, 2002.
84. Sumano L.H. and Gutierrez O.L. Administration of capsaicin in poultry to achieve higher maximal serum concentrations of enrofloxacin. *The Veterinary Record*. 150:350-353 (2002).
85. Aguilera J.R., Gutiérrez O.L., Sumano L.H. Enhancement of enrofloxacin serum antibacterial activity by calcium primed broilers. *Research in Veterinary Science*. 82 (1): 80-84 (2007).
86. Simon J.D, Mandal A.,Pick B., Thomas T., Mayberry J.F., Robinson R.J. The short-term effects of Eudragit- L- coated prednisolone metasulphobenzoate (Predocol) on bone formation and bone mineral desnsity in acute ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16 1173-1176 (2004).