



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

“Diseño y evaluación de nuevos sistemas de liberación controlada para el tratamiento de la mastitis bovina subclínica en el periodo seco.”

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:

LYSETT CORONA GOMEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

COMITÉ TUTOR:

MC. LAURA HERNÁNDEZ ANDRADE

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

DR. JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final.

A mis hermanos y amigos, por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. David Quintanar Guerrero por aceptarme para realizar mi tesis de maestría bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de la tesis.

Este proyecto es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo de trabajo. Por lo que agradezco profundamente a mis asesores, MC. Laura Hernández Andrade, Dra. Susana Mendoza Elvira, Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez y Dr. Abel Ciprian Carrasco, quienes a lo largo de este tiempo me han transmitido sus conocimientos y experiencias además de su confianza para el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios en los que trabajé para el desarrollo de la investigación, gracias por sus consejos, experiencias y a el apoyo brindado.

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual me ha brindado la oportunidad de desarrollarme tanto académica como culturalmente y permitiéndome conocer y vivir todo lo que rodea a esta gran institución.

1 **CONTENIDO**

2	RESUMEN	4
3	ABSTRACT	6
4	ABREVIATURAS	8
5	INTRODUCCIÓN	9
6	Marco Teórico	12
6.1	Panorama de la producción láctea en México	12
6.2	Mastitis bovina	13
6.2.1	Clasificación de la mastitis bovina	14
6.2.2	Etiología.	15
6.3	Implicaciones de la Mastitis Bovina	15
6.4	Terapia en el periodo seco	16
6.4.1	Terapia de Secado selectivo	19
6.5	Tilmicosina y timol como principios activos en sistemas de liberación controlada ..	20
6.5.1	Generalidades de los macrólidos	20
6.5.2	Tilmicosina y su uso como tratamiento para la mastitis en el periodo seco	21
6.5.3	Timol, propiedades y su uso en sistemas de liberación controlada	23
6.6	Administración tópica de sistemas de liberación de fármacos	25
6.6.1	Geles	26
6.6.2	Emulsiones.....	28
6.6.3	Emulgel como sistema de liberación de fármacos.	28
6.6.4	Evaluación <i>in vitro</i> de liberación de fármacos.....	30
7	JUSTIFICACIÓN	34
8	HIPÓTESIS	35
9	OBJETIVO GENERAL	35
10	OBJETIVOS PARTICULARES	35
11	MATERIAL Y METODOLOGÍA	36
11.1	Plan Experimental	36
11.2	Material	37
11.2.1	Biológicos.....	37
11.2.2	Medios de cultivo y pruebas bioquímicas	37
11.2.3	Químicos.....	37
11.2.4	Equipos y material de laboratorio.....	38
11.3	METODOLOGÍA	39
11.4	Selección e identificación de cepas	39

11.5	Determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida de tilmicosina y timol	42
11.6	Solubilidad del Timol y de Tilmicosina	43
11.7	Elaboración de las fases que componen el emulgel	44
11.8	Elaboración del emulgel	45
11.9	Evaluaciones reológicas y de estabilidad del emulgel.	46
11.9.1	Color, olor, textura y consistencia del sistema semisólido.	46
11.9.2	Determinación de pH.	46
11.9.3	Gravedad específica.	46
11.9.4	Carga superficial	46
11.9.5	Tamaño de glóbulo del emulgel	47
11.9.6	Viscosidad.	47
11.9.7	Estabilidad	47
11.9.8	Estabilidad acelerada	47
11.10	Validación del método analítico	48
11.11	Perfiles de liberación	48
11.12	Cinética de permeación	50
11.13	Método de extracción de Tilmicosina y Timol retenida en la piel.	51
12	RESULTADOS.	52
12.1	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	52
12.2	Solubilidad del principio activo	54
12.3	Evaluaciones del sistema semisólido.	55
12.3.1	Color, olor y apariencia del sistema semisólido.	55
12.3.2	Potencial de hidrogeno (pH).	56
12.3.3	Gravedad específica.	57
	Tabla 12. Valores de gravedad específica del sistema semisólido emulgel con Tilmicosina y Timol.	57
12.3.4	Carga superficial	58
	Tabla 13. Valores de carga superficial del sistema semisólido emulgel con tilmicosina y timol	58
12.3.5	Tamaño de glóbulo	59
	Tabla 14. Valores de gravedad específica del sistema semisólido emulgel con tilmicosina y timol	59
12.3.6	Viscosidad.	60
	Tabla 15. Valores de cp para medir la viscosidad del sistema semisólido emulgel con Tilmicosina y Timol.	60
12.3.7	Estabilidad	61
12.4	Perfiles de liberación	62
12.4.1	Condiciones del detector, columna cromatográfica.	62
12.4.2	Volumen de inyección, velocidad de flujo y fase móvil.	62
12.4.3	Validación del método analítico.	63
12.5	Resultados de Perfiles de liberación	66
12.6	Resultados de Cinética de permeación	68
12.7	Resultados de extracción de Tilmicosina y Timol retenida en la piel.	69

13	DISCUSIÓN.....	70
13.1	Efecto antimicrobiano de los principios activos.....	70
13.2	Estabilidad del emulgel.....	72
13.2.1	Estabilidad.....	72
13.2.2	pH.....	73
13.2.3	Gravedad específica.....	74
13.2.4	Potencial Z.....	74
13.2.5	Tamaño de partícula.....	75
13.2.6	Viscosidad.....	75
13.2.7	Estabilidad de anaquel y estabilidad acelerada.....	76
13.3	Perfil de liberación de timol y tilmicosina.....	78
13.4	cinética de permeación del emulgel con timol y tilmicosina.....	78
14	CONCLUSIONES.....	81
15	PERSPECTIVAS.....	82
16	BIBLIOGRAFÍA.....	83

2 RESUMEN

La mastitis bovina es una enfermedad que se define como una inflamación de la glándula mamaria, comúnmente causada por infecciones bacterianas intramamarias y que origina importantes pérdidas económicas en la industria lechera. La mastitis subclínica es la presencia de una infección sin signos aparentes de inflamación local o afectación sistémica. La detección de animales con mastitis subclínica se realiza por medio del examen de la leche para el recuento de células somáticas mediante la prueba de California; los recuentos de células somáticas se correlacionan positivamente con la presencia de infección. La identificación del agente etiológico, por medio de pruebas bacteriológicas es primordial para el control de la mastitis bovina, aunado al uso adecuado de antibióticos, así como medidas profilácticas para el control de dicha enfermedad. El período seco representa un momento crítico en el ciclo de producción donde la susceptibilidad a una nueva infección intramamaria es elevada; sin embargo, este tiempo brinda la oportunidad para la terapia antibiótica intramamaria extendida para curar infecciones existentes y para disminuir la incidencia de nuevos procesos infecciosos al parto. El objetivo del estudio fue desarrollar un sistema semisólido tipo emulgel tópico para el tratamiento en el secado que tuviera como principios activos timol, que es un compuesto monoterpeno monocíclico obtenido de *Thymus vulgaris*, *Monarda punctate* o *Origanum vulgare spp* y tilmicosina un antibiótico macrólido semisintético de uso exclusivo en la clínica veterinaria. Se realizó la caracterización mediante pruebas de reológicas y de estabilidad por un periodo de 6 meses y se determinó que presenta buena conservación y estabilidad durante este tiempo. Se determinó el efecto antimicrobiano del timol y la tilmicosina contra cepas de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Escherichia coli* aisladas de casos de mastitis bovina de ganaderías localizadas en el centro y norte de México. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración fraccionada inhibitoria (CFI) mediante la técnica de microdilución en placa, se utilizaron 10 cepas de cada bacteria, para el caso de *Staphylococcus* fueron 4 ATCC y 6 de campo, *Streptococcus* 1 ATCC y 9 de campo y para *E. coli* 2 ATCC y 8 de campo. Los resultados obtenidos de la CMI₉₀ de Tilmicosina con las cepas de *Staphylococcus* de $2.65 \mu\text{g/mL} \pm 1.14$, *Streptococcus* $1.77 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$, *E. coli* $1.47 \pm 0.52 \mu\text{g/ml}$. Con el Timol se obtuvieron para *Staphylococcus* de 429.68 ± 123.53

$\mu\text{g/ml}$, *Streptococcus* de $664.06 \pm 370.58 \mu\text{g/ml}$ y *E. coli* $976.53 \pm 887.91 \mu\text{g/ml}$. Se realizó la prueba de ANOVA para cada grupo de cepas obteniendo valores de $p \geq 0.05$, por lo que no se encontró diferencia significativa.

Se realizaron perfiles de liberación y de acuerdo con los modelos matemáticos se determinó que la liberación de los activos tilmicosina y timol al inicio de la cinética de liberación es de tipo orden cero para posteriormente cambiar a una cinética de tipo Fick.

Se realizaron estudios de permeación y los resultados se ajustan el modelo de Higuchi para los activos tilmicosina y timol lo que indica que el mecanismo de absorción es mediante difusión.

Palabras clave: Mastitis, Tilmicosina, Timol, Secado.

3 ABSTRACT

Bovine mastitis is a disease defined as an inflammation of the mammary gland, commonly caused by intramammary bacterial infections and that causes significant economic losses in the dairy industry. Subclinical mastitis is the presence of an infection with no apparent signs of local inflammation or systemic involvement. The detection of animals with subclinical mastitis is performed by examining the milk for the somatic cell count by the California test; somatic cell counts correlate positively with the presence of infection. The identification of the etiologic agent, by means of bacteriological tests, is essential for the control of bovine mastitis, together with the appropriate use of antibiotics, as well as prophylactic measures for the control of said disease. The dry period represents a critical moment in the production cycle where susceptibility to a new intramammary infection is high; However, this time provides the opportunity for extended intramammary antibiotic therapy to cure existing infections and to decrease the incidence of new infectious processes at delivery. The objective of the study was to develop a topical emulgel-type semi-solid system for drying treatment that had thymol as active ingredients, which is a monocyclic monoterpene compound obtained from *Thymus vulgaris*, *Monarda punctate* or *Origanum vulgare spp* and tilmicosin a semisynthetic macrolide antibiotic for use Exclusive in the veterinary clinic. The characterization was performed by rheology and stability tests for a period of 6 months and it was determined that it has good conservation and stability during this time. The antimicrobial effect of thymol and tilmicosin was determined against strains of *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Escherichia coli* isolated from cases of cattle mastitis located in central and northern Mexico. The minimum inhibitory concentration (MIC) and fractional inhibitory concentration (FIC) were determined using the plate microdilution technique, 10 strains of each bacterium were used, in the case of *Staphylococcus* were 4 ATCC and 6 field, *Streptococcus* 1 ATCC and 9 field and for *E. coli* 2 ATCC and 8 field. The results obtained from the MIC₉₀ of Tilmicosin with *Staphylococcus* strains of $2.65 \mu\text{g} / \text{mL} \pm 1.14$, *Streptococcus* $1.77 \pm 0.9 \mu\text{g} / \text{ml}$, *E. coli* $1.47 \pm 0.52 \mu\text{g} / \text{ml}$. The results obtained from Timol, $429.68 \pm 123.53 \mu\text{g} / \text{ml}$, *Streptococcus* of $664.06 \pm 370.58 \mu\text{g} / \text{ml}$ and *E. coli* $976.53 \pm 887.91 \mu\text{g} / \text{ml}$ were

obtained for *Staphylococcus*. The ANOVA test was performed for each group of strains obtaining values of $p \Rightarrow 0.05$, no significant difference was found.

Release profiles were made and according to the mathematical models it was determined that the release of the active tilmicosin and thymol at the beginning of the release kinetics is of the zero order and subsequently changed to a Fick kinetics.

Permeation studies were performed and the results fit the Higuchi model for the active tilmicosin and thymol which indicates that the mechanism of absorption is by diffusion.

Key words: Mastitis, Thilmicosin, Thymol, Drying.

4 ABREVIATURAS

µg microgramos

µl microlitros

ACN Acetonitrilo

ANOVA Análisis de Varianza

API Índice de perfil analítico.

ATCC American Type Culture Collection.

BHI Infusión Cerebro- Corazón.

CAMP Christie- Atkins- Munch- Peterson, prueba para identificar *Streptococcus*.

CCS Conteo Celular Somático.

CFI Concentración Fraccionada inhibitoria.

CMB Concentración Mínima Bactericida.

CMI Concentración Mínima inhibitoria.

CMI₉₀ Concentración Mínima inhibitoria 90%.

cP centipoise

CV Coeficiente de Variación

DMSO Dimetilsulfóxido.

E. coli *Escherichia Coli*.

FDA Administración de Alimentos y Medicamentos.

FICI Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada.

Ge Gravedad Específica

Gram Método de tinción bacteriana.

GRAS Generalmente reconocido como seguro.

HPLC Cromatografía líquida de alta eficacia.

Kg Kilogramos.

mg miligramos

ml mililitros

mV Milivoltios

Nm Nanómetros

O/W Emulsión aceite /agua.

°C Grados Centígrados

PCR Reacción en Cadena de a Polimerasa.

pH potencial de Hidrogeniones

SAGARPA Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.

spp especies.

TCM Triglicéridos de Cadena Media

TMS Tilmicosina.

5 INTRODUCCIÓN

La mastitis es una enfermedad compleja que se define como una inflamación de la glándula mamaria^{1,2}, es causada comúnmente por una infección intramamaria provocada por patógenos, lesiones y con menor frecuencia por alergias y neoplasias³.

Es considerada una de las enfermedades más importantes que afecta la industria lechera; pues ocasiona pérdidas económicas estimadas a 35 billones de dólares americanos anualmente a nivel mundial⁴, debido a la disminución en el rendimiento de leche, aumento en el número de tratamientos clínicos, eliminación de vacas, gastos de honorarios veterinarios, costos por el control de residuos de antibióticos, calidad de leche, degradación de los lácteos por alto contenido bacteriano, células somáticas, la interferencia en el mejoramiento genético y ocurrencia de enfermedades concomitantes, se ha reconocido como la enfermedad más costosa en hatos lecheros^{5,6}.

En la actualidad, se han reportado una amplia gama de microorganismos causantes de mastitis, entre las que destacan *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Mycoplasmas spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*^{7,8}.

La inflamación se da como respuesta a la infección con el propósito de eliminarla y como consecuencia, suceden cambios en la composición de la leche. Los componentes normales de la leche disminuyen y se incrementa la presencia de componentes sanguíneos indeseables. La magnitud de estos cambios es variable entre vacas y depende de la duración, la severidad de la infección y del microorganismo causante.

La identificación del agente etiológico, por medio de pruebas bacteriológicas, moleculares y serológicas es primordial para el control de la mastitis bovina⁹, aunado al uso adecuado de antibióticos, así como medidas profilácticas para el control de dicha enfermedad^{10,11}. Cuando el tratamiento antibiótico falla, puede ser por las siguientes causas:

1. Que el antibiótico no llegue al sitio de infección.
2. Porque el antibiótico no cuenta con el vehículo apropiado para lograr una buena difusión en todo el cuarto, especialmente hacia el tejido infectado.
3. Porque alrededor del sitio de infección se forman abscesos y fibrosis, lo que no permite el contacto del antibiótico con los microorganismos¹².

4. Porque las concentraciones de antibiótico en los tejidos infectados no alcanzan el nivel mínimo efectivo para matar a los microorganismos.
5. Porque el antibiótico administrado por vía sistémica no pasa de la sangre a la leche debido a sus características farmacocinéticas.
6. Que los microorganismos causantes de la infección sean resistentes al antibiótico¹³.

En el ganado lechero, el objetivo del tratamiento de la vaca seca es tratar y prevenir las infecciones intramamarias durante el período de 45 a 60 días antes al parto en el que las vacas no se ordeñan (período seco)¹⁴⁻¹⁶. El tratamiento en vacas secas minimiza el número de casos clínicos de mastitis durante la lactancia subsecuente¹⁷⁻¹⁹. Por lo tanto, el período seco se considera un punto de intervención clave para la prevención de futuros casos de mastitis y una oportunidad para disminuir el impacto económico de la mastitis en las unidades de producción. Aunque no está exento de controversia, el método más aceptado para la prevención de las infecciones intramamarias en vacas lecheras durante el período seco es la administración de antimicrobianos, preferentemente por vía intramamaria y la mayoría de los productos comerciales disponibles para vacas secas contienen un antimicrobiano^{6,20,21}.

En diferentes estudios sugieren que del 71% al 85% de las infecciones intramamarias subclínicas presentes en el momento del tratamiento de la vaca seca (primer día de periodo seco) se resolverá; sin embargo, existen resultado que indican que del 37% al 56% de las infecciones intramamarias presentes en el secado se resolverán espontáneamente sin administración antimicrobiana²².

La tasa de curación de las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* después de la administración de antimicrobianos es mucho más bajo que el de las infecciones intramamarias causadas por otros patógenos bacterianos y varía entre 27% y 80%²²⁻²⁴.

La amplitud de este rango es comprensible considerando la variación de los protocolos de tratamiento utilizados y el variable estado de salud de las vacas. Los factores que afectan la tasa de curación de las infecciones intramamarias incluyen, la edad de la vaca, la glándula

que se está tratando, ya sea las glándulas mamarias anteriores o posteriores (cuartos), el porcentaje de tejido infectado de la glándula mamaria, duración de la infección actual, el estado inmunitario de la vaca tratada, etc. Las infecciones intramamarias causadas por *S. aureus* son particularmente difíciles de tratar porque el patógeno a menudo queda secuestrado dentro de neutrófilos, macrófagos y células epiteliales donde puede replicarse y seguir siendo viable incluso frente a la administración de antimicrobianos^{22,23,25,26}.

Una vez que *S. aureus* se hospeda en la glándula mamaria, se combinan varias características de la infección para reducir la efectividad de la terapia con antibióticos. La formación de tejido cicatricial y la formación de microabscesos en el tejido mamario pueden restringir el acceso vascular al sitio de infección, dificultando la penetración de los antibióticos. Además, bajo ciertas condiciones, se pueden inducir formas L de *S. aureus*, lo que permite que los organismos se resistan a ciertos antibióticos²⁷.

6.1 PANORAMA DE LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN MÉXICO

La producción mundial de leche en 2018 se estima en 843 millones de toneladas, un aumento del 2.2% desde 2017, impulsado por expansiones de producción en India, Turquía, Unión Europea, Pakistán, Estados Unidos de América y Argentina, pero parcialmente compensado por las caídas en China y Ucrania, entre algunos otros²⁸.

Desde el inicio de los años noventa, la producción de leche en México creció a una tasa media anual de 1.3%, ocupando el lugar dieciséis en la producción mundial del lácteo, con un 3% del total. De acuerdo con SIAP-SAGARPA (2014), la producción de leche de bovino en 2014 fue de 11,108.4 millones de litros, con valor de 62,000 millones de pesos. Sin embargo, la producción interna sólo contribuye a satisfacer el 80% del consumo nacional, razón por la cual México ocupa el primer lugar mundial en importaciones de leche en polvo, con un 9% del total²⁹.

México figura dentro de los principales países productores de leche en el mundo, en el mercado mundial se observa que la producción de leche se divide en dos grandes grupos integrados, por un lado, por los países altamente desarrollados tales como los Estados Unidos y los ubicados en Europa, producción que obtienen con elevados programas de subsidios; y, por otra parte, los países con bajos costos de producción como Australia, Nueva Zelanda, Argentina y Uruguay, quienes poseen condiciones agroclimáticas muy favorables para la producción y cuentan con la infraestructura necesaria para una producción eficiente. En el caso de México, es destacable que dos a tres de cada cien litros que se producen en el mundo, son de origen mexicano, lo cual coloca a nuestro país en la posición 16 en este rubro²⁹.

De acuerdo con el Censo Agropecuario de 2007, en México existen 1.1 millones de unidades de producción de ganado bovino. El 58% de éstas son para engorda; el 34% mantienen vientres: para leche (40%), carne (32%) o doble propósito (28%); y el resto produce principalmente sementales. Dentro del subsector pecuario, la producción de bovinos (carne y leche) es la más importante, ya que genera el 43% del valor total del subsector. En 2013, se obtuvieron 134,000 mdp por este concepto, de los cuales 60,400 mdp correspondieron a leche. México produce alrededor de 11,000 millones de litros de

leche cada año. Entre los años 2007 y 2014 el crecimiento promedio anual de la producción de leche fue de 1.0%. Cinco estados en el país muestran un mayor dinamismo en su actividad lechera y aportaron alrededor del 57% de la producción total nacional de leche en 2014. Se estima que en el 2019, la producción será de 12, 279 millones de litros, lo que represente un 2.3% más que el año anterior^{30,31}.

6.2 MASTITIS BOVINA

La mastitis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de la glándula mamaria, en la cual la inflamación se produce como respuesta a la invasión a través del canal del pezón de diferentes tipos de bacterias, micoplasmas, hongos, levaduras y hasta algunos virus. Sin embargo, las bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y algunas bacterias Gram -, son responsables de más del 90 % de los casos clínicos y subclínicos. La enfermedad puede cursar como subclínica o como clínica, con alteraciones macroscópicas de la leche y síntomas palpables de la ubre y, a veces, de tipo sistémico en todo el animal. Se le ha definido como una “enfermedad multifactorial”, porque el riesgo de infección depende de la habilidad de la vaca para rechazarla, del tipo, número y patogenicidad de las bacterias presentes en el sistema de producción y de las condiciones del medio ambiente, el manejo en general y del ordeño en particular que se estén desarrollando en el sistema de producción lechera³².

Las bacterias que pueden producir mastitis sobreviven en diferentes nichos ecológicos, difiriendo por lo tanto en su mecanismo de transmisión e infección y en la facilidad con la cual pueden ser controladas. *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* están fundamentalmente asociados a ubres infectadas, lesiones de los pezones y colonización del canal del pezón, transmitiéndose de vaca a vaca y de cuarto a cuarto al momento del ordeño o poco después³².

6.2.1 Clasificación de la mastitis bovina

Las infecciones intramamarias se describen a menudo como mastitis clínica o subclínica. La mastitis subclínica es la presencia de una infección sin signos aparentes de inflamación local o afectación sistémica. Aunque pueden aparecer episodios transitorios de leche anormal o inflamación de la ubre, estas infecciones son en su mayor parte asintomáticas y, si la infección persiste durante al menos 2 meses, se denominan crónicas³³. Una vez establecidas, muchas de estas infecciones persisten durante las lactaciones completas o la vida de la vaca. La detección se realiza mejor mediante el examen de la leche para el recuento de células somáticas (predominantemente neutrófilos) mediante la prueba de mastitis de California; los recuentos de células somáticas se correlacionan positivamente con la presencia de infección³⁴.

La mastitis clínica es una respuesta inflamatoria a la infección que produce leche visiblemente anormal, por ejemplo, cambio de coloración, presencia de coágulos de fibrina^{35,36}. A medida que aumenta la extensión de la inflamación, también pueden aparecer cambios en la ubre, como hinchazón, calor, dolor, enrojecimiento. Los casos clínicos que incluyen solo signos locales se conocen como leves o moderados. Si la respuesta inflamatoria incluye afectación sistémica (fiebre, anorexia, shock), el caso se denomina grave. Si el inicio es muy rápido, como ocurre con frecuencia en casos clínicos graves, se denomina caso agudo de mastitis. Las vacas más severamente afectadas tienden a tener secreciones más serias en el cuarto afectado³⁷. Aunque cualquier número de cuartos pueden ser infectados simultáneamente en mastitis subclínica, típicamente solo un cuarto a la vez mostrará mastitis clínica.

La mastitis gangrenosa también puede ocurrir, particularmente cuando las infecciones subclínicas y crónicas de *S. aureus* se vuelven severas en momentos de inmunosupresión, por ejemplo, en el parto. Al igual que con la mastitis subclínica, el cultivo de muestras de leche recolectadas de los cuartos afectados es el único método confiable para determinar la etiología de los casos clínicos³⁸.

6.2.2 Etiología.

En la actualidad se han reportado más de 100 microorganismos como causantes de infección intramamaria^{39,40}. La mayoría de las infecciones, incluidas las de importancia económica, son ocasionadas por especies de estafilococos, estreptococos y bacterias Gram-negativas; las últimas son esencialmente coliformes⁴⁰. Estos microorganismos causantes de infección intramamaria han sido divididos en patógenos contagiosos y ambientales; en base a su asociación epidemiológica con la enfermedad y a su proclividad de causar la infección oportunista, persistente o transitoria, respectivamente⁴⁰. Dependiendo asimismo, de su reservorio primario y el ambiente contra el cuarto de la glándula mamaria infectada. Los patógenos contagiosos incluyen al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp.*, y *Mycoplasma spp*^{39,41}. Estos organismos se transmiten de vaca a vaca, donde el reservorio primario que alberga los patógenos es el animal infectado o el cuarto de la ubre y la exposición de los cuartos mamarios no infectados se restringe al proceso de la ordeña^{39,42}. Los patógenos ambientales a diferencia de los contagiosos son transmitidos entre las ordeñas por el ambiente que sirve como la fuente primaria de estos organismos. Los patógenos principales en este grupo son los bacilos entéricos Gram-negativos *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, y Gram-positivos como *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, y *Enterococcus spp*³⁹.

6.3 IMPLICACIONES DE LA MASTITIS BOVINA

La mastitis ha sido reconocida como el motivo más frecuente del uso de antibióticos en ganado lechero. En un estudio reciente en 20 lecherías convencionales de Wisconsin, el 80% de todos los antimicrobianos utilizados fueron para el tratamiento o la prevención de mastitis; el 50% de todos los medicamentos antimicrobianos utilizados fueron exclusivamente para tratamiento de mastitis clínica. Los problemas atribuidos al uso de antimicrobianos en animales incluye los residuos de antibióticos y el potencial de desarrollo de resistencia bacteriana a los antibióticos⁴³.

Se ha observado que del 10 al 40% de los cultivos de los casos clínicos de mastitis no producen crecimiento bacteriano, por lo que no requieren terapia antimicrobiana; otro 40%

de cultivos positivos (Gram negativos, levadura) no son susceptibles a la mayoría de los medicamentos antimicrobianos intramamarios aprobados, además, una gran proporción de infecciones Gram negativas se eliminan rápidamente por el sistema inmune propio de la vaca, aunque ocurre persistencia ocasional de infecciones Gram negativa; por el contrario, la terapia intramamaria con antibióticos se recomienda habitualmente para infecciones causadas por organismos Gram positivos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y especies de estreptococos ambientales⁴⁴.

6.4 TERAPIA EN EL PERIODO SECO

El período seco representa un momento crítico en el ciclo de producción donde la susceptibilidad a una nueva infección intramamaria es elevada; sin embargo, este tiempo sin lactancia también brinda la oportunidad para la terapia antibiótica intramamaria extendida para curar infecciones existentes y para disminuir la incidencia de nuevos procesos infecciosos al parto. La terapia de la vaca seca se considera uno de los componentes más importantes de un programa de control de mastitis, principalmente porque disminuye el número de infecciones por estafilococos y estreptococos⁴⁵.

El período seco de vacas lecheras se considera como un período durante el cual la vaca puede restaurar su condición corporal y regenerar su epitelio mamario para obtener un alto rendimiento en la lactación sucesiva^{46,47}.

Los componentes antibacterianos de defensa continúan manteniéndose a altas concentraciones en comparación con las concentraciones encontrados durante la lactancia, y la incidencia de nuevas infecciones intramamarias es menor que en cualquier otro período. La última fase de la etapa no lactante es el período de calostrogénesis, que comienza aproximadamente 2 semanas antes del parto y continúa varios días después de la lactancia. La susceptibilidad a una infección intramamaria aumenta durante este tiempo, especialmente a los patógenos ambientales.^{48,49} La susceptibilidad a una infección es alta en el período seco temprano y tardío mientras disminuye sustancialmente en el período seco medio⁵⁰. Las razones de este aumento del riesgo de infección en el periodo temprano y

tardío radican es la alta exposición a organismos infecciosos, y a la capacidad disminuida para montar una respuesta a una infección intramamaria.^{48,51}

La terapia se administra bajo la premisa de que los costos de tratamiento serán superados por los aumentos de producción después de la eliminación de la infección⁵². En el caso de patógenos contagiosos, la eliminación también puede resultar en una disminución del reservorio de infección para vacas previamente no infectadas. No se producirán pérdidas económicas significativas como resultado de retrasar la terapia hasta que se pueda completar el cultivo bacteriano⁵³. Sin embargo, muchos casos subclínicos seleccionados como posibles candidatos para el tratamiento tienen infecciones crónicas; particularmente en el caso de *S. aureus*, la predicción del resultado terapéutico mediante pruebas *in vitro* no siempre es confiable⁵². La distribución de fármacos después de la administración intramamaria puede no ser adecuada debido a la extensa fibrosis y la formación de microabscesos en la glándula; es crítico evaluar el estado inmunológico de la vaca desde una perspectiva de la duración de la infección, el número de cuartos infectados y otras variables^{54,55}. La prevalencia de la infección por *S. agalactiae* puede reducirse rápidamente al tratar el hato completo⁵⁶.

El uso de medicamentos que se originan en viales de dosis múltiples (etiquetados para terapia sistémica) no se debe usar para la terapia intramamaria, porque las preparaciones comerciales intramamarias tienen estándares de control de calidad superiores para la esterilidad y una mejor confiabilidad para predecir los períodos de retención de leche y carne después del tratamiento. Es crítico aplicar técnicas asépticas estrictas siempre que se administre cualquier producto de infusión intramamaria^{57,58}.

La mayoría de los otros estreptococos también muestran susceptibilidad *in vitro* a numerosos antibacterianos, especialmente los medicamentos β -lactámicos. A pesar de esta aparente susceptibilidad, muchas infecciones estreptocócicas no se curan tan fácilmente como las causadas por *S. agalactiae*. En general, las infecciones subclínicas causadas por *S. uberis* y *S. dysgalactiae* deben tratarse preferentemente al final de la lactancia con infusiones intramamarias de productos de vacas secas comerciales. Las tasas de curación en este momento pueden superar el 75%^{59,60}.

Las infecciones intramamarias de *S. aureus* a menudo resultan en abscesos profundos^{55,61}. La terapia es difícil, porque la resistencia a los antibacterianos (en particular los β -lactámicos) es más común que en las infecciones por estreptococos, y el *S. aureus* puede sobrevivir intracelularmente después de la fagocitosis cuando se reducen las concentraciones de antibacterianos. Las infusiones intramamarias pueden curar solo del 35% al 40% de las infecciones; sin embargo, este número será sustancialmente menor para las infecciones crónicas^{55,60}.

La tasa de éxito de la terapia para las infecciones intramamarias subclínicas crónicas causadas por *S. aureus* puede aumentar al usar la terapia tanto parenteral como intramamaria. Sin embargo, la terapia sistémica involucra el uso de fármacos adicionales y los períodos de retención de leche y carne deben determinarse con criterio. La terapia debe administrarse durante períodos lo suficientemente prolongados (7 a 10 días) para permitir la eliminación efectiva del patógeno. Es más económico y es menos probable que produzca residuos en la leche si esta terapia se aplica a vacas secas¹⁰. Dependiendo de las pruebas de susceptibilidad, los fármacos antibacterianos lipófilos que se distribuyen bien en el tejido mamario, como la oxitetraciclina (11 mg / kg / día) son los mejores candidatos para la administración sistémica, aunque varios estudios han encontrado que la oxitetraciclina (administrada durante 4 días o menos) es ineficaz⁶². Las tasas de curación pueden no ser mucho mejores que las obtenidas mediante la curación espontánea, y la curación debe definirse críticamente. Los cuartos afectados deben controlarse bacteriológicamente durante ≥ 30 días para abarcar el período refractario cuando las bacterias no pueden aislarse^{63,64}.

Ocasionalmente, se producirá agalactia prematura en cuartos infectados crónicamente, particularmente cuartos infectados con patógenos resistentes. El sacrificio puede ser una opción práctica para estas vacas. Alternativamente, es común secar el cuarto infectado y continuar ordeñando a la vaca. El objetivo es eliminar la infección causando fibrosis en el cuarto afectado, reduciendo así el riesgo de un cambio patogénico adicional o efectos sistémicos en la vaca, así como reduciendo el riesgo de infección para otras vacas^{24,65}.

Numerosos productos comerciales están disponibles e incluyen penicilina, cloxacilina, cefapirina, ceftiofur o novobiocina^{66,67}. Un tubo por cuarto es suficiente y debe administrarse inmediatamente después del último ordeño de la lactancia. La terapia no debe repetirse por infusión intramamaria; Si existe la necesidad de extender la terapia, se debe

utilizar la administración sistémica como complemento de la infusión intramamaria. Además de eliminar las infecciones subclínicas existentes, una de las funciones más críticas de la terapia con vacas secas es prevenir nuevas infecciones; sin embargo, la mayoría de los productos de vacas secas comerciales tienen poca o ninguna actividad contra los patógenos Gram negativos, y su administración al inicio del período seco no será efectiva contra las nuevas infecciones que comienzan durante el período del parto⁶⁶⁻⁶⁹. Muchas infecciones en las novillas de primer parto son causadas por especies estafilocócicas distintas de *S. aureus*, que tienen una alta tasa de curación espontánea. Sin embargo, bajo algunas condiciones del hato, una parte sustancial de las novillas se infectan al momento del parto; algunas de estas infecciones son causadas por patógenos como *S. aureus*. Las fuentes potenciales incluyen la leche (alimentada a los terneros) y sitios del cuerpo como las amígdalas y la piel. También existe un factor de riesgo geográfico, la dermatitis por picadura de mosca del extremo del pezón, que compromete esta importante barrera física a la infección, puede desempeñar un papel en la patogénesis.

6.4.1 Terapia de Secado selectivo

El secado selectivo consiste en el empleo racional del antibiótico en el momento en que se seca a la vaca, de manera que en todos aquellos animales que no han padecido mastitis clínicas no se les administra un antibiótico de secado. En los animales con una ubre sana supone un riesgo innecesario aplicar un antibiótico⁷⁰.

Cuando se decide aplicar el secado selectivo se pretende:

- Reducir el consumo y promover el uso racional de los antibióticos.
- Reducir el riesgo de inhibidores en el tanque.
- Reducir el costo de tratamientos.
- Descartar menos leche en partos avanzados.
- Mantener el estatus de salud de la ubre

Los criterios para seleccionar a los animales que serán tratados serán diferentes dependiendo de las características de cada hato, y será necesario disponer de registros mensuales de Conteos de Células Somáticas (CCS) y un historial sobre casos de mamitis⁷¹. En general, explotaciones sin casos recientes de mamitis clínica y cuyo CCS en la leche del

tanque sea inferior a 250.000 células/ml durante al menos 4 meses de los últimos 6 serán consideradas de bajo riesgo y por tanto buenas candidatas a adoptar la terapia selectiva^{71,72}. En este caso sería conveniente realizar un CCS a nivel individual, y a ser posible también un diagnóstico mediante cultivo y/o PCR para detectar animales infectados, de forma que solamente recibirán tratamiento antibiótico los animales con un CCS superior a 200.000 células/ml y/o presencia de patógenos, a los animales que no cumplan estos requisitos se les considerará de bajo riesgo y solamente se les aplicará el sellado interno de los pezones⁷⁰. Las explotaciones con CCS superiores a 250.000 células/ml, con problemas de *Streptococcus agalactiae* o que presenten algún riesgo excepcional (cambios en las instalaciones, nuevas máquinas de ordeño, etc.) se considerarán de alto riesgo y por ello deberán aplicar el secado con antibióticos con la finalidad de mejorar la sanidad de las ubres antes de la siguiente lactación^{67,70}. La clave está por tanto en determinar qué información usar para decidir si una vaca debe ser tratada con antibióticos durante el secado, y el protocolo óptimo variará entre hatos, así como los parámetros de CCS; en cualquier caso, estas medidas deberán ir siempre acompañadas de buenas prácticas de higiene y bioseguridad que contribuyan a prevenir y controlar las infecciones en los animales^{67,70,71}.

6.5 TILMICOSINA Y TIMOL COMO PRINCIPIOS ACTIVOS EN SISTEMAS DE LIBERACION CONTROLADA

6.5.1 Generalidades de los macrólidos

Los macrólidos son una amplia familia de antibióticos naturales y semisintéticos obtenidos a partir de productos metabólicos del *Streptomyces spp*⁷³. Los macrólidos (macro: grande y olido: lactona) son moléculas lipofílicas que poseen como centro de su estructura un anillo lactona de 12 a 16 átomos, pocas o ninguna ligadura doble y carecen de átomos de nitrógeno. El anillo lactona se encuentra unido por enlaces glucosídicos a desoxiazúcares aminados. La diferencia entre los compuestos de esta familia precisamente está dada por la cantidad de átomos que posee la molécula. Los compuestos con máximo potencial son

aquellos con anillo 14-, 15- o 16- membrado, la mayoría de los cuales derivan de la eritromicina⁷⁴.

Se les considera agentes bacteriostáticos, aunque pueden ejercer efecto bactericida en determinadas condiciones. Actúan sobre la subunidad ribosomal 50S e interfieren en la síntesis proteica. Son particularmente activos contra bacterias grampositivas y micoplasmas. Su actividad frente a anaerobios se considera favorable a buena, no siendo así frente a gramnegativos, los cuales generalmente presentan resistencia⁷⁴.

En medicina veterinaria los macrólidos de origen natural comúnmente utilizados son la eritromicina, la espiramicina y la tilosina. En los últimos años han aparecido en el mercado nuevos macrólidos sintéticos de uso exclusivo en medicina veterinaria, la tilmicosina, sintetizada a partir de la tilosina y la tulatromicina, derivada de los azálidos. Entre las ventajas de los macrólidos podemos mencionar las altas concentraciones intracelulares alcanzadas, amplia distribución en el organismo, vida media prolongada y actividad contra importantes patógenos microbianos. La acumulación intracelular dentro de células fagocíticas es muy interesante, ya que puede generar un efecto inmunomodulador, observado en la mayoría de los macrólidos⁷⁵.

6.5.2 Tilmicosina y su uso como tratamiento para la mastitis en el periodo seco

La fórmula molecular de la tilmicosina es: $C_{46}H_{80}N_2O_{13}$, la estructura química se muestra en la Fig. 4, con un peso molecular de 869.15. Es soluble en solventes orgánicos como hexano, acetona, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, etil acetato, metanol y tetrahidrofurano; su solubilidad en agua es dependiente de la temperatura y del pH. El producto comercial está constituido por una mezcla de 82-88% del isómero *cis* y un 12 - 18% del isómero *trans*.

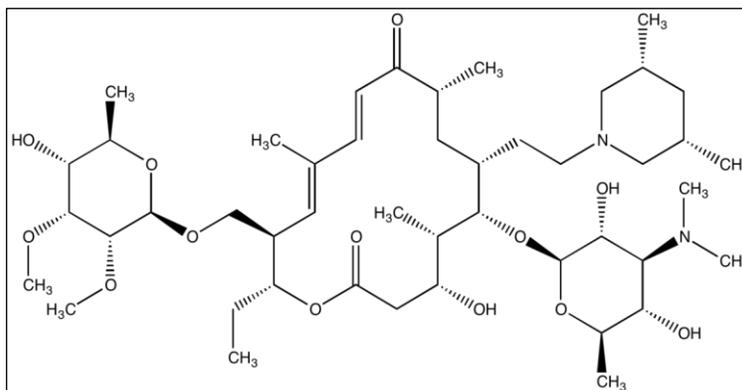


Fig. 4. Estructura química de la tilmicosina⁷⁵.

La tilmicosina es un antibiótico predominantemente no ionizado, altamente liposoluble y parcialmente ligado a proteínas. Estas características le permiten pasar a través de las membranas celulares y distribuirse en el cuerpo del animal rápida y ampliamente; es incorporada y transportada fundamentalmente por los macrófagos y polimorfonucleares activados. Pasa a través de la pared de estas células blancas llegando al lisosoma. Una vez que los macrófagos, toman contacto con las bacterias, comienza a emitir pseudópodos con el fin de englobarlas y esta pasa al contenido celular del macrófago y de allí al lisosoma donde existe tilmicosina, produciéndose dos acciones: por un lado, la tilmicosina afecta la síntesis proteica bacteriana evitando la multiplicación y por el otro las enzimas lisosomales destruyen a la bacteria.

Este fármaco posee propiedades que podrían resultar favorables para combatir las infecciones intramamarias del período seco, especialmente las infecciones subclínicas de *S. aureus*. Estas propiedades incluyen las interacciones observadas *in vitro* del antibiótico con fagocitos bovinos y células epiteliales²⁷. Se ha utilizado como un infusión intramamaria (1.500 mg / cuarto) para tratar vacas con infecciones intramamarias causadas por *S. aureus* en el secado, y las tasas de curación informadas varían del 62% al 74,2%²³.

La tilmicosina tiene amplio espectro, con actividad muy significativa frente a bacterias Gram positivas, ciertas Gram negativas y micoplasmas como se describe en la tabla 1.

Microorganismo	MIC (µg/ml)
<i>Pasteurella haemolytica</i>	3,12 *
<i>Pasteurella multocida</i>	6,25 *
<i>Haemophilus somnus</i>	6,25 *
<i>Mycoplasma dispar</i>	0,097 *
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	0,024 *
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,78 *
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3,12 *
<i>Actinomyces pyogenes</i>	0,024 *
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	1,56 *
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	0,195 *
<i>Moraxella bovis</i>	1 **
<i>Clostridium perfringens</i>	3,12 *
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	3,12 *

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de la tilmicosina con algunas bacterias Gram (+) y Gram (-)⁷⁵.

La tilmicosina es un macrólido con ciertas características que la diferencian de los otros integrantes del grupo. Su capacidad de disminuir el proceso inflamatorio local, sus propiedades antibacterianas y su comportamiento farmacocinético-farmacodinámico (concentración dependiente, buena liposolubilidad, elevada distribución tisular, penetración y acantonamiento intracelular), generan mayores ventajas al ser administrada en dosis única y la convierte en una herramienta terapéutica de elección para el tratamiento de infecciones intramamarias⁷⁵.

6.5.3 Timol, propiedades y su uso en sistemas de liberación controlada

El Timol es un terpenoide que se encuentran como componente principal de los aceites esenciales del orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) y que está clasificado como sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA)⁷⁶.

El timol (2-isopropyl-5-methylphenol) es un compuesto fenólico que se encuentra en muchas plantas medicinales derivados de aceites esenciales, su estructura química se

representa en la Fig. 6. Ha demostrado en diversos estudios su potencial actividad inhibitoria contra bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, incluidas las cepas potencialmente patógenas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* ⁷⁷.

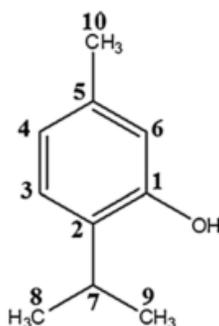


Fig. 6. Estructura química de timol, Khan ST et al.(2017) ⁷⁸

El timol posee además de su actividad antibacteriana, también actividades antifúngicas, antiinflamatorias, antioxidantes, analgésicas, acaricidas, entre otras. Debido a sus potentes propiedades antimicrobianas, el timol se usa con frecuencia en odontología para el tratamiento de infecciones de la cavidad oral⁷⁹.

Estas propiedades farmacológicas del timol se atribuyen al grupo hidroxilo fenólico en su estructura química. Se sabe que los compuestos que contienen los grupos fenólicos confieren protección contra los efectos nocivos de los radicales libres tanto al absorber como al neutralizar los radicales libres y al aumentar los antioxidantes endógenos.

La baja toxicidad y el agradable olor, así como el sabor del timol, demuestran que este material puede usarse como un aditivo para evitar el deterioro bacteriano en el área alimenticia ⁸⁰.

Se han reportado varios estudios en donde informan la eficacia antimicrobiana del timol contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ^{81,82}. Algunos investigadores han especulado que el mecanismo antibacteriano del timol puede ser consecuencia, al menos en parte, de una perturbación de la fracción lipídica de la membrana plasmática bacteriana, lo que produce cambios en la permeabilidad de la membrana y en el escape del contenido intracelular. También se ha reportado el efecto antibacteriano del Timol contra

Pseudomonas aeruginosa y *S. aureus* como resultado de la alteración en la integridad de la membrana, lo que afecta aún más la homeostasis del pH y el equilibrio de iones inorgánicos. Por lo tanto, la propiedad antibacteriana de Timol depende de su capacidad para permeabilizar, despolarizar y romper la membrana citoplásmica⁸¹⁻⁸⁴.

Los aceites esenciales parecen ser candidatos para reemplazar los antibióticos o para actuar como adyuvantes antibióticos debido a sus propiedades antimicrobianas^{80,83}.

6.6 ADMINISTRACIÓN TÓPICA DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

La piel es uno de los órganos más fácilmente accesibles en el cuerpo para la administración de medicamentos⁸⁵. Las preparaciones tópicas se aplican en la piel para efectos superficiales, locales o sistémicos. En algunos casos, la base puede ser utilizada solo para propiedades terapéuticas, como emoliente, acción calmante o protectora; sin embargo, muchas preparaciones tópicas, contienen Ingredientes activos que se dispersan o disuelven en la base.

Actualmente los enfoques de optimización de la administración tópica de agentes dermatológicos (pequeñas y grandes moléculas) incluyen el uso de sustancias químicas potenciadores, biopolímeros (sodio hialuronato), liposomas, portadores particulados (microesferas y nanopartículas lipídicas), sprays, espumas, oclusión a través de apósitos y parches, etc⁸⁶. Los enfoques de portadores particulados cuando se utilizan de manera individual o en una manera sinérgica son una mejora significativa sobre sistemas convencionales y tienen el potencial de mejorar la eficacia. Por otro lado, una ventaja de este tipo de sistemas es que la presentación es no invasiva proporcionando rutas alternativas de administración y mejora la administración de medicamentos. Los sistemas de liberación dérmica podrían reemplazar las agujas necesarias para la administración de medicamentos, además de otras ventajas significativas es evitar el primer metabolismo de paso hepático, degradación gástrica y frecuente dosificación, sin embargo, la dosificación dérmica es limitada por el desafío importante de penetración de micro o macro moléculas debido a sus propiedades para ingresar a las barreras de la piel^{85,86}.

Una vez que el producto se aplica sobre la piel, existe una interacción compleja que se produce entre la formulación, los compuestos activos, y la piel. La penetración de los compuestos activos en la piel sigue la primera ley de difusión de Fick, que describe la tasa de transferencia de solutos como una función de la concentración de los diversos ingredientes, el tamaño de la superficie de tratamiento, y la permeabilidad de la piel. sin embargo, la permeabilidad de la piel puede ser influenciada por muchos factores tales como el secado, la hidratación o efectos oclusivos de los excipientes en la formulación⁸⁵⁻⁸⁷.

Aunque la piel intacta es mucho menos permeable que otros tejidos, muchas sustancias penetran en la piel hasta cierto punto, a velocidades relativamente lentas. La penetración de los fármacos y otros depende de componentes de la piel, las propiedades fisicoquímicas del penetrante, el estado de la piel y la naturaleza del vehículo⁸⁷.

El fármaco aplicado de forma tópica puede difundirse a través de la piel por los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas o las glándulas sebáceas, pero la permeación por las múltiples bicapas lipídicas del estrato córneo, la vía dominante es de velocidad lenta⁸⁷.

En general, las preparaciones tópicas destinadas a efectos sistémicos o locales se clasifican como:

- a) Sólidos – Polvos
- b) Semisólidos - Cremas, Gel, Ungüentos, Pasta.
- c) Líquidos - Solución, emulsión, linimentos, suspensión, jabones, lociones.

En estas formulaciones las presentaciones semisólidas, son más prometedoras que los sólidos y los líquidos, ya que consideran que su propiedad se adhiere a la superficie de aplicación durante un tiempo razonable antes de que se desgasten⁸⁸.

6.6.1 Geles

Los geles son una clase relativamente nueva de formas de dosificación creadas por el atrapamiento de grandes cantidades de líquido acuoso o hidroalcohólico en una red de estructuras coloidales sólidas, que puede consistir en sustancias inorgánicas como sales de aluminio o polímeros orgánicos de origen natural o sintético. Dependiendo de la naturaleza del coloide las sustancias y el líquido en la formulación, el gel variará en apariencia desde

totalmente transparente hasta opaco. La mayoría de los geles tópicos se preparan con polímeros, como los carbómeros, que proporcionan un aspecto brillante y estéticamente agradables⁸⁶.

En un gel polar típico, un polímero natural o sintético construye una matriz tridimensional a lo largo de un líquido hidrofílico. Los polímeros típicos usados incluyen las gomas naturales tragacanto, carragenina, pectina, agar y ácido algínico; materiales semisintéticos como la metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa; y el polímero sintético, carbopol. Tales geles liberan bien los medicamentos; los poros permiten una difusión relativamente libre de moléculas, que no son demasiado grandes. Los geles son sistemas semisólidos que consisten en dispersiones de moléculas pequeñas o grandes en un líquido acuoso. El vehículo se vuelve gelatinoso mediante la adición de un agente gelificante. Entre los agentes gelificantes utilizados se encuentran:

- A) Macromoléculas sintéticas: Carbomer 934
- B) Derivados celulósicos: carboximetilcelulosa,
- C) Hidroxipropilmetilcelulosa

Los geles son compatibles con muchas sustancias y puede contener potenciadores de penetración.

Los geles pueden ser

- Monofásicos: Geles en los que las macromoléculas se distribuyen uniformemente a lo largo de un líquido sin aparentes límites entre los dispersos las macromoléculas y el líquido.
- Geles de doble fase: consiste en gel de masa, flóculos de pequeñas partículas distintas, a menudo referido como magmas^{89,90}.

6.6.2 Emulsiones

Las emulsiones son preparaciones de dos fases en las que una fase (la fase dispersa o interna) está finamente dispersa en la otra (fase continua o externa). La fase dispersa puede tener una base hidrófoba (aceite en agua) o una base acuosa (agua en aceite). En las emulsiones existen dos fases incompatibles en estrecha conjunción, la cual se lleva a cabo por un estabilizante^{85,88}. En la mayoría de las emulsiones farmacéuticas, el sistema estabilizador comprende tensoactivo (iónico o no iónico), polímeros (polímeros no iónicos, polielectrolitos o biopolímeros), o mezclas de estos⁸⁶.

Los tipos emulsiones según las fases dispersantes y fases continuas son:

- a) Emulsión de agua en aceite (W/O).
- b) Emulsión de aceite en agua (O/W).
- c) Emulsión agua en aceite en agua (W/O/W).
- d) Emulsión de aceite en agua en aceite (O/W/O).

6.6.3 Emulgel como sistema de liberación de fármacos.

Los emulgeles (geles de emulsión) son una clase de formulación semisólida bifásica, probados para aplicaciones de liberación controlada de activos. Debido a la presencia de fases tanto acuosas como no acuosas, los emulgeles ofrecen la capacidad de administrar tanto agentes hidrofílicos como lipofílicos. Aunque los emulgeles son de naturaleza bifásica, son termodinámicamente más estables en comparación con las emulsiones. Los emulgeles proporcionan las ventajas de ambas emulsiones (sistema bifásico) y geles (estabilidad mejorada). En los últimos años, los emulgeles han ganado importancia en la administración tópica de fármacos⁹¹.

La administración tópica es la vía más simple y fácil de administración localizada de medicamentos en cualquier parte del cuerpo, estos se administran por vía tópica para su acción en el sitio de aplicación o para efectos sistémicos; el sistema de administración tópica tiene la ventaja de pasar por alto el metabolismo de primer paso, evitar los riesgos e

inconvenientes de la terapia intravenosa y de las diversas condiciones de absorción como los cambios de pH, la presencia de enzimas, el tiempo de vaciamiento gástrico entre otros^{91,92}.

Las moléculas pueden penetrar básicamente en la piel por tres vías: a través del estrato córneo intacto, a través de conductos sudoríparos o a través del folículo sebáceo. La superficie del estrato córneo presenta más del 99% de la superficie total de la piel disponible para la absorción percutánea del fármaco; los principales pasos involucrados en la absorción percutánea incluyen el establecimiento de un gradiente de concentración que proporciona la fuerza motriz para el movimiento de fármacos a través de la piel, la liberación del fármaco del vehículo (coeficiente de partición) y la difusión del fármaco a través de las capas de la piel (coeficiente de difusión)^{89,93}.

La piel actúa como una barrera de dos vías para evitar la absorción y la pérdida de agua y electrolitos. Existen tres mecanismos principales de absorción tópica de fármacos: transcelular, intercelular y folicular. La mayoría de los medicamentos pasan a través de la ruta tortuosa alrededor de los corneocitos y a través de la bicapa lipídica a capas viables de la piel⁹³.

El emulgel permite la adición de fármacos hidrófobos en la fase oleosa que conduce a la dispersión de los glóbulos de aceite en fase acuosa dando como resultado la formación de emulsión o/w. Además, esta emulsión se puede agregar simplemente a la base de gel, proporcionando así una buena estabilidad y una mejor liberación de fármacos.^{92,94}

Otra de las ventajas de los emulgeles es la preparación ya que se compone de pasos simples y cortos que aumentan la viabilidad de la producción, los materiales utilizados son de fácil acceso y más baratos, por lo tanto, disminuye el costo de producción.⁹²

6.6.4 Evaluación *in vitro* de liberación de fármacos

Los métodos *in vitro* permiten el control preciso de variables experimentales mediante el uso de los protocolos más simples. Sin embargo, los ensayos *in vitro* no pueden reproducir completamente la complejidad de los sistemas biológicos, y las evaluaciones *in vivo*¹⁰⁰.

Se recomienda validar los resultados y, si es posible, establecer una correlación *in vivo-in vitro*. Sin embargo, las evaluaciones *in vitro* son herramientas esenciales para el desarrollo y selección de formulaciones, prediciendo la absorción cutánea *in vivo*^{85,100}.

La celda de difusión es el aparato experimental más ampliamente utilizado para evaluar la liberación y permeación de la piel de los fármacos incorporados en los sistemas de administración de fármacos tópicos y transdérmicos. El principal objetivo de estas evaluaciones consiste en identificar las principales variables durante el diseño de la formulación que pueden alterar la biodisponibilidad del activo en el estado *in vivo*¹⁰¹.

El primer trabajo en este campo fue desarrollado por Thomas J. Franz en 1970; la configuración del aparato experimental está compuesta por: a) El compartimiento donador, en donde la formulación se aplica a una membrana semipermeable donde el fármaco liberado debe impregnar, y b) una cámara receptora, en la que se pueden extraer muestras para el análisis del fármaco. La celda de difusión vertical es una modificación de la celda de difusión Franz original. Este aparato ha sido utilizado para evaluar diferentes formulaciones, tales como geles, cremas, ungüentos y parches¹⁰⁰. Diferentes configuraciones de esta celda de difusión están disponibles comercialmente y tienen diferentes volúmenes y capacidades en la cámara receptora (4, 7 y 12 ml) y áreas de difusión efectiva (1.77 y 2.54 cm²). El esquema de la celda de difusión vertical se muestra en la Figura 7.

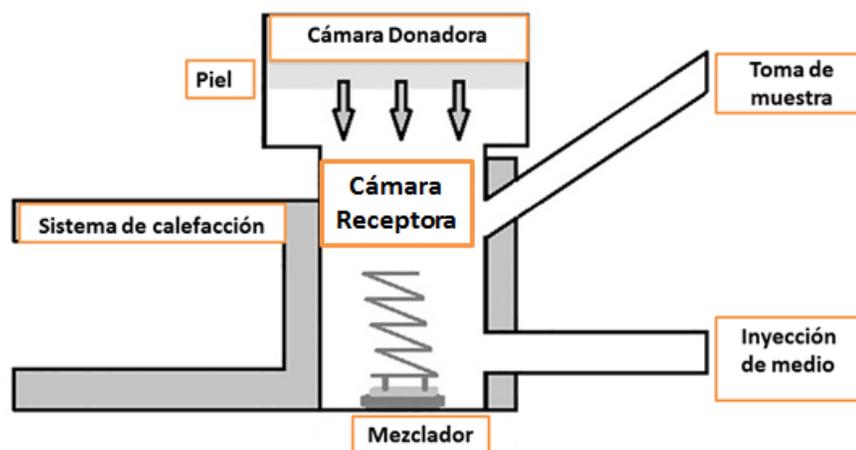


Figura 7. Celda de difusión vertical. Wiley-Scrivener de Ruela et al. (2017)¹⁰⁰.

Las condiciones experimentales para la valoración de la permeación de la piel incluyen un medio receptor mantenido bajo agitación y temperatura magnética constante. La concentración de fármaco no debe alcanzar valores $> 10\%$ de su saturación. Para esto, el fármaco debe ser libremente soluble en el medio receptor^{85,100}.

Los medios de receptor recomendados son tampones acuosos relacionados con el medio fisiológico. El uso de aditivos en el medio receptor es necesario en algunos casos para aumentar la solubilidad de la droga, pero estos no deben comprometer la integridad de la membrana o alterar la permeabilidad del fármaco; algunos aditivos incorporados en el medio son tensioactivos no iónicos por ejemplo Tween 80, albúmina de suero bovino, polietilenglicol y etanol. Para prevenir el crecimiento microbiológico en el medio, se pueden agregar conservantes, tales como gentamicina, azida sódica (0,02% -0,05%) y formaldehído (0,1%). Las técnicas analíticas selectivas mayormente utilizadas para la separación apropiada de contaminantes de la piel, formulación o medio receptor es por medio de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)^{85,100,101}.

Independientemente del sistema de liberación, el coeficiente de difusión del agente bioactivo a través del polímero depende de los parámetros estructurales y morfológicos del mismo, así como de la concentración de soluto en él. Teniendo esto en cuenta, se puede afirmar que una de las tareas más laboriosas en el campo de la tecnología de la liberación controlada, reside en el desarrollo de formulaciones polímeros (tipo matriz) capaces de

liberar fármacos a velocidad constante durante un tiempo determinado. Una aproximación es la utilización de polímeros hidrófilos que presenten la capacidad de hincharse en un medio acuoso, sin disolverse, y de liberar el fármaco disuelto o disperso en ellos, proporcionando una velocidad prácticamente constante¹⁰².

La migración del fármaco al medio acuoso desde un sistema de esta naturaleza implica un proceso de absorción de agua o fluido biológico, y otro simultáneo de desorción del fármaco, mediante un mecanismo de difusión, controlado por el hinchamiento que sufre el material polimérico¹⁰²

Sistemas controlados por el disolvente. Son matrices poliméricas o sistemas con depósito donde la liberación es controlada por la penetración de un disolvente, vía ósmosis o hinchamiento.

a) Sistemas controlados por hinchamiento. Son sistemas monolíticos en los que el compuesto activo se encuentra disuelto o disperso en un soporte de polímero hidrófilo, entrecruzado o no, el cual se hincha sin disolverse cuando se pone en contacto con un medio acuoso. Estos sistemas polímeros se denominan *hidrogeles* y han despertado gran interés porque con ellos es posible, al menos teóricamente, conseguir una velocidad de liberación constante¹⁰³.

En estos sistemas el grado de hinchamiento (y por tanto la cantidad de fármaco liberada) depende del balance hidrófilo/hidrófobo de la matriz polimérica y del grado de entrecruzamiento. La migración del fármaco al medio acuoso desde un sistema de esta naturaleza implica un proceso de absorción de agua y otro simultáneo de desorción del compuesto bioactivo por un mecanismo de difusión controlado por el hinchamiento que sufre el polímero. Cuando el agua penetra en la matriz hidrófila, el polímero, que presenta inicialmente un estado vítreo, se hincha y su temperatura de transición vítrea puede alcanzar valores inferiores a la temperatura del medio que la rodea pasando con ello a un estado tipo elastomérico. En estas condiciones, el soluto difunde desde las regiones hinchadas al medio externo y la liberación de éste está controlada por la velocidad y posición de la interfase vítrea/elástica.

Los datos de liberación se analizan empleando el modelo semiempírico desarrollado por Korsmeyer- Peppas. A partir de este modelo se puede inferir el mecanismo de transporte de estos sistemas y determinar el tipo de liberación involucrado. Calculando el valor de n se

realiza una aproximación para la interpretación de los mecanismos de liberación que operan durante el proceso de liberación. Este modelo propone: (a) si n es igual a la unidad (1), la velocidad de liberación es constante por lo tanto, la cinética de liberación es de orden cero y el paso limitante sería la relajación de la matriz. (b) En cambio si el valor de n es igual a 0,5 (o se halla entre 0,45 y 0,55) la velocidad de liberación sigue una cinética de tipo Fick, donde la liberación estaría controlada por la difusión del fármaco a través de la matriz. (c) Si el valor de n resulta: $0,55 < n < 1$, habría un aporte simultáneo a la velocidad de liberación, de los procesos de difusión y relajación, conociéndose como liberación anómala. (d) Si el valor de n es mayor que 1 se denomina cinética de liberación de tipo Súper Caso II, debido a un aumento en la plastificación y la relajación del entorno de la matriz.

En el modelo Fickiano donde $n = 0.5$ la liberación del fármaco se rige por difusión. La velocidad de transporte o difusión del disolvente es mucho mayor que el proceso de relajación de la cadena polimérica. El equilibrio de absorción en la superficie expuesta del sistema polimérico tiene lugar rápidamente, lo que lleva a condiciones de enlaces dependientes del tiempo. La cinética de este fenómeno se caracteriza por la difusividad.

7 JUSTIFICACIÓN

Debido a los altos costos de tratamiento para el control de la mastitis bovina, es necesario el desarrollo de opciones terapéuticas para mejorar la eficacia de los principios activos y a la par desarrollar alternativas para disminuir el uso de antibióticos y así mismo atacar el problema de resistencia bacteriana. Por lo que en este proyecto se propone el desarrollo de un sistema semisólido tipo emulgel con un principio activo natural timol y un antibiótico macrolido tilmicosina, que por sus propiedades químicas y antimicrobianas pueden ser una opción para el tratamiento de la mastitis bovina en el periodo seco.

8 HIPÓTESIS

Los principios activos tilmicosina y timol tendrán un efecto sinérgico contra microorganismos causantes de mastitis bovina; así mismo el sistema emulgel será capaz de aumentar la permeabilidad y/o incrementar la estancia del sistema en la región afectada optimizando la disponibilidad de tilmicosina y timol y de esta manera mejorar la antibioterapia en el secado.

9 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar, caracterizar y evaluar *in vitro* un sistema emulgel así, como determinar el efecto antimicrobiano al combinar los activos Tilmicosina y Timol para el tratamiento de la mastitis subclínica en el periodo seco.

10 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la concentración mínima inhibitoria y bactericida de los activos tilmicosina y timol contra cepas ATCC y de campo de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Escherichia* mediante la técnica de microdilución en placa para evaluar su efecto bactericida contra agentes causante de mastitis bovina.
- Determinar el índice de concentración inhibitoria fraccionada de los activos tilmicosina y timol contra cepas ATCC y de campo de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Escherichia*.
- Desarrollar un sistema semisólido en presentación de emulgel tópico (o/w) y caracterizarlo mediante pruebas organolépticas, ensayos de estabilidad a tiempo real y tiempo acelerado, medición de pH, gravedad específica, tamaño de glóbulo, potencial eléctrico y viscosidad para determinar su conservación y estabilidad.
- Realizar perfiles de disolución con el sistema emulgel tópico a base de tilmicosina y timol para determinar la velocidad de disolución del sistema.
- Realizar perfiles de permeación en piel de glándula mamaria de bovino del sistema emulgel tópico a base de tilmicosina y timol para determinar el mecanismo de absorción del sistema.

11.1 PLAN EXPERIMENTAL

La figura 8 resume las determinaciones previas, el desarrollo y evaluación del sistema semisólido elaborado.

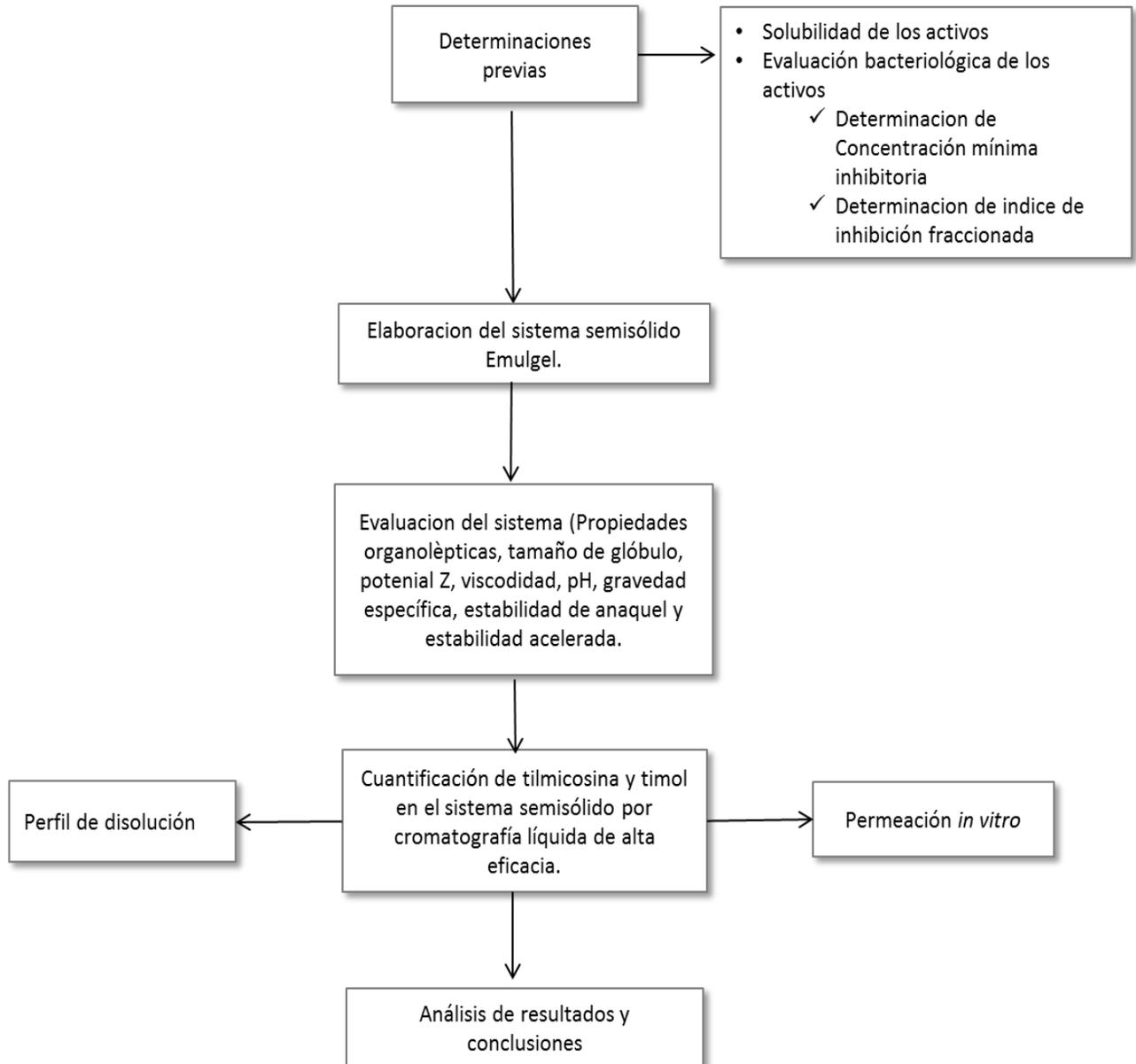


Figura. 8. Plan Experimental

11.2 MATERIAL

11.2.1 Biológicos

- *Staphylococcus aureus* ATCC BAA976, lote365-90-5, MediMark®Europe, Francia.
- *S. aureus* ATCC BAA 977, MediMark®Europe, Francia.
- *S. aureus* ATCC BAA 1026, MediMark®Europe, Francia.
- *S. aureus* Cepa Cowan
- 5 cepas de campo de *S. aureus*
- *S. chromogenes*
- *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, MediMark®Europe, Francia.
- 8 cepas de campo de *S. uberis*
- *S. dysgalactiae*
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *E. coli* ATCC 35218 lote335-211-2, MediMark®Europe, Francia.
- 8 cepas de campo de *E. coli*.
- Piel de ubre de bovino.

11.2.2 Medios de cultivo y pruebas bioquímicas

- Agar Sangre, lote 724216L002, MCDLAB, México.
- Agar MacConkey, BD, México
- Agar manitol, BD Bioxon, México.
- Prueba de coagulasa
- Prueba de catalasa
- Microsistema API para *Staphylococcus* y *Streptococcus*, API, biomerieux, México
- Prueba de esculina, Thermo Scientific, USA.
- Medio caldo infusión cerebro corazón, Lote 8101616, BD, USA.

11.2.3 Químicos

- Timol 98.5%, lote SLBT5627, Sigma-Aldrich, USA.
- Tilmicosina VETRANAL™, estándar analítico, mezcla de isómeros, lote #BCBV4513, Sigma-Aldrich, USA.
- Dimetil Sulfóxido, Meyer, Lote G1015590.
- Triglicéridos de cadena media, Crodamol GTCC, CRODA, lote 20630698
- Transcutol P, GATTEFOSSÉ, Pack N°. 79, muestra libre.
- Metanol 99.8%, J.T. Baker, lote M-32522.
- Brij 58, CRODA lote 0001259341.
- Carboxpol 940.
- Pluronic F-68, Sigma-Aldrich, lote #BCBM7536V.
- Trietanolamina, N.F. JT Baker, Lote No. M-28999.
- Glicerina USP, Química Meyer, lote 15974.
- Acetonitrilo HPLC, Lote 807263, Fermont Episolv.

11.2.4 Equipos y material de laboratorio

- Estufa bacteriológica, Nuaire US Auto Flow, USA.
- Microplacas de 96 pozos de fondo en U marca Brand, Alemania.
- Mechero bunsen.
- Asas bacteriológicas.
- Micropipetas, Finnpiptette Thermo Fisher, USA.
- Cajas de Petri, BD, México.
- Guantes de nitrilo.
- Puntas de plástico para micropipetas, BD, México.
- Gradillas para microtubos
- Gradillas para tubos de ensayo
- Viales para automuestreador de 2mL.
- Vortex Scientific Products, modelo S8225, USA.
- Barra magnética, Barnstead International, modelo SP131325, USA.
- Termómetro de mercurio, Brannan, RU.
- Agitador de velocidad variable Ultra-Turrax, IKA Modelo T18 BS1, Alemania.
- Propela tipo serrata para agitador de velocidad variable.
- Vasos de precipitados de 50, 100, 250, 500 mL.
- Potenciómetro calibrado Corning, modelo 430, RU.
- Picnómetro metálico, Fisher Scientific, USA.
- Balanza analítica Ohaus, Modelo PA163, China.
- Balanza granataria.
- Zetasizer, Malvern Instruments, modelo ZEN 3600, USA.
- Ultrasonificador, Branson modelo 5210, USA.
- Viscosímetro Brookfield, Modelo DV3T, USA.
- Aguja Helipad TC 94 para Viscosímetro Brookfield.
- Ultracentrífuga Beckman Optima, Modelo LE- 80K, USA.
- Equipo HPLC Varian Prostar modelo 410, USA.
- Aparato de disolución diseñado específicamente para la prueba de disolución con malla No.20.
- Disolutor Optimal Control, Modelo DT1 210.
- Celdas de Franz.
- Contenedor de agua para celdas de Franz.
- Termostato con agitador, Fisher Scientific Company, Modelo 73, USA.
- Congelador y Refrigerador Vendo de México.

11.3 METODOLOGÍA

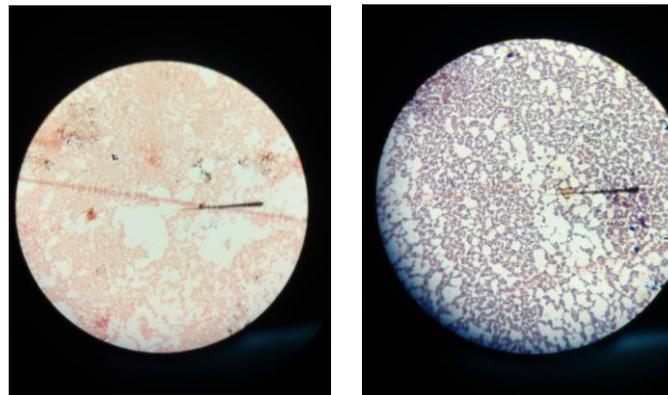
11.4 SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

Las cepas utilizadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida (CMI y CMB) se obtuvieron de leche de vacas seleccionadas para el control de mastitis bovina de un rancho ubicado en la zona de Querétaro.

Se realizó la siembra en Agar Sangre y Agar MacConkey, se incubaron en la estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C. Posteriormente, se realizó el frotis bacteriano y tinción de Gram, para verificar su pureza.

Una vez clasificadas las cepas y de acuerdo a su morfología en bacterias Gram negativas y Gram positivas (Fig.9), cocos en racimos, cocos en cadenas, bacilos, cocobacilos, observando la morfología de las colonias y su hemólisis en las que crecieron en Agar Sangre, se procedió a realizar las pruebas bioquímicas correspondientes.

Figura. 9. Frotis bacteriano y tinción de gram.



Gram -

Gram +

Para las cepas de Estafilococos, se realizaron pruebas de manitol, coagulasa y catalasa, identificando *Staphylococcus aureus* cuyas cepas reaccionaron positivas a estas pruebas (Fig.10), además de presentar hemólisis Beta. Las cepas que reaccionaron negativas ya sea a manitol o coagulasa, se realizó la identificación por medio de microsistemas de identificación API para su identificación

Figura. 10. Pruebas de identificación para *Staphylococcus*.



Prueba de Manitol

Prueba de Coagulasa

Para la identificación de *Streptococcus* se realizaron las pruebas de catalasa, esculina y CAMP, como se describe en la tabla 2 y Fig. 10.

Tabla 2. Pruebas de identificación para *Streptococcus*¹⁰⁴.

Cepa	Catalasa	Esculina	CAMP
<i>S. uberis</i>	-	+	-
<i>S. dysgalactiae</i>	-	-	-
<i>S. agalactiae</i>	-	-	+

Figura. 10. Prueba de CAMP- Esculina



La identificación de enterobacterias se realizó por pruebas bioquímicas y por tablas de identificación (tabla 3)¹⁰⁴.

Tabla 3. Resultados de pruebas bioquímicas para identificación de *E. coli*

Cepas	O/F	LIA	MIO	CIT	NIT	UREA	RM	SIM	TSI
<i>E. coli</i>	F	-	-	-	+	-	+	+	A/A prod de gas
<i>Klebsiella spp</i>	F	V	V	+	+	V	V	V	A/A prod de gas

Las cepas identificadas a utilizar para los ensayos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Microorganismos asilados e identificados de casos de mastitis bovina.

Gram +		Gram -
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA976	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739
<i>S. aureus</i> ATCC BAA 977	<i>S. uberis</i>	<i>E. coli</i> ATCC 35218
<i>S. aureus</i> ATCC BAA 1026	<i>S. uberis</i>	<i>E. coli</i>
<i>S. aureus</i> Cepa Cowan	<i>S. uberis</i>	<i>E. coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. uberis</i>	<i>E. coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. uberis</i>	<i>E. coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. uberis</i>	<i>E. coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. uberis</i>	<i>E. coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. uberis</i>	<i>E. coli</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>E. coli</i>

11.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA DE TILMICOSINA Y TIMOL

Se utilizó Timol 98% marca Sigma, diluyéndolo con etanol para obtener una concentración de 50 mg/ml (solución stock). Se utilizó Tilmicosina VETRANAL™, analytical standard de Sigma, se pesó 15.75mg y se diluyó en 10ml de en una solución de DMSO al 2% como solución stock.

Se utilizaron las cepas seleccionadas e identificadas de casos de mastitis bovina. Se utilizó el método de referencia dilución en microplaca para determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI), siguiendo las pautas del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio¹⁰⁵. Al momento del ensayo las cepas se estandarizaron al 0.5 de McFarland en solución salina, y se realizaron diluciones dobles de los antimicrobianos en caldo infusión cerebro corazón de tal forma que se obtuvieron las siguientes concentraciones:

Timol: 156.25, 78.12, 39.06, 19.53, 9.76, 4.88, 2.44, 1.22 µg en 100µL,

Tilmicosina: 0.0787, 0.0393, 0.0196, 0.0098, 0.0049, 0.0024, 0.0012, 0.0006 µg en 100µL.

Se utilizaron 4 cepas ATCC (BAA-1026, BAA-976, BAA-977, Cowan) y 6 de campo de *Staphylococcus aureus*, una cepa ATCC 19615 de *Streptococcus pyogenes*, una cepa de campo de *Streptococcus dysgalactiae* y 8 de *Streptococcus uberis*, dos cepas ATCC (35218 y 8739) de *Escherichia coli* y ocho cepas de campo; las cepas se sembraron en agar infusión cerebro corazón (BHI) 12 h antes del ensayo.

Se evaluó mediante la inhibición del crecimiento en placa por triplicado, colocando 20 µL de inóculo para las cepas de *Staphylococcus* y *E. coli* y 30 µL para *Streptococcus*, la determinación de concentración mínima inhibitoria se realizó a las 24 h, observando el pozo en el que no se observaba botón; se colocó un control de crecimiento del inóculo y se determinó por medio del método de recuento de colonias en agar BHI, el inóculo fue diluido a una concentración 1:1000 en solución salina y posteriormente se colocó 100 µL de la dilución en agar BHI, se realizó el conteo a las 24 h.

Para las concentración mínima bactericida se realizó el sembrado con 20 µL en agar BHI de las diluciones de mayor concentración en las que no se observó el botón del inoculo y se realizó el conteo a las 24 h. Los estudios de interacciones inhibitorias fueron realizados por la técnica de tablero de ajedrez. Los antibióticos se agregaron individualmente y en combinación.

El índice de la concentración inhibitoria fraccional (CIF) se calculó utilizando la ecuación 1.

Ecuación 1:

$$FICI = \sum_{i=1}^n \frac{MIC \text{ agente antimicrobiano en combinación}}{MIC \text{ agente antimicrobiano solo}}$$

Para la interpretación de los resultados se consideró sinérgico cuando FICI es ≤ 0.5 , aditivo cuando es ≥ 0.5 y ≤ 1 , indiferente cuando es $> 1 \leq 4$, y antagónico cuando es > 4 .

11.6 SOLUBILIDAD DEL TIMOL Y DE TILMICOSINA

Se probaron diferentes sustancias: triglicéridos de cadena media transcutool, metanol y solución de Brij[®] al 2.5 % a pH 7, a los cuales se les adicionó 0.01 mg de Tilmicosina en un volumen de 1ml de cada una de ellas. Se agitó con vortex cada uno de los tubos durante 5 minutos, lo cual asegura su disolución, a una temperatura de 45°C, agregando 0.01 mg de tilmicosina consecutivamente hasta la saturación (enturbiamiento o precipitado en el fondo del tubo).

De igual forma se agregaron 0.1mg de Timol en 1 ml de diferentes sustancias: triglicéridos de cadena media, transcutool, metanol y solución de Brij[®] al 2.5% a pH 7. Se agitó con vortex cada uno de los tubos durante 5 minutos, lo cual asegura su disolución, a una temperatura de 45°C, agregando 0.1 mg de Timol consecutivamente hasta la saturación (enturbiamiento o precipitado en el fondo del tubo).

11.7 ELABORACIÓN DE LAS FASES QUE COMPONEN EL EMULGEL

La formulación propuesta para el emulgel se preparó, de acuerdo a lo explicado por M. Gómez (2009)¹⁰⁶, a continuación se describe su preparación:

a) Fase Oleosa

Se disolvió el Timol y la Tilmicosina en triglicéridos de cadena media agitando con una barra magnética a una temperatura de 45 °C hasta su disolución (30-45 min).

b) Fase acuosa

Se colocaron 10 g de carbómero (Carbopol 940) en 100 mL de agua destilada y se dejaron humectar por 24 h. Transcurrido el tiempo se homogenizó con un agitador de velocidad variable con una propela tipo “serrata” para la formación del gel.

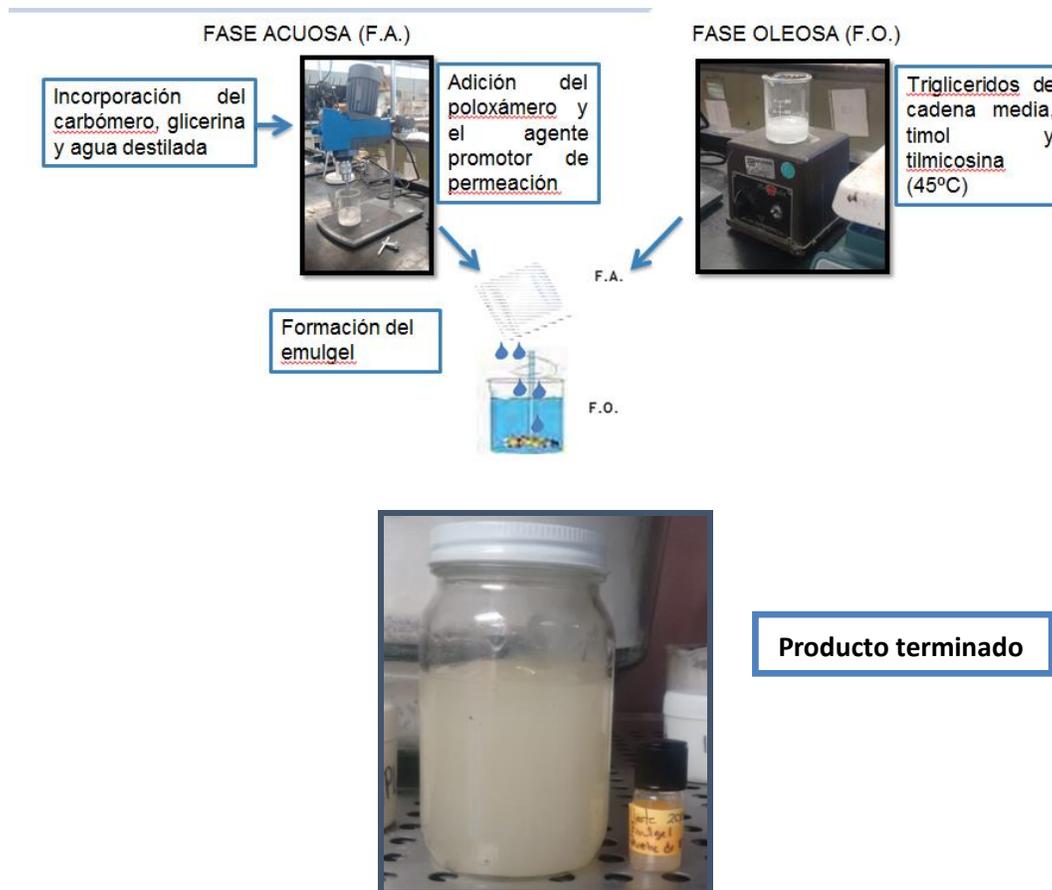
Posteriormente, en un vaso de precipitados de 250 mL se mezclaron el gel de carbómero, la glicerina y el agua destilada, para la obtención de un gel bioadhesivo que es el que le confiere esta propiedad al emulgel. Se pesó la cantidad necesaria de gel bioadhesivo previamente preparado y se agregó el poloxámero, el cual se encontraba disuelto con anterioridad en la mínima cantidad de agua destilada, se homogenizó nuevamente con agitador de velocidad variable y se agregó a continuación el agente promotor de permeación, agitando la solución y calentando a 45 °C. Finalmente, se adicionó el neutralizante.

11.8 ELABORACIÓN DEL EMULGEL

Se mantuvo la fase acuosa con agitación y se fue adicionando poco a poco la fase oleosa, hasta su incorporación total (ambas fases estaban a 40 °C). Se continuó la agitación hasta temperatura ambiente.

El procedimiento para la formación del emulgel, se resume esquemáticamente en la Figura 11.

Figura. 11. Proceso de elaboración del Emulgel.



11.9 EVALUACIONES REOLÓGICAS Y DE ESTABILIDAD DEL EMULGEL.

11.9.1 Color, olor, textura y consistencia del sistema semisólido.

Se realizó una extensión de una muestra del emulgel sobre un portaobjetos y se colocó éste encima de una superficie negra, procediendo a su visualización mediante una lupa.

Se observaron las muestras por un periodo de cuatro semanas y después cada mes teniendo un total de 6 meses de observación. Tomando en cuenta propiedades físicas como: color, olor, textura, consistencia.

11.9.2 Determinación de pH

Se midió el pH con el potenciómetro calibrado con un buffer de fosfatos (pH=7.0), leyendo directamente sobre las muestras que se encontraban a temperatura ambiente. La prueba se realizó por un periodo de 4 semanas, efectuando 6 mediciones cada semana, y después cada mes por un periodo total de seis meses.

11.9.3 Gravedad específica

La gravedad específica se determinó utilizando un picnómetro metálico, estas determinaciones se realizaron por un periodo de 4 semanas, efectuando seis determinaciones cada semana y después cada mes por un periodo total de seis meses.

11.9.4 Carga superficial

Se determinó el potencial Z del emulgel con ayuda del Zetasizer Malvern Systems ZEN 3600 (viscosidad de 0.8872 cP, constante dieléctrica de 79 y un índice de refracción de 1.330, temperatura de 25°C y una longitud de onda de 633 nm) utilizando una celda de capilar doblado, el medio de dispersión fue agua destilada. Las determinaciones se realizaron por un periodo de 4 semanas, efectuando 6 determinaciones cada semana y después cada mes por un periodo total de seis meses.

11.9.5 Tamaño de glóbulo del emulgel

Se utilizó la técnica de dispersión dinámica de la luz (espectroscopía de correlación de fotones). La determinación de los tamaños del glóbulo fue obtenida con el Zetasizer Malvern Systems ZEN 3600. Para la muestra de emulgel se utilizó agua destilada como medio de dispersión, todas las lecturas se realizaron a 25°C y una longitud de onda de 633 nm, utilizando una celda de cuarzo con apertura redonda, con un ángulo de incidencia del rayo láser de 180° y una viscosidad de 0.8872 cP 57. Las mediciones se realizaron por un periodo de 4 semanas, efectuando 6 determinaciones cada semana y después cada mes por un periodo total de seis meses.

11.9.6 Viscosidad

Esta evaluación se llevó a cabo con el viscosímetro Brookfield (Modelo DV3T), con la aguja Helipath TC 94. Se midió la fuerza de corte a 60 rpm. Las mediciones se realizaron por un periodo de 4 semanas, efectuando 6 determinaciones cada semana y después cada mes por un periodo total de seis meses.

11.9.7 Estabilidad

Se siguió la estabilidad de los sistemas a temperatura ambiente, colocando 80 ml de la muestra en frascos cerrados de cristal por periodo de 6 meses, observando de forma cualitativa las características organolépticas.

11.9.8 Estabilidad acelerada

Se llevaron a cabo dos pruebas:

Prueba de centrifugación: se ejecutó en la Ultracentrífuga Optima LE- 80K a 3500 rpm por 10 min. Se realizó por un periodo de 4 semanas, efectuando 6 determinaciones cada semana y después cada mes por un periodo total de seis meses.

Prueba en estufa (40°C): se colocaron las muestras en frascos cerrados de cristal por periodo de seis meses.

11.10 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se revisaron las propiedades fisicoquímicas del analito: solubilidad, pKa y características de la molécula, así como la concentración esperada para poder proponer un intervalo de trabajo.

Espectros de Absorción: Se determinaron las longitudes de onda de máxima absorción para una solución de Tilmicosina y Timol 100.0 µg/mL en metanol. Los barridos se hicieron de 200 a 500 nm.

Elección de la fase móvil. Se probó la mezcla de solvente de Acetonitrilo (ACN): Agua, modificando la proporción de los solventes. La elección de la fase móvil se enfocó en aquella que nos proporcionara una resolución aceptable entre el pico de interés y las interferencias, así como los mejores parámetros cromatográficos de simetría y menor tiempo de retención posible.

Volumen de inyección y velocidad de flujo. Se evaluó con un volumen de inyección de 20 µL y una velocidad de flujo de 1.0 mL/min.

Para la validación del método de cuantificación de Tilmicosina y Timol se realizaron con el equipo HPLC Varían, Prostar modelo 410 evaluando seis curvas de calibración en un rango de 10–160 µg/mL de Tilmicosina y Timol en un mismo día, la respuesta se cuantificó midiendo el área de los picos, se graficó dicha respuesta *versus* la concentración de Tilmicosina y Timol en el intervalo mencionado, se determinó el coeficiente de correlación lineal (r^2), la pendiente (m), y la ordenada al origen (b) para cada curva de calibración.

11.11 PERFILES DE LIBERACIÓN

Para determinar los perfiles de liberación se prepararon tres lotes del sistema semisólido con una carga de activo de 1500 mg de Tilmicosina y 1500 mg de Timol. De cada uno de ellos se pesaron 5 g en el contenedor del aparato de disolución diseñado específicamente para la prueba. Sobre la muestra se colocó una malla No. 20 cuya única función fue mantener el área de exposición constante evitando que la base se dispersara en el medio.

Como medio de disolución se empleó una solución de Brij® 58® al 2.5% en agua (p/v) a 38.5°C con un volumen de disolución de 600 ml. La velocidad de agitación durante la disolución fue de 50 rpm. Se tomaron muestras de 5 ml reponiendo un volumen igual con este medio de disolución fresco a los 5, 10, 15, 30, 60, 90 minutos y posteriormente, cada hora hasta completar un total de 7 horas. La finalidad de reponer el volumen con medio fresco es mantener las condiciones de concentración del fármaco en el medio mucho menor a la concentración del fármaco a saturación del sistema, teniendo como dato que el activo presenta una solubilidad de 6 mg/ml en solución Brij® 58 al 2.5 %. Las muestras de la disolución se leyeron al espectro en la región UV a la longitud de onda de máxima absorción con el equipo HPLC.

Los resultados del perfil de liberación *in vitro* obtenidos se representaron en los modelos de tratamiento de datos de la siguiente manera:

1. Modelo cinético orden cero: porcentaje del fármaco liberado acumulativo vs tiempo.
2. Modelo cinético de primer orden: porcentaje acumulativo de medicamento restante vs tiempo.
3. Modelo de Higuchi: porcentaje acumulativo de fármaco liberado vs raíz cuadrada del tiempo.
4. Modelo de la ecuación de Korsmeyer / Peppas: porcentaje acumulativo de fármaco liberado vs inverso del tiempo.

11.12 CINÉTICA DE PERMEACIÓN

Se obtuvo piel de ubre de bovino de una unidad de sacrificio, inmediatamente e traslado bajo refrigeración al laboratorio donde fue lavada con suero fisiológico y el tejido graso subcutáneo fue removido con el uso de un equipo de disección. La piel se estiró, se envolvió en parafilm y se almacenó a -20°C por tres días. Se montaron en las celdas de permeación tipo Franz, se realizó un corte circular con 1.5 cm de diámetro. Colocando en el compartimento donador 5 g de la muestra y en el compartimento receptor 19 ml de solución de Brij[®] 58 al 2.5% en agua con pH 7 (p/v). Las celdas se incorporaron en un contenedor de agua a 38.5°C con agitación constante, se retiraron los 19 ml del compartimento receptor a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 horas. Reponiendo un volumen igual con medio de disolución fresco.

Cada muestra que se recolectó se analizó por espectrofotometría UV a la longitud de onda de máxima absorción. Se determinó la permeación por sextuplicado corriendo un control para cada formulación. La cuantificación de las muestras se obtuvo con base en la curva de calibración correspondiente.

Los resultados del perfil de permeación *in vitro* obtenidos se representaron en los modelos de tratamiento de datos de la siguiente manera:

1. Modelo cinética orden cero - orden: porcentaje del fármaco liberado acumulativo vs tiempo.
2. Modelo cinética de primer orden: porcentaje acumulativo de medicamento restante vs tiempo.
3. Modelo de Higuchi: porcentaje acumulativo de fármaco liberado vs raíz cuadrada del tiempo.
4. Modelo de la ecuación de Korsmeyer / Peppas: porcentaje acumulativo de fármaco liberado vs log del tiempo.

11.13 MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE TILMICOSINA Y TIMOL RETENIDA EN LA PIEL.

Se retiró la piel de cada una de las celdas después de las permeaciones, se lavó y posteriormente se cortó en finas porciones las cuales se colocaron en un vaso de precipitados de 50 ml, se agregaron 20 ml de metanol, se taparon, y cada uno de los sistemas se mantuvo en agitación constante durante 20 horas.

Posteriormente, se centrifugo y se pasó la solución por un filtro de 0.45 micras y se leyó la muestra a la longitud de máxima absorción de los activos. La evaluación se realizó por sextuplicado. Las mediciones de la concentración se obtuvo con el equipo HPLC Varían, Prostar modelo 410, con base a la curva de calibración que se realizó en un rango de 10–160 µg/mL de Tilmicosina y Timol, con un volumen de inyección de 20 µL a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min.

12.1 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Se obtuvieron CMI₉₀ de Tilmicosina con las cepas de *Staphylococcus* de 2.65 µg/mL ± 1.14, *Streptococcus* 1.77 ± 0.9 µg/ml, *E. coli* 1.47 ± 0.52 µg/ml. Con el Timol se obtuvieron para *Staphylococcus* de 429.68 ± 123.53 µg/ml, *Streptococcus* de 664.06 ± 370.58 µg/ml y *E. coli* 976.53 ± 887.91 µg/ml.

En las tablas 5, 6 y 7 se muestran los resultados de las MIC₉₀ de Tilmicosina y Timol, las concentraciones fraccional inhibitorias (FIC) y el índice de concentración fraccional inhibitoria (IFIC) con sus respectivas interpretaciones de cada una de las especies bacterianas.

Tabla 5. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de Tilmicosina y timol contra *Staphylococcus*.

<i>STAPHYLOCOCCUS</i>									
		<i>MIC</i>	<i>MIC</i>	<i>FIC</i>	<i>MIC</i>	<i>MIC</i>	<i>FIC</i>		
		<i>TMS</i>	<i>TMS+</i>	<i>TMS</i>	<i>Timol</i>	<i>Timol+</i>	<i>Timol</i>	<i>IFIC</i>	<i>Interpretación</i>
	Cepa	µg/ml	µg/ml		µg/ml	µg/ml	FIC		
1	ATCC BAA1026	1,96	0,49	0,25	781,25	390,62	0,5	0,75	Adición
2	ATCC BAA 976	1,96	0,49	0,25	390,62	195,31	0,5	0,75	Adición
3	ATCC BAA 977	1,96	0,98	0,50	390,62	48,82	0,1	0,62	Adición
4	ATCC Cowan	3,93	1,96	0,50	390,62	195,31	0,5	1,00	Adición
5	<i>S. aureus</i>	3,93	1,96	0,50	390,62	195,31	0,5	1,00	Adición
6	<i>S. aureus</i>	1,96	0,49	0,25	390,62	195,31	0,5	0,75	Adición
7	<i>S. aureus</i>	3,93	0,98	0,25	390,62	195,31	0,5	0,75	Adición
8	<i>S. aureus</i>	0,98	0,24	0,24	390,62	97,65	0,2	0,49	Sinergia
9	<i>S. aureus</i>	3,93	0,49	0,12	390,62	195,31	0,5	0,62	Adición
10	<i>S. cromogenes</i>	1,96	0,49	0,25	390,62	195,31	0,5	0,75	Adición
	Media	2,65	0,86	0,31	429,68	190,43	0,44	0,75	Adición
	Desv. Estd.	1,14	0,63	0,13	123,53	87,50	0,14	0,16	
							ANOV	0,978	
							A		

TMS: Tilmicosina, ATCC: American Type Culture Collection.

Tabla 6. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de Tilmicosina y Timol contra *Streptococcus*.

STREPTOCOCCUS

		<i>MIC</i>	<i>MIC</i>	<i>FIC</i>	<i>MIC</i>	<i>MIC</i>	<i>FIC</i>		
		<i>TMS</i>	<i>TMS+timol</i>	<i>TMS</i>	<i>Timol</i>	<i>Timol+TMS</i>	<i>Timol</i>	<i>FIC</i>	<i>Interpretación</i>
	Cepa	<i>µg/ml</i>	<i>µg/ml</i>		<i>µg/ml</i>	<i>µg/ml</i>	<i>FIC</i>		
1	ATCC <i>S. pyogenes</i>	1,96	0,98	0,50	781,25	390,62	0,5	1,00	Adición
2	<i>S. uberis</i>	1,96	0,98	0,50	1562,5	390,62	0,2	0,75	Adición
3	<i>S. uberis</i>	1,96	0,98	0,50	390,62	390,62	1,0	1,50	Indiferente
4	<i>S. uberis</i>	0,98	0,49	0,50	390,62	390,62	1,0	1,50	Indiferente
5	<i>S. uberis</i>	0,98	0,49	0,50	390,62	195,31	0,5	1,00	Adición
6	<i>S. uberis</i>	0,98	0,49	0,50	390,62	195,31	0,5	1,00	Adición
7	<i>S. uberis</i>	0,98	0,49	0,50	781,25	195,31	0,2	0,75	Adición
8	<i>S. uberis</i>	1,96	0,49	0,25	781,25	195,31	0,2	0,50	Sinergia
9	<i>S. uberis</i>	1,96	0,98	0,50	781,25	781,25	1,0	1,50	Indiferente
10	<i>S. dysgalactiae</i>	3,93	1,96	0,50	390,62	195,31	0,5	1,00	Adición
	Media	1,77	0,83	0,47	664,06	332,03	0,57	1,05	Aditivo
	Desv. Estd.	0,90	0,46	0,08	370,58	185,29	0,31	0,35	
							ANOVA	0,576	

TMS: Tilmicosina, ATCC: American Type Culture Collection.

Tabla 7. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de Tilmicosina y timol contra *Escherichia coli*.

ESCHERICHIA COLI

		<i>MIC</i>	<i>MIC</i>	<i>FIC</i>	<i>MIC</i>	<i>MIC</i>	<i>FIC</i>		
		<i>TMS</i>	<i>TMS+timol</i>	<i>TMS</i>	<i>Timol</i>	<i>Timol+TMS</i>	<i>Timol</i>	<i>FIC</i>	<i>Interpretación</i>
	Cepa	<i>µg/ml</i>	<i>µg/ml</i>		<i>µg/ml</i>	<i>µg/ml</i>	<i>FIC</i>		
1	ATCC 8739	1,96	0,98	0,50	3125	1562,5	0,5	1,00	Adición
2	ATCC 35218	0,98	0,49	0,50	1562,5	1562,5	1,0	1,50	Indiferente
3	<i>E. coli</i>	0,98	0,49	0,50	390,62	390,62	1,0	1,50	Indiferente
4	<i>E. coli</i>	0,98	0,24	0,24	390,62	390,62	1,0	1,24	Indiferente
5	<i>E. coli</i>	0,98	0,24	0,24	390,62	195,31	0,5	0,74	Adición
6	<i>E. coli</i>	0,98	0,24	0,24	390,62	195,31	0,5	0,74	Adición
7	<i>E. coli</i>	1,96	0,49	0,25	781,2	195,31	0,3	0,50	sinergia
8	<i>E. coli</i>	1,96	0,49	0,25	781,2	195,31	0,3	0,50	sinergia
9	<i>E. coli</i>	1,96	0,49	0,25	1562,5	1562,5	1,0	1,25	Indiferente
10	<i>E. coli</i>	1,96	0,49	0,25	390,62	195,31	0,5	0,75	Adición
	Media	1,47	0,464	0,32	976,55	644,529	0,65	0,97	Aditivo
	Desv,	0,52	0,22	0,12	887,91	638,22	0,32	0,38	

TMS:Tilmicosina, ATCC: American Type Culture Collection.

El índice de concentración inhibitoria fraccionada para *Staphylococcus* fue de 0.75 ± 0.16 , para *Streptococcus* fue de 1.05 ± 0.35 y *E.coli* de 0.97 ± 0.38 como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Índice de concentración fraccionada inhibitoria de Tilmicosina y timol contra los diferentes patógenos analizados.

Cepa	Media de FICI
<i>Staphylococcus</i>	0,75 ±0.16
<i>Streptococcus</i>	1,05 ± 0.35
<i>E.coli</i>	0,97±0.38
ANOVA	3.39

12.2 SOLUBILIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO

A partir de esta prueba se determinó la solubilidad de Timol y de Tilmicosina en el triglicérido de cadena media (TCM) que se utilizaría para los dos sistemas. La solubilidad que presentó el activo en los TCM permitió utilizar dicho aceite como fase oleosa para la formulación del emulgel y el transcutool fue utilizado como un agente promotor de permeación. Así mismo se determinó la solubilidad de Tilmicosina y Timol en metanol y solución con Brij® 52 al 2.5 % pH 7 (tabla 9), el cual sería utilizado como medio en las pruebas de *in vitro* de disolución y permeación.

Tabla 9. Solubilidades experimentales en diferentes sustancias.

Activo	Triglicéridos de cadena media (TCM)	Metanol	Transcutol	Brij 52 2.5% pH 7
Timol	826.5 mg/ml	901.5 mg/ml	1350mg/ml	23.1mg/ml
TMS	78.7 mg/ml	57.6 mg/ml	77mg/ml	37.2mg/ml

12.3 EVALUACIONES DEL SISTEMA SEMISÓLIDO

12.3.1 Color, olor y apariencia del sistema semisólido.

Es importante señalar que las características organolépticas son características físicas de una formulación o forma farmacéutica que confieren a ésta una apariencia, color, olor, textura, consistencia, los cuales son determinadas a través de los sentidos. Son características propias o normales o bien aquellos que son alterados o impropios originados por diversas causas. Se determinaron las características organolépticas de los sistemas semisólidos, por periodo de un mes, obteniendo los resultados que se describen en la tabla 10.

Tabla 10. Color, olor y apariencia del sistema semisólido emulgel con tilmicosina y timol durante 6 meses.

CARACTERÍSTICA	EMULGEL TILMICOSINA-TIMOL	
Color	Amarillo perlescente	
Olor	Característico	
Textura	Suave, cremoso	

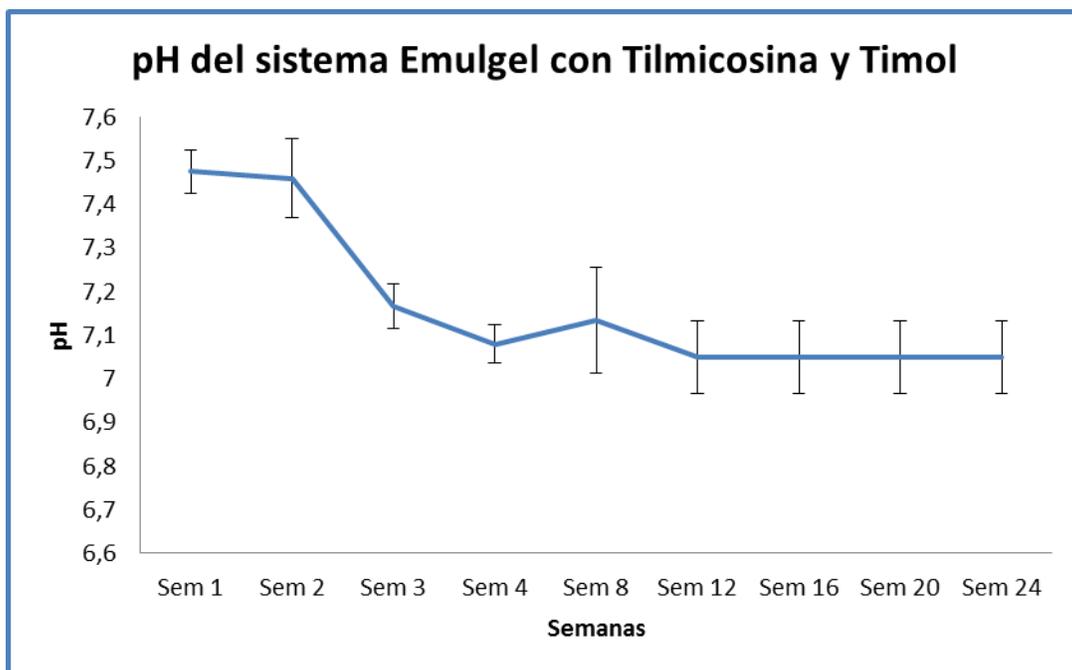
12.3.2 Potencial de hidrogeno (pH).

En la tabla 11 se describen los valores de pH obtenidos durante un periodo de 6 meses y en la gráfica 1 los valores promedio con sus desviaciones estándar. Al analizar los datos mediante la prueba de ANOVA se obtiene que no hay diferencia significativa $p > 0.05$ entre las mediciones realizadas durante un periodo de 6 meses.

Tabla 11. Valores de pH obtenidos en el sistema semisólido Emulgel con Tilmicosina y Timol

	<i>Sem 1</i>	<i>Sem 2</i>	<i>Sem 3</i>	<i>Sem 4</i>	<i>Sem 8</i>	<i>Sem 12</i>	<i>Sem 16</i>	<i>Sem 20</i>	<i>Sem 24</i>	<i>Coef. Var.</i>
<i>pH</i>	7,475	7,46	7,16	7,08	7,13	7,05	7,05	7,05	7,05	1,40

Gráfica 1. Determinación de pH del sistema emulgel con tilmicosina y timol



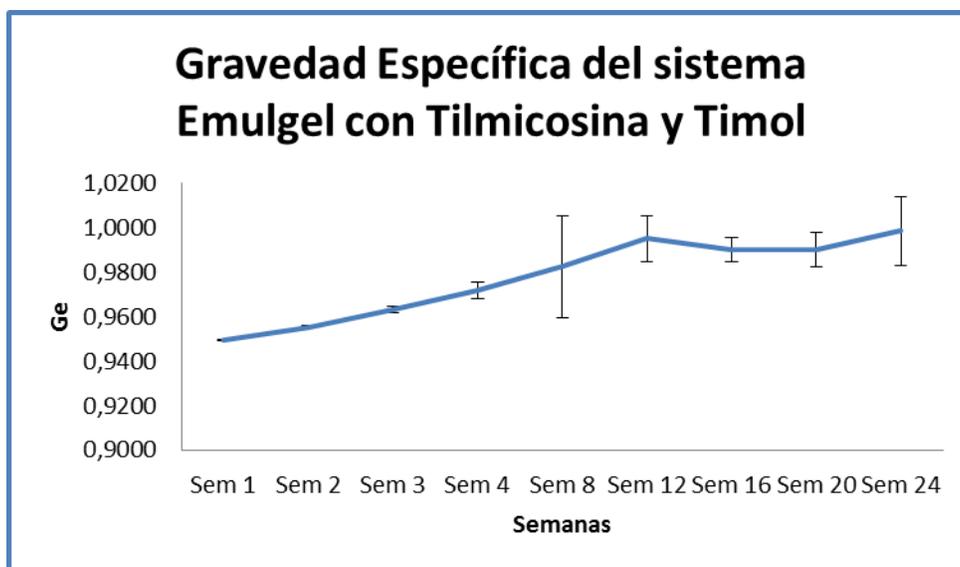
12.3.3 Gravedad específica.

Los resultados obtenidos en la tabla 12, se observa el valor de la gravedad específica del emulgel con su coeficiente de variación, y en la gráfica 2 se describe la tendencia de los promedios con sus desviaciones estándar. Al analizar los datos mediante la prueba de ANOVA se obtiene que no hay diferencia significativa $p > 0.05$ entre las mediciones realizadas durante un periodo de 6 meses.

Tabla 12. Valores de gravedad específica del sistema semisólido emulgel con Tilmicosina y Timol

	<i>Sem 1</i>	<i>Sem 2</i>	<i>Sem 3</i>	<i>Sem 4</i>	<i>Sem 8</i>	<i>Sem 12</i>	<i>Sem 16</i>	<i>Sem 20</i>	<i>Sem 24</i>	<i>Coef. Var.</i>
<i>Ge</i>	0,950	0,955	0,963	0,972	0,982	0,995	0,990	0,990	0,998	0,31

Grafica 2. Medición de la gravedad específica del sistema emulgel con tilmicosina y timol durante 6 meses



12.3.4 Carga superficial

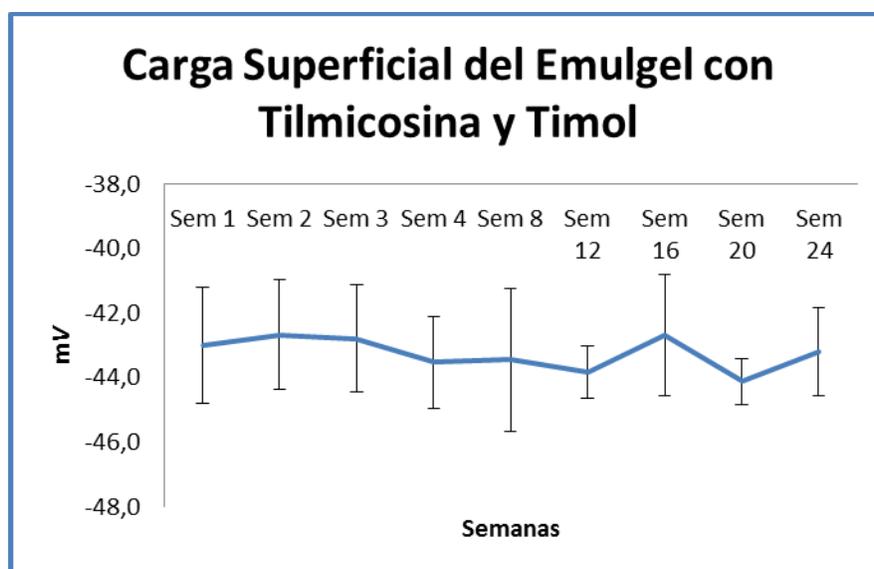
Los datos obtenidos de la carga superficial del emulgel se muestran en la tabla 13 y en la gráfica 3 se describe la tendencia de los promedios con sus desviaciones estándar.

Al analizar los datos mediante la prueba de ANOVA se obtiene que no hay diferencia significativa $p > 0.05$ entre las mediciones realizadas durante un periodo de 6 meses.

Tabla 13. Valores de carga superficial del sistema semisólido emulgel con tilmicosina y timol

	<i>Sem 1</i>	<i>Sem 2</i>	<i>Sem 3</i>	<i>Sem 4</i>	<i>Sem 8</i>	<i>Sem 12</i>	<i>Sem 16</i>	<i>Sem 20</i>	<i>Sem 24</i>	<i>Coef. Var.</i>
<i>mV</i>	-43,0	-42,7	-42,8	-43,5	-43,5	-43,8	-42,7	-44,1	-43,2	-0,43

Grafica 3. Medición de la carga superficial del emulgel con Tilmicosina y Timol.



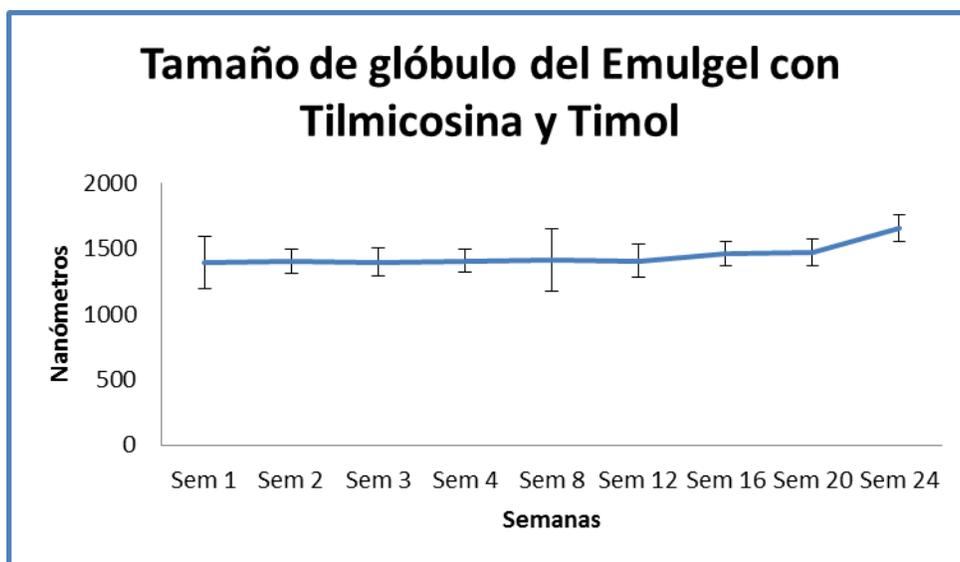
12.3.5 Tamaño de glóbulo

Los resultados obtenidos se describen en la tabla 14 y en la gráfica 4 se muestra la tendencia de los promedios con sus desviaciones estándar. Al analizar los datos mediante la prueba de ANOVA se obtiene que no hay diferencia significativa $p > 0.05$ entre las mediciones realizadas durante un periodo de 6 meses.

Tabla 14. Valores de gravedad específica del sistema semisólido emulgel con tilmicosina y timol

	<i>Sem 1</i>	<i>Sem 2</i>	<i>Sem 3</i>	<i>Sem 4</i>	<i>Sem 8</i>	<i>Sem 12</i>	<i>Sem 16</i>	<i>Sem 20</i>	<i>Sem 24</i>	<i>Coef. Var.</i>
<i>Nanómetros</i>	1392	1398	1397	1405	1412	1404	1462	1470	1659	2,42
<i>Índice de polidispersión</i>	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	2,16

Gráfica 4. Tamaño de glóbulo del sistema emulgel con tilmicosina y timol durante 6 meses.



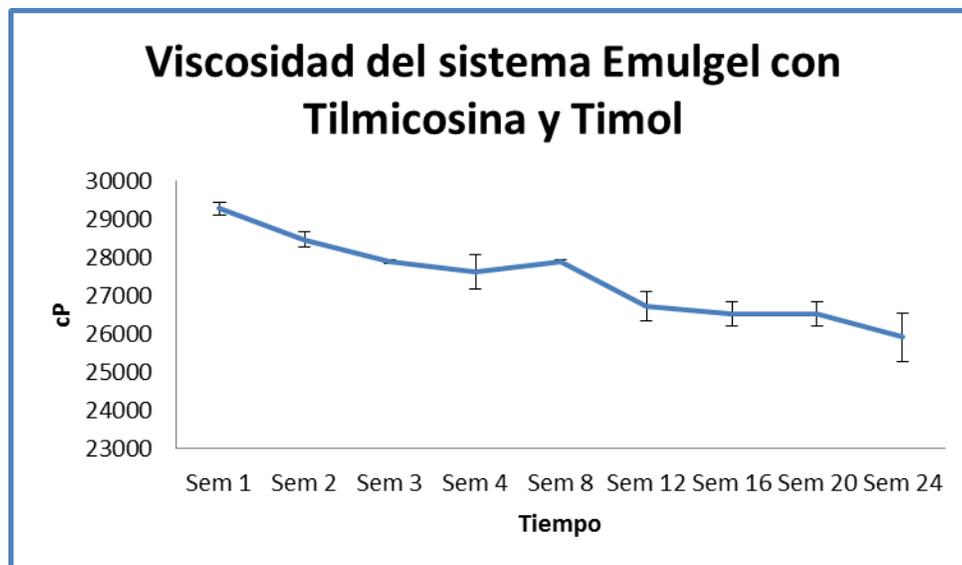
12.3.6 Viscosidad

La viscosidad se determinó a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con un promedio de torque de 40.5 ± 4 , los resultados se observan en la tabla 15 y la tendencia con sus desviaciones estándar se puede observar en la gráfica 5. Al analizar los datos mediante la prueba de ANOVA se obtiene que no hay diferencia significativa $p > 0.05$ entre las mediciones realizadas durante un periodo de 6 meses.

Tabla 15. Valores de cp para medir la viscosidad del sistema semisólido emulgel con Tilmicosina y Timol

	<i>Sem 1</i>	<i>Sem 2</i>	<i>Sem 3</i>	<i>Sem 4</i>	<i>Sem 8</i>	<i>Sem 12</i>	<i>Sem 16</i>	<i>Sem 20</i>	<i>Sem 24</i>	<i>Coef. Var.</i>
<i>Viscosidad cP</i>	29276	28456	27895	27610	27895	26715	26525	26525	25913	0,31

Grafica 5. Medición de la viscodidad del sistema emulgel con tilmicosina y timol durante 6 meses.



12.3.7 Estabilidad

Se siguió la estabilidad de los sistemas a temperatura ambiente, a 40°C y se realizaron pruebas de estabilidad acelerada por ultra centrifugación, los resultados se muestran en las tablas 16.

Tabla 16. Estabilidad a temperatura ambiente y estabilidad acelerada

SEMANA	ESTABILIDAD A TEMPERATURA AMBIENTE	ESTABILIDAD ACELERADA EN ESTUFA 40°C	ESTABILIDAD CON ULTRA CENTRIFUGACION
1	No hay separación de fases	No hay separación de fases	No hay separación de fases
2	No hay separación de fases	No hay separación de fases	No hay separación de fases
3	No hay separación de fases	No hay separación de fases	No hay separación de fases
4	No hay separación de fases	No hay separación de fases	No hay separación de fases
Mes 2	No hay separación de fases	No hay separación de fases	No hay separación de fases
Mes 3	No hay separación de fases	No hay separación de fases	No hay separación de fases
Mes 4	No hay separación de fases	No hay separación de fases	No hay separación de fases
Mes 5	No hay separación de fases	No hay separación de fases	No hay separación de fases
Mes 6	No hay separación de fases	No hay separación de fases	No hay separación de fases

12.4 PERFILES DE LIBERACIÓN

12.4.1 Condiciones del detector, columna cromatográfica.

Las mediciones se realizaron con el equipo HPLC Varian Prostar modelo 410, la columna utilizada fue Varian® 100 RP-18, ya que esta columna permitió obtener picos con buena simetría, lo cual nos asegura una adecuada integración y con ello una cuantificación confiable, la temperatura de columna utilizada fue de 25°C; la fase móvil para la cuantificación de Tilmicosina y Timol en el medio de disolución consistió en Acetonitrilo: Agua en una proporción de 50:50 respectivamente con pH de 7.

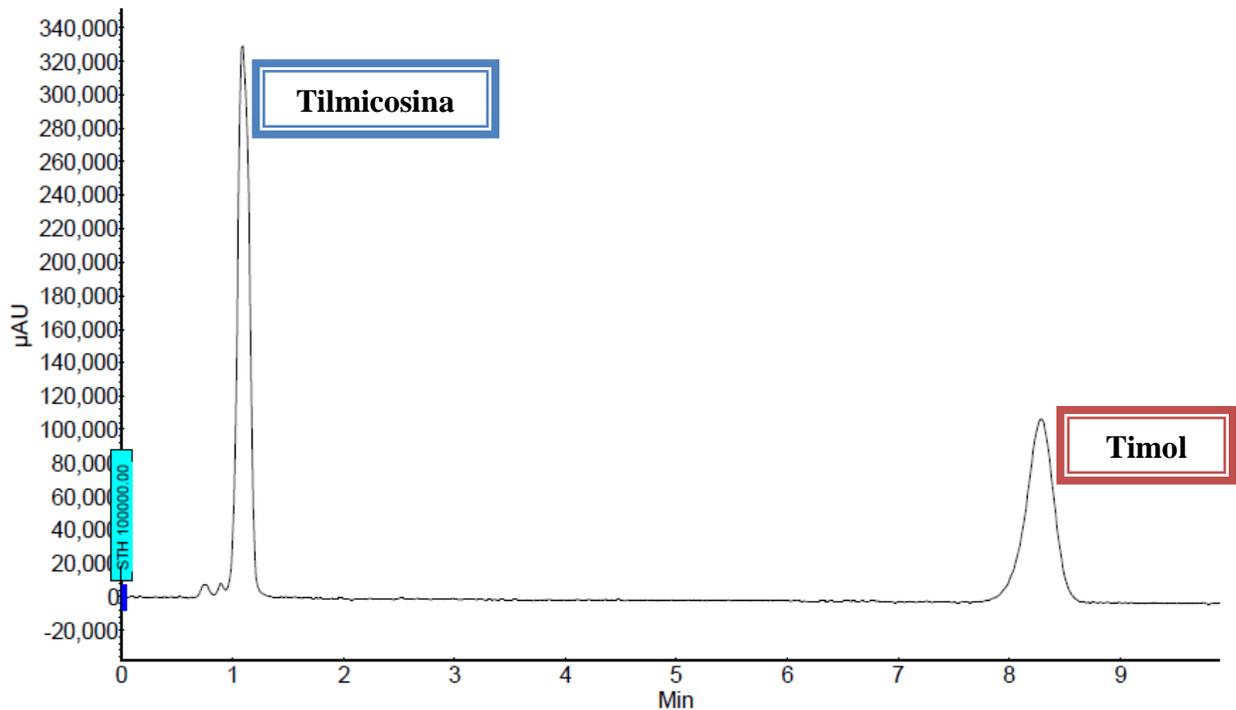
12.4.2 Volumen de inyección, velocidad de flujo y fase móvil.

Se evaluaron volúmenes de inyección de 10 a 50 μL y un rango en la velocidad de flujo de 1.0 a 1.5 mL/min, sin embargo, las condiciones en donde se obtuvieron mejores resultados fueron utilizando un volumen de inyección de 20 μL , esta elección se debió a que a volumen de inyección grandes provocan la deformación del pico de interés esto se confirmó con el Boletín 826E de Sigma Aldrich (2009), y a una velocidad de flujo de 1 mL/min se debe tener un flujo donde la presión se mantenga constante sin fluctuaciones, que favorezcan los parámetros cromatográficos del pico de interés, ya que bajo estas condiciones (tabla 17) se obtuvo una buena resolución y simetría de los picos de interés, además de un tiempo de retención apropiada para los analitos como se observa en la gráfica 6.

Tabla 17. Condiciones cromatográficas finales

Condiciones	Tilmicosina	Timol
Longitud onda	284nm	275nm
Columna	Varian® 100 RP-18	Varian® 100 RP-18
Fase móvil	ACN:Agua (50:50)	ACN:Agua (50:50)
Velocidad de Flujo	1 mL/min	1 mL/min
Volumen de inyección	20 μL	20 μL

Gráfica 6. Detección de Tilmicosina y timol con HPLC.



12.4.3 Validación del método analítico.

La relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en cada curva, fue ajustada a través de una regresión lineal a la ecuación $y = mx + b$, con ponderación donde la variable “y” es la respuesta analítica (de áreas bajo la curva) obtenida para su respectiva concentración nominal “x” de timol y tilmicosina. La linealidad del método fue definida a partir del coeficiente de correlación lineal (r^2), cuyo valor de cumplimiento para cada curva de calibración fue de 0.99 respectivamente (Gráficas 3 y 4).

Se reportan los datos de pendiente (b), ordenada al origen (a) y coeficiente de correlación para las seis curvas de calibración graficando concentración nominal vs respuesta de áreas de tilmicosina y timol.

Se observa el promedio de la respuesta de tilmicosina y timol en el medio de disolución utilizado en la prueba de disolución y permeación en un rango de concentraciones de 10-160 µg/mL. Al graficar el promedio de las áreas de tilmicosina y timol, cada punto de la

curva de calibración se dio cumplimiento a los criterios de aceptación establecidos para precisión y exactitud para el límite de cuantificación como se observa en las tablas 18 y 19.

Tabla 18. Relación concentración con área bajo la curva para la validación de la cuantificación de Tilmicosina con HPLC.

Concentración de estándares, µg/ml	Área bajo la curva	Dev. Estd.	C.V
10	3998	272,7	0,05
20	7008	473,1	0,05
40	14001	1214,4	0,04
80	28837	2579,5	0,05
160	56994	4516,6	0,01

Grafica 7. Curva de calibración de Tilmicosina

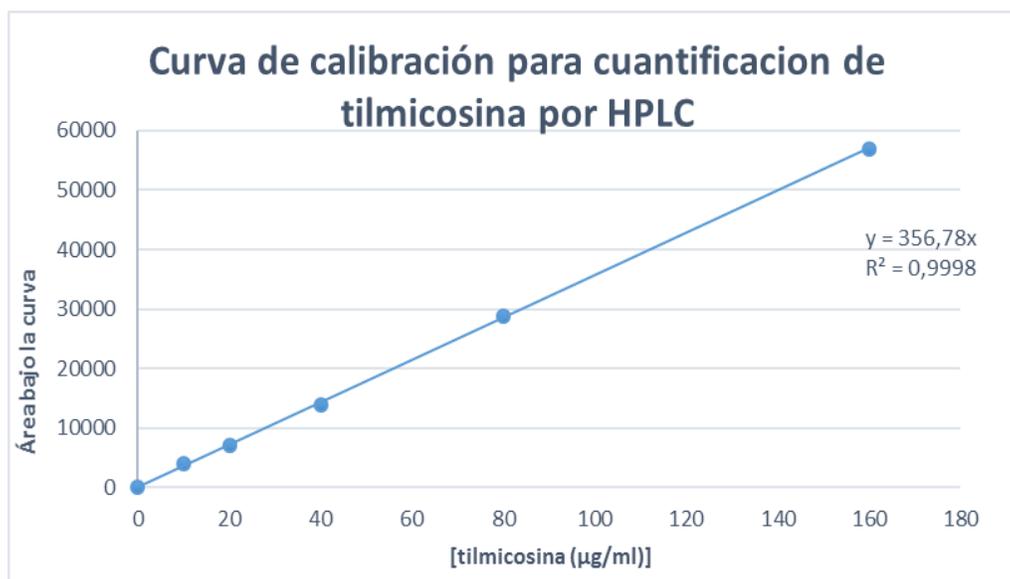
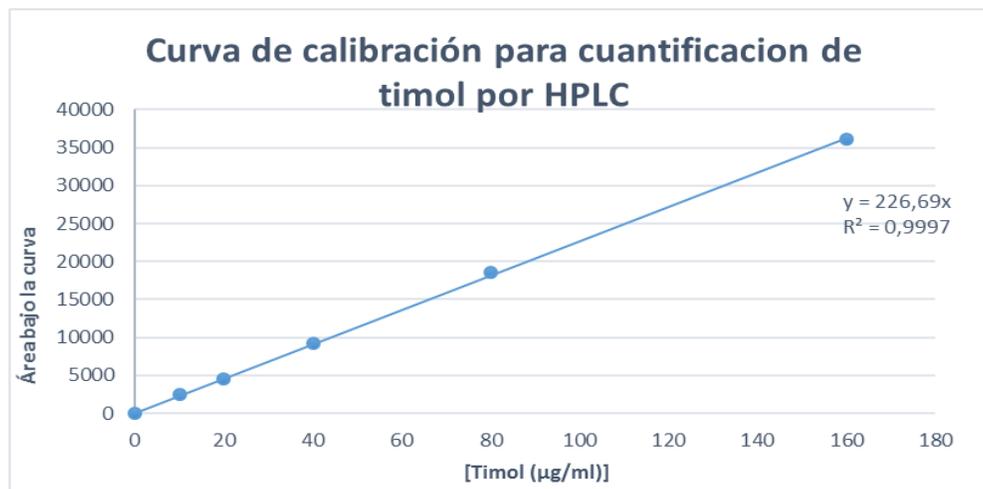


Tabla 19. Relación concentración con área bajo la curva para la validación de la cuantificación de Timol con HPLC.

Concentración de estándares, µg/ml	Área bajo la curva (promedio)	Dev. Estd.	C.V
10	2472	271,42	0,07
20	4545	484,42	0,06
40	9154	822,19	0,04
80	18521	2428,99	0,01
160	37042	4289,52	0,01

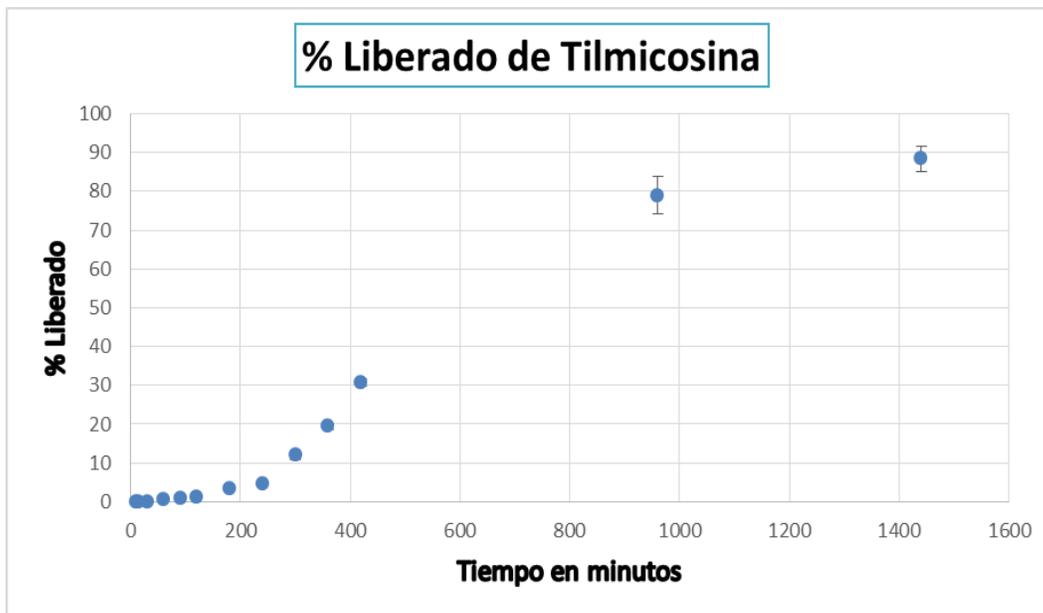
Grafica 8. Curva de calibración de Timol.



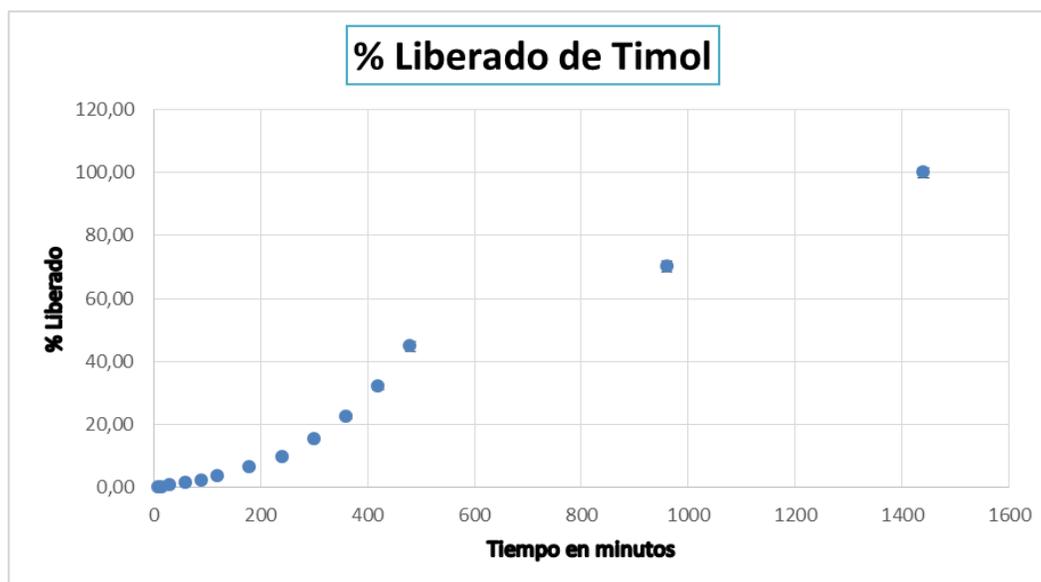
12.5 RESULTADOS DE PERFILES DE LIBERACIÓN

Una vez caracterizado el sistema semisólido se realizó el estudio de perfil de liberación. Se realizaron los ajustes matemáticos tomando en cuenta el volumen de la muestra y realizando las correcciones sumando las concentraciones anteriores en cada medición. El estudio se realizó durante 24 horas. Los resultados de perfiles de liberación de tilmicosina y timol se describen en las gráficas 9 y 10 respectivamente.

Gráfica 9. Perfil de liberación de tilmicosina.



Gráfica 10. Perfil de liberación de timol.



Una vez obtenidos los perfiles de liberación, los datos se ajustaron a diferentes modelos matemáticos con la finalidad de conocer el mecanismo de liberación. Para cada perfil de liberación y su ajuste se obtuvo el valor de r^2 , los datos se describen en la tabla 20.

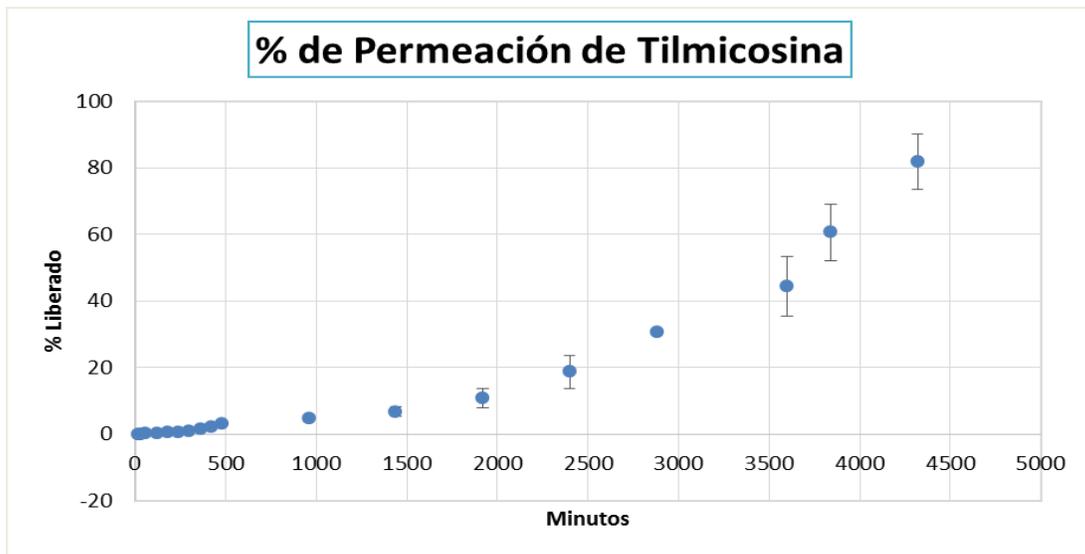
Tabla 20. Parámetros cinéticos de liberación de tilmicosina y timol.

Activo	Cinética	R^2	tmax (minutos)	Cmax (%)	Korsmeyer-Peppas
Tilmicoisna	Higuchi	0.9720	1440	88.4	0.5
Tilmicosina	Orden 0	0.8771	1440	88.5	
Tilmicosina	Orden 1	0.6175	1440	88.6	
Timol	Higuchi	0.9855	1440	99.97	0.5
Timol	Orden 0	0.9651	1440	99.97	
Timol	Orden 1	0.7818	1440	99.97	

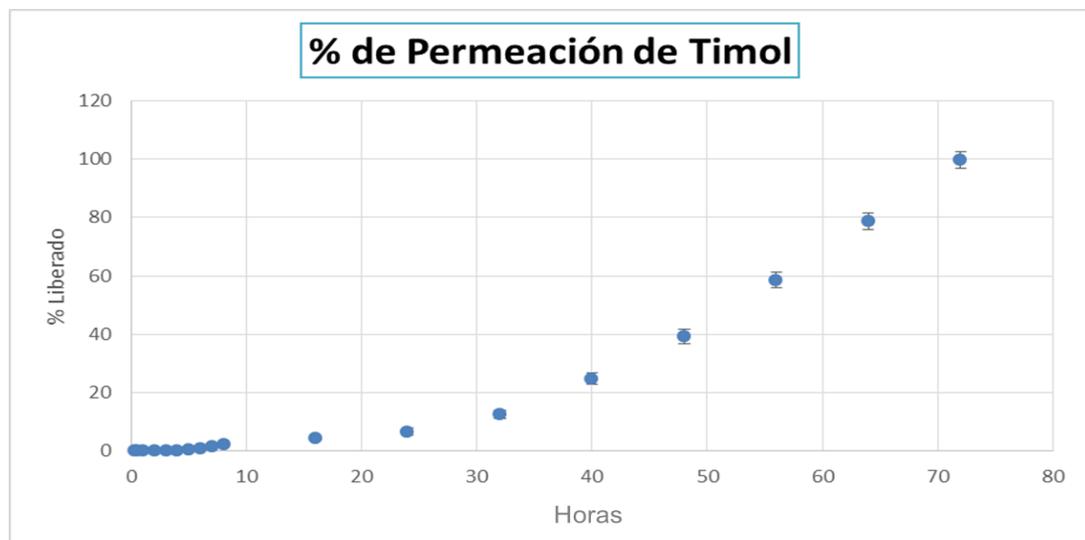
12.6 RESULTADOS DE CINÉTICA DE PERMEACIÓN

Una vez caracterizado y obtenido los resultados de la cinética de liberación del sistema semisólido se realizaron los estudios de permeación *in vitro*. Los resultados se describen en las gráficas 11 y 12.

Grafica 11. Cinética de permeación de tilmicosina.



Grafica 12. Cinética de permeación de timol.



Los datos de los perfiles se ajustaron a diferentes modelos matemáticos con la finalidad de conocer el mecanismo de difusión. Para cada perfil de permeación y su ajuste se obtuvo el valor de r^2 , los datos se describen en la tabla 21.

Tabla 21. Parámetros cinéticos de permeación de tilmicosina y timol.

Activo	Cinética	R	tmax (minutos)	Cmax (%)	Korsmeyer-Peppas
Tilmicoisna	Higuchi	0.9826	5280	81.9	1.0
Tilmicosina	Orden 0	0.8830	5280	81.9	
Tilmicosina	Orden 1	0.8746	5280	81.9	
Timol	Higuchi	0.9752	4320	99.8	0.5
Timol	Orden 0	0.8967	4320	99.8	
Timol	Orden 1	0.8763	4320	99.8	

12.7 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN DE TILMICOSINA Y TIMOL RETENIDA EN LA PIEL.

Los resultados de la extracción en piel de tilmicosina y timol se muestran en las tablas 22 y 23 respectivamente, en donde se observa el porcentaje de los activos retenidos en la piel.

Tabla 22. Porcentaje retenido de Tilmicosina

	Área bajo la curva	Desv. Estd.	C.V %	Concentración µg	Porcentaje retenido
Piel	27914,87	1735,61	6,22	2,54	3,4

Tabla 23. Porcentaje retenido de Timol

	Área bajo la curva	Desv. Estd.	C.V %	Concentración µg	Porcentaje retenido
piel	18726,57	192,01	1,03	3,86	5.1

13.1 EFECTO ANTIMICROBIANO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

Los valores obtenidos de las CMI's de tilmicosina contra *Staphylococcus* y *Streptococcus* en el presente estudio entran dentro de los rangos obtenidos en diferentes estudios, por ejemplo los obtenidos por Bonnier M. y Col (2006)¹⁰⁷, en donde analizaron 320 cepas tanto de *S. aureus* como de *S. uberis* de casos de mastitis bovina durante un año, y evaluaron el efecto de la tilmicosina y la tilosina, obteniendo como resultado en promedio una CMI de 1 µ/ml para *S. aureus* y 4µg/ml para *S. uberis*; en el presente estudio se obtuvieron 2.65±1.14 y 1.77±0.9, probablemente debido a lo que explica Wang y Col. 2008, en donde evalúan la resistencia que existe en algunas cepas de *S. aureus* dependiendo de los fenotipos y genotipos de resistencia; aislamientos de *S. aureus* con fenotipos cML reveló un alto grado de resistencia a la eritromicina, tilosina, espiramicina, tilmicosina, lincomicina y clindamicina. Mientras aislamientos de *S. aureus* con fenotipos iML mostraron tasas considerablemente más bajas de resistencia a macrólidos y lincosamidas y los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias que obtuvieron de tilmicosina contra *S. aureus* van de 2- >128µl/ml¹⁰⁸. Sin embargo, cabe señalar que la tilmicosina por su conformación permite que se formen enlaces más efectivos con la subunidad ribosomal 50S en comparación con los otros miembros de los macrolidos esto le permite escapar más fácilmente de un choque estérico causado por la metilación por lo que la tasa de resistencia es menor¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

Por otro lado, con los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias de la tilmicosina particularmente con las cepas de *Staphylococcus* se observó una resistencia del 3.4% con respecto a lo reportado por Ose E. E. (1987)⁷⁵, en estudios recientes se han reportado resistencias a algunos macrolidos en particular la tilosina que es precursora de la tilmicosina, en Rumania e Iran de hasta un 56%,^{108,111,112}; otros estudios de diferentes áreas geográficas han reportado resistencias desde un 4% hasta un 40%.^{108,112} Sin embargo, Bonnier 2002 reporta resistencia a la tilosina y no a tilmicosina¹⁰⁷. Con respecto a los *Streptococcus* y *E.coli* concuerdan con lo reportado en algunos estudios, en particular el *Streptococcus dysgalactiae* en donde se reporta una MIC de 3,12 µg/ml MIC en el presente

estudio se obtuvo 3.93 µg/ml; para las *E.coli* existen estudios donde reportan un rango de 0.6-13.93 µg/ml, en el presente estudio se obtuvo 1.47±0.52 µg/ml¹¹³.

El valor obtenido de las concentraciones mínimas inhibitorias del timol concuerda con los valores obtenidos por Dal Pozzo y cols. (2011), en donde obtienen rangos de CMI's de 200-800 µl/ml de 32 aislamientos de *Staphylococcus* tanto coagulasa positivos como negativos, provenientes de casos de mastitis bovina¹¹⁴. En el presente estudio se obtuvo en promedio 429.68 ± 123.53 de 10 aislamientos, en su mayoría coagulasa positivo de *Staphylococcus*; para el caso de los *Streptococcus* y coliformes, los resultados son muy parecidos a los rangos obtenidos en diferentes estudios¹¹⁵⁻¹¹⁷, en donde se ha observado que las bacterias gram positivas son más susceptibles a los componentes de los aceites esenciales en este caso al timol^{77,118,119}.

D Kifer y cols. 2016¹²⁰, evaluaron monoterpenos entre ellos el timol contra *Staphylococcus aureus* y su biopelícula, en donde encontraron que el timol pudo reducir la biopelícula en un 90% en concentraciones de dos a seis veces más altas que sus MIC; esto debido a su relativa capacidad hidrofílica de los monoterpenos que permite su penetración a través de la matriz de exopolisacárido (biopelícula), mientras que su naturaleza lipofílica permite la interacción con estructuras de la membrana bacteriana. Cabe señalar que la tilmicosina ha demostrado tener importantes interacciones con fagocitos bovinos y células epiteliales, demostrando un papel importante en su eficacia clínica frente a organismos intracelulares; la evasión de *S. aureus* durante la terapia antibiótica en el periodo seco, es por vía intracelular¹²¹. Hensen y col.(2000)¹²² estudiaron la ubicación de *S. aureus* tras una infección experimental en tejidos con anticuerpos contra el polisacárido capsular 5 (CP5). En etapas tempranas como crónicas de estas infecciones, *S. aureus* se localizó en el lumen de los alvéolos asociado con epitelio y dentro de las células fagocíticas. Asimismo, Sordillo y Nickerson (1989)¹²³ demostró que tanto en infección crónica natural y en infecciones experimentales, se pudo observar *S. aureus* en neutrófilos o macrófagos. Por lo tanto, si un producto intramamario tiene la capacidad de ser acumulado dentro de las células se puede obtener una mejor eficacia contra la mastitis causada por *S. aureus*.

Cuando se combina la tilmicosina con el timol para el caso de los *Staphylococcus* se observa una disminución en la concentración de la Tilmicosina y Timol del valor de la CMI de hasta 4 y 3 veces su valor respectivamente; cabe recordar el mecanismo de acción

antibacteriano del timol descrito por Trombetta y col.(2005)⁸², donde comenta que podría migrar a través del medio acuoso extracelular e interactuar con los lípidos de la membrana dando lugar a alteraciones de la permeabilidad permitiendo la filtración de materiales al interior de la célula bacteriana. Por otro lado, la tilmicosina es un antibiótico macrólido que inhibe la síntesis proteica por su unión reversible a la subunidad ribosomal 50s del microorganismo sensible, en donde pueden interferir con la formación de complejos de iniciación para la síntesis de cadenas de péptidos o con las reacciones de aminoacil translocación¹²⁴. Esto impide a la bacteria continuar con su ciclo vital. Los mecanismos antibacterianos de los dos compuestos pueden actuar de forma sinérgica o aditiva como lo observado por Kissels y et al.¹²⁵ en donde obtienen adición al combinar tilmicosina y timol contra cepas de *P. multocida* y *M. hemolítica*. En el presente estudio, los valores obtenidos del índice de concentración fraccionada (tabla 7) se obtuvieron como resultado adición para los tres géneros bacterianos evaluados, no habiendo diferencia significativa entre ellos, los resultados son similares a lo presentado por Palaniappan y col. (2010) en donde obtiene sinergismo al combinar timol y eritromicina que es un antibiótico de la familia de los macrólidos contra *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* N00 666 y *Salmonella Typhimurium* SGI 1⁸⁰, existen varios estudios en donde se han observado el sinergismo que existe entre aceites esenciales y antibióticos como una estrategia alternativa para combatir las bacterias resistentes a los antibióticos¹²⁶.

13.2 ESTABILIDAD DEL EMULGEL

13.2.1 Estabilidad.

Las pruebas de estabilidad evalúan el efecto de los factores ambientales en la calidad de una sustancia farmacéutica o un producto formulado que se utiliza para predecir su vida útil, determinar las condiciones de almacenamiento adecuadas y sugerir en el etiquetado; además, los datos generados durante las pruebas de estabilidad son un requisito importante para la aprobación reglamentaria de cualquier medicamento o formulación.

Durante la observación del sistema semisólido por periodo de seis meses, no hay cambios organolépticos y no hay sinéresis y separación de fases. La finalidad de evaluar dichas características es distinguir un cambio en las condiciones normales o propias de la

formulación a través del tiempo, ya que esto manifiesta un probable cambio en sus propiedades químicas. Lo anterior, se puede explicar a que la estabilidad termodinámica de la emulsión aumenta con el surfactante en este caso el Pluronic® F68. El surfactante reduce la energía interfacial entre ambas fases, mejorando así la estabilidad termodinámica de las emulsiones. Si la composición se elige de la manera adecuada, la emulsión permanece estable por un tiempo prolongado. Como se discutió anteriormente, la emulsión es una mezcla de dos líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea; un líquido (la fase dispersa) es dispersado en otro (la fase continua o fase dispersante), si las moléculas bioactivas se solubilizan en la fase dispersa, esta actúa como un reservorio para los activos^{90,127}.

Debido a esta razón, la emulsión ha sido reportada como un sistema de administración controlada. En tal sistema, la liberación del medicamento se rige por la partición del fármaco en ambas fases. Por lo tanto, es posible controlar la liberación del activo solo por alterar la composición de la fase apolar^{127,128}.

El emulgel tiene una textura suave, cómoda y ligeramente grasa cuando se aplica en la piel, el color es ligeramente amarillo ya que la tilmicosina base es de color amarillo.

13.2.2 pH

Los efectos del pH son importantes para proporcionar buenas propiedades de bioadhesión a los sistemas semisólidos. A valores de pH alcalinos, no se pueden sintetizar lípidos esenciales de la epidermis, la piel pierde agua y se deshidrata. Las cadenas del polímero se encuentran sumamente hinchadas y se encuentran en una forma viscoelástica gomosa, lo cual permite la difusión y comunicación de la cadena con el tejido animal. El valor de pH del emulgel fue neutro para poder aumentar la viscosidad del sistema, lo cual le ayudaría a mantener una buena estabilidad y mantener el manto ácido natural de la piel inhibiendo al mínimo los daños estructurales y fisiológicos de la piel. En los resultados de las mediciones se observa una ligera disminución en el pH a partir del tercer mes manteniéndose estable durante los siguientes tres meses, lo anterior concuerda con lo obtenido por Algin (2013)¹²⁹, en donde miden durante 6 meses el pH de un emulgel tópico a base de extractos naturales y

utilizando trietanolamina para ajustar pH y carbopol, observando que el valor de pH disminuyó al final de 6 meses con algunas variaciones, con valores aceptables para evitar el riesgo de irritación de la piel. La formación de productos de oxidación en la fase de aceite podría ser la razón de la ligera reducción en los valores de pH¹²⁹.

13.2.3 Gravedad específica

En el resultado de la gravedad específica, se puede observar un ligero aumento, que al realizarle una prueba estadística a los datos indica que no hay diferencia estadísticamente significativa $p > 0.05$, durante un periodo de 6 meses a temperatura ambiente; por lo que se puede concluir que se mantiene estable, el ligero aumento se podría atribuir a la pérdida de agua por evaporación.

13.2.4 Potencial Z

El potencial zeta se utiliza a menudo como un indicador de la estabilidad de la gota, donde los valores $> \pm 30$ indican buena estabilidad contra la coalescencia. La falta de repulsión electrostática o potencial $Z=0$ ocasiona una disminución de la energía de superficie de las partículas, originando con ello la formación de flóculos y finalmente la separación del sistema¹³⁰. La estabilidad que presentó el emulgel durante 6 meses fue en promedio de 43.3 ± 0.5 ; lo anterior es debió a que el poloxámero y el polímero actúan creando un efecto estérico, evitando con ello la coalescencia de las partículas. Emulsiones con alto potencial zeta (negativo o positivo) se estabilizan eléctricamente mientras que las emulsiones con los potenciales zeta bajos tienden a coagularse o flocularse, lo que puede conducir a una mala estabilidad física. En general, cuando el potencial zeta de una emulsión es alto las fuerzas repulsivas exceden las fuerzas atractivas, resultando en un sistema estable.

13.2.5 Tamaño de partícula

Los datos obtenidos con esta prueba son: diámetro promedio e índice de polidispersión. El índice de polidispersión (IP), indica qué tan homogénea es la dispersión. Para considerar que una población es monodispersa su índice de polidispersión debe de encontrarse en un intervalo entre 0 y 0.5. Se realizó esta prueba con la finalidad de conocer el tamaño del glóbulo que presentaba el emulgel.

Se considera que una emulsión debe de tener una talla entre 500 – 2500 nm y su característica física principal es su color blanco, debido a que el haz de luz que incide sobre la muestra se dispersa en el sistema. La oscilación en el tamaño de partícula implica que los diámetros de las gotas están lejos de ser uniformes y que con el tiempo esto se resume en una inestabilidad del emulgel. En el presente estudio se obtuvo un promedio de 1444 ± 128.08 nm con un coeficiente de variación de 2.42% lo que indica poca coalescencia de glóbulos durante 6 meses, además de una polidispersión en promedio de 0.7 ± 0.05 . El tamaño final de los glóbulos de la emulsión está determinado por varios factores, que incluyen el método de preparación, la concentración de aceite, el sistema de surfactante y la proporción de surfactante y aceite utilizado. Las emulsiones preparadas con un homogeneizador de alta presión generalmente tienen un tamaño de glóbulos y una distribución de tamaños estrechos mucho más pequeños en comparación con las emulsiones preparadas por otros métodos¹³².

Desde un punto de vista biológico, las emulsiones finas pueden mejorar la absorción del fármaco a través de la piel mediante la rápida liberación y aumento del área de contacto de la fase interna con la piel¹³³.

13.2.6 Viscosidad

Los sistemas semisólidos son sistemas que presentan un flujo no newtoniano. Un sistema no newtoniano, es aquel que exhibe un flujo uniforme, pero para el que no es constante la relación entre la tensión tangencial y la velocidad de deformación. Hay tres tipos de comportamientos para los líquidos no newtonianos: plástico, pseudoplástico y dilatante. Se

observa que para el comportamiento reológico que presenta el emulgel al incrementar la velocidad de deformación la viscosidad disminuye, esto se debe a que la viscosidad es una función de la velocidad de deformación mostrando un comportamiento pseudoplástico. Dicho comportamiento, permite a la formulación su administración, ya que al ser un sistema semisólido es necesario que la viscosidad disminuya para su buena aplicación.

La tendencia de los valores de viscosidad con respecto al tiempo del sistema emulgel con timlicosina y timol observados en el presente estudio es que hasta la semana 8 existe una estabilidad en las mediciones, a partir de la semana 12 se observa una disminución aunque no significativa, esto puede ser posible porque la matriz de gel no puede mantener su viscosidad, es decir las cadenas poliméricas se van relajando; sin embargo, Gomes y col. (2010)¹³⁴ reportan un incremento drástico en las viscosidades tras los primeros días luego de la fabricación de geles a base de carbómeros, dada por el acomodo de las cadenas poliméricas dentro de las formulaciones hasta que la estructura del gel llega a un estado de equilibrio relativo, tras lo cual la viscosidad no muestra mayores variaciones. En cuanto a los valores de cP concuerdan con los reportados por Preeti y et al. (2013)¹³⁵ en donde geles con Carbopol® 940 mantienen un valor de viscosidad muy parecidos a los obtenidos en este estudio¹³⁵.

El tamaño puede tener efectos inesperados sobre la viscosidad debido a que las emulsiones con gotitas muy pequeñas puede desarrollar un orden de magnitud de mayor viscosidad en comparación con emulsiones gruesas¹³².

La relación entre el tamaño de gota y las propiedades físicas como la crema y la viscosidad se pueden derivar de la ley de Stokes, que establece que la tasa de sedimentación en sistemas coloidales es directamente proporcional al tamaño y está en relación inversa a la viscosidad^{90,132}.

13.2.7 Estabilidad de anaquel y estabilidad acelerada

La estabilidad de un medicamento puede definirse como la propiedad que tiene para mantener durante el tiempo de almacenamiento y uso sus características físicas, químicas, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas dentro de los límites especificados.

Los estudios de estabilidad de los medicamentos son fundamentales para asegurar la eficacia del producto a lo largo de su vida útil, dicha prueba simula el efecto de la gravedad a través del tiempo en este tipo de formulaciones. Esta prueba nos permite conocer el tiempo en el cual el emulgel puede sufrir alguna alteración y por consiguiente la separación de fases, cambios físicos y biológicos, así como la interacción que pudiera existir entre el activo y los componentes de la fórmula. Todos los sistemas dispersos después de determinado tiempo presentan una separación de sus fases. Cuando el factor tiempo afecta en el almacenamiento en esta prueba el resultado es la separación de fases, debido a diferentes factores físicos como coalescencia, rompimiento del sistema o floculación. Durante el tiempo de estudio de la estabilidad del sistema semisólido (30 días) a temperatura ambiente, no se observó cambio, confirmando esto con cada una de las evaluaciones realizadas (características organolépticas, viscosidad, pH, gravedad específica).

Los estudios de estabilidad acelerada de un medicamento pueden definirse como estudios diseñados para incrementar la velocidad de degradación química y/o biológica o el cambio físico de un medicamento, por medio del empleo de condiciones exageradas de almacenamiento.

Los resultados obtenidos de la estabilidad acelerada por medio de centrifugación, la cual confiere una idea de lo que pudiera llegar a suceder a la emulsión a través del tiempo. La muestra se sometió a condiciones de gravedad simulada (lo equivalente a un año). Se realizó también una prueba con temperatura (40°C), tras lo cual no se observó una separación de fases en el emulgel, ni la formación de algún precipitado o cambio de coloración en el sistema. Como se sabe un aumento de 10°C en la temperatura de almacenamiento duplica la velocidad de reacción, por ello, para realizar el estudio de estabilidad acelerada, se elevó aproximadamente 10°C la temperatura ambiental. Las pruebas de estabilidad a bajas temperaturas son particularmente importantes para emulsiones w/o, debido a que la capa del emulsificante estabilizada se puede destruir por un aumento en el volumen de la fase acuosa por la formación de cristales de hielo, sin embargo, el emulgel presenta propiedades de una emulsión o/w.¹²⁸

13.3 PERFIL DE LIBERACIÓN DE TIMOL Y TILMICOSINA

Se observó que al inicio de la liberación hubo un periodo de tiempo en el que la liberación tiene una tendencia lineal en bajas concentraciones; la cinética de liberación inicialmente fue de tipo orden cero cambiando a una de tipo Fick; esto puede explicarse a que existe un periodo de tiempo en el que tarda en relajarse el polímero y posteriormente comienza la liberación a mayores concentraciones del activo. Lo anterior concuerda con lo discutido por Zatz y Segers (1998)¹³⁶ en la que realiza una selección de puntos para calcular la tasa de liberación *in vitro* y afirman que existe una ventana de tiempo durante la cual se deben realizar los experimentos. Los datos deben recopilarse cuando la influencia de la membrana polimérica este lo suficientemente relajada, pero antes de que se produzca el agotamiento excesivo del fármaco a partir del semisólido¹³⁶. Por lo que se calculó por regresión lineal el tiempo de latencia (t_{lag}) y que corresponde a la pendiente de los primeros cinco puntos de datos obtenidos entre 0,5 y 3 h. Es decir que a partir de 0.5 h existe un equilibrio de difusión y después de 3 horas comienza la liberación, que después fue confirmado con los modelos matemáticos y la linealidad de las rectas de cada modelo.

Los monómeros con grupos funcionales ionizables que es el caso de los geles hechos con carbomero (reticulado del ácido acrílico) absorben gran cantidad de agua y tienen pobres propiedades mecánicas. Para los polímeros preparados a partir de estos monómeros, el hinchamiento en disolución acuosa de sales disminuye como consecuencia del apantallamiento de las cargas por los iones salinos (efecto polielectrolítico)¹⁰². La liberación del fármaco hidrófobo normalmente se asocia con hinchamiento y / o erosión de la matriz.

13.4 CINÉTICA DE PERMEACIÓN DEL EMULGEL CON TIMOL Y TILMICOSINA

La mayoría de los fármacos son ácidos o bases orgánicos débiles que se encuentran en las formas ionizada o no ionizada en un entorno acuoso. La forma no ionizada suele ser liposoluble (lipofílica) y difunde con facilidad a través de las membranas celulares. La forma ionizada es poco liposoluble y está sometida a una alta resistencia eléctrica, por lo que no le resulta fácil atravesar las membranas celulares.

En el caso de la tilmicosina es probable que la entrada al citosol sea un proceso pasivo, dependiente del gradiente de concentración como ya se han estudiado en los macrólidos; además que la difusión está íntimamente conectada a la estructura del material a través de la cual tiene lugar dicha difusión, la morfología de los materiales poliméricos deben tenerse en cuenta ya que los valores obtenidos de la permeación se ajustan al modelo matemático de Higuchi^{137,138}.

El timol es un activo no ionizado, al igual que la tilmicosina le permite difundir con facilidad a través de las membranas celulares; los resultados del presente estudio se ajustan al modelo de Higuchi lo que indica que su permeación también es mediante difusión.

La capacidad de las moléculas para cruzar membranas en ausencia de canales o transportadores específicos depende en gran medida de su capacidad para "disolverse" en la fase lipídica de la membrana. Por lo tanto, la hidrofobicidad es el factor determinante clave de la eficiencia de la entrada y acumulación de macrólidos para el caso de la tilmicosina, los valores de pKa también desempeñan un papel en algunos casos¹³⁷.

La proporción de la forma no ionizada presente y la capacidad del fármaco para atravesar membranas depende del pH ambiental y del pKa (constante de disociación ácida) del fármaco. El pKa es el pH en el cual las formas ionizada y no ionizada están presentes en concentraciones idénticas. Cuando el pH es menor que el pKa, en el caso de un ácido débil predomina la forma no ionizada, pero en las bases débiles la forma predominante es la ionizada. Tomando en cuenta lo anterior la tilmicosina con un pKa de 8.18 y el timol con un pKa de 10.6 al entrar en contacto con la piel que es ligeramente ácida aumenta la eficiencia de la permeación¹³⁹. Cabe señalar que, dentro de la glándula mamaria del bovino, la penetración de ácidos orgánicos se ve favorecida por el aumento del pH de la leche. Sin embargo, estos compuestos alcanzarán una relación leche: plasma por encima de 1 solo cuando el pH de la leche supere los 7.4. Esto indica que las bases débiles lipófilas administradas parenteralmente pueden tener una cierta ventaja en la distribución en leche en comparación con los ácidos¹⁴⁰.

Por otro lado, hay que recalcar que cualquier sustancia requiere cierto grado de hidrosolubilidad, pues de otra manera no podrá disolverse en los líquidos corporales¹⁴¹.

Tanto la tilmicosina como el timol presentan una estructura semipolar debido a que presentan grupos hidroxilo que les permite cierta hidrosolubilidad en el agua.

14 CONCLUSIONES

Al determinar la concentración mínima inhibitoria así como el índice de concentración inhibitoria fraccionada de los activos tilmicosina y timol contra cepas ATCC y de campo de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Escherichia*, se determinó que existe una actividad de adición para los tres géneros bacterianos evaluados por lo que las propiedades del antibiótico tilmicosina y el extracto natural timol al combinarlos puede ser una opción para el tratamiento en este caso para infecciones intramamarias en el ganado lechero en las que exista un problema de resistencia bacteriana.

Se desarrolló un sistema semisólido en presentación emulgel tópico que al realizarle pruebas de caracterización se determinó que presenta buena conservación y estabilidad durante un periodo de 6 meses de evaluación.

De acuerdo con los modelos matemáticos se determinó que la liberación de los activos tilmicosina y timol al inicio de la cinética de liberación es de tipo orden cero para posteriormente cambiar a una cinética de tipo Fick.

En los estudios de permeación los resultados se ajustan el modelo de Higuchi para los activos tilmicosina y timol lo que indica que el mecanismo de absorción es mediante difusión.

Se necesitan más estudios para evaluar citotoxicidad así como la farmacocinética de los activos para determinar la concentración en la glándula mamaria y establecer si se mantienen los niveles terapéuticos necesarios, así como estudios de eficacia en un modelo *in vivo*.

La ruta más común para la administración de antimicrobianos para la terapia en el secado para bovinos es la vía intramamaria; las ventajas de esta vía son las altas concentraciones logradas del antibiótico en la glándula mamaria. Las desventajas son la distribución poco uniforme de muchas sustancias a través de la ubre, el riesgo de contaminación al introducir la cánula de tratamiento por el conducto del pezón, y una posible irritación del tejido mamario causada por el fármaco; por lo que la aplicación tópica podría resolver estos problemas al no haber una manipulación del pezón, una absorción más uniforme y disminuir la irritación intramamaria debido a la liberación de manera controlada.

Dando mayor relevancia a la actividad aditiva que se observó al combinar la tilmicosina con el timol, y debido a que la industria lechera va en tendencia a disminuir la utilización de antimicrobianos, el uso de activos naturales que promuevan una disminución en la concentración de los antibióticos es una perspectiva hacia el futuro en las terapias antimicrobianas, que impactaría directamente en los costos de tratamiento, siendo beneficiado el sector económico de la industria lechera.

Otra de las ventajas al utilizar activos naturales en combinación con antibióticos es que pueden ser alternativas a los problemas de resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos.

1. Gonen E, Nedvetzki S, Naor D, Shpigel NY. CD44 is highly expressed on milk neutrophils in bovine mastitis and plays a role in their adhesion to matrix and mammary epithelium. *Vet Res.* 2008;39(3):1-9. doi:10.1051/vetres:2008005
2. Pinzón-Sánchez C, Cabrera VE, Ruegg PL. Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation. *J Dairy Sci.* 2011;94(4):1873-1892. doi:10.3168/jds.2010-3930
3. Menzies PI, Ramanoon SZ. Mastitis of Sheep and Goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2001;17(2):333-358. doi:10.1016/S0749-0720(15)30032-3
4. Wellenberg GJ, Van Der Poel WHM, Van Oirschot JT. Viral infections and bovine mastitis: A review. *Vet Microbiol.* 2002;88(1):27-45. doi:10.1016/S0378-1135(02)00098-6
5. Correa MGP, Marin JM. O-serogroups, eae gene and EAF plasmid in Escherichia coli isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol.* 2002;85(2):125-132. doi:10.1016/S0378-1135(01)00413-8
6. Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q.* 2007;29(1):18-31. doi:10.1080/01652176.2007.9695224
7. Rabello RF, Souza CRVM, Duarte RS, Lopes RMM, Teixeira LM, Castro ACD. Characterization of Staphylococcus aureus Isolates Recovered from Bovine Mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci.* 2005;88(9):3211-3219. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73004-6
8. Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011;16(4):357-372. doi:10.1007/s10911-011-9236-y
9. Piepers S, De Meulemeester L, De Kruif A, Opsomer G, Barkema HW, De Vlieghe S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy

- cows in Flanders, Belgium. *J Dairy Res.* 2007;74(4):478-483. doi:10.1017/S0022029907002841
10. Berry EA, Hogeveen H, Hillerton JE. Decision tree analysis to evaluate dry cow strategies under UK conditions. *J Dairy Res.* 2004;71(4):409-418. doi:10.1017/S0022029904000433
 11. Carrión-Granda X, Fernández-Pan I, Maté JI. Antimicrobial Edible Films and Coatings. 2012.
 12. Sol J, Sampimon OC, Barkema HW, Schukken YH. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci.* 2000;83(2):278-284. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74875-2
 13. Oliver SP, Murinda SE. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 2012;28(2):165-185. doi:10.1016/j.cvfa.2012.03.005
 14. Halasa T, Osterås O, Hogeveen H, van Werven T, Nielsen M. Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 1. Protection against new intramammary infections. *J Dairy Sci.* 2009;92(7):3134-3149. doi:10.3168/jds.2008-1740
 15. Pezeshki A, Mehrzad J, Ghorbani GR, De Spiegeleer B, Collier RJ, Burvenich C. The effect of dry period length reduction to 28 days on the performance of multiparous dairy cows in the subsequent lactation. *Can J Anim Sci.* 2008;88(3):449-456. doi:10.4141/CJAS08012
 16. Cameron M, McKenna SL, MacDonald KA, Dohoo IR, Roy JP, Keefe GP. Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Risk of postcalving intramammary infection and clinical mastitis in the subsequent lactation. *J Dairy Sci.* 2014;97(1):270-284. doi:10.3168/jds.2013-7060
 17. Capuco AV, Akers RM, Smith JJ. Mammary Growth in Holstein Cows During the Dry Period: Quantification of Nucleic Acids and Histology. *J Dairy Sci.* 1997;80(3):477-487. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)75960-5
 18. Green MJ, Bradley AJ, Medley GF, Browne WJ. Cow, Farm, and Management Factors During the Dry Period that Determine the Rate of Clinical Mastitis After

Calving. *J Dairy Sci.* 2007;90(8):3764-3776. doi:10.3168/jds.2007-0107

19. Scherpenzeel CGM, den Uijl IEM, van Schaik G, Olde Riekerink RGM, Keurentjes JM, Lam TJGM. Evaluation of the use of dry cow antibiotics in low somatic cell count cows. *J Dairy Sci.* 2014;97(6):3606-3614. doi:10.3168/jds.2013-7655
20. Green MJ, Green LE, Medley GF, Schukken YH, Bradley AJ. Influence of Dry Period Bacterial Intramammary Infection on Clinical Mastitis in Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 2002;85(10):2589-2599. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74343-9
21. Gundelach Y, Kalscheuer E, Hamann H, Hoedemaker M. Risk factors associated with bacteriological cure, new infection, and incidence of clinical mastitis after dry cow therapy with three different antibiotics. *J Vet Sci.* 2011;12(3):227-233. doi:10.4142/jvs.2011.12.3.227
22. Nickerson SC, Owens WE, Fox LK, Scheifinger CC, Shryock TR, Spike TE. PHYSIOLOGY AND MANAGEMENT Comparison of Tilmicosin and Cephapirin as Therapeutics for Staphylococcus aureus Mastitis at Dry-off 1. *J Dairy Sci.* 1999;82:696-703. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75286-0
23. Dingwell RT, Leslie KE, Duffield TF, et al. Efficacy of Intramammary Tilmicosin and Risk Factors for Cure of Staphylococcus aureus Infection in the Dry Period. *J Dairy Sci.* 2003;86:159-168. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73596-6
24. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine Staphylococcus aureus Mastitis. *J Dairy Sci.* 2006;89(6):1877-1895. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1
25. Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, et al. Cow- and Quarter-Level Risk Factors for Streptococcus uberis and Staphylococcus aureus Mastitis. *J Dairy Sci.* 2001;84(12):2649-2663. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74719-4
26. Brouillette E, Grondin G, Shkreta L, Lacasse P, Talbot BG. In vivo and in vitro demonstration that Staphylococcus aureus is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Pathog.* 2003;35(4):159-168. doi:10.1016/S0882-4010(03)00112-8

27. Owens WE, Nickerson SC, Ray CH. Efficacy of Parenterally or Intramammarily Administered Tilmicosin or Ceftiofur Against *Staphylococcus aureus* Mastitis During Lactation. *J Dairy Sci.* 1999;82(3):645-647. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75279-3
28. Food and Agriculture Organization on the United Nations. Dairy Market Review - Overview of global dairy market developments in 2018. 2019;(March):11.
29. Loera J, Banda J. Industria lechera en México: parámetros de la producción de leche y abasto del mercado interno. *Rev Investig Altoandinas - J High Andean Res.* 2017;19(1):419-426. doi:10.18271/ria.2017.317
30. Laos EH, Valle M del C. *La Industria Láctea de México En El Contexto Del Tratado de Libre Comercio de América Del Norte (TLCAN).*; 2000.
31. SADER. De la lechería. *Panor La Leche.* 2019:9.
32. Corbellini CN. La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche. *Semin Int Compet en Leche y Carne (3 Argentina) Memorias Argentina Inst Nac Tecnol Agropecu.* 2002:251–263.
33. Mensa J, Soriano A, Linares P, Barberán J, Picazo J. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Rev Española Quim.* 2013;26:1-84.
doi:https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwj91cGEktjKAhVGqh4KHQcMAAAQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fconectareducacion.educ.ar%2Feducacionespecial%2Fpluginfile.php%2F1422%2Fmod_folder%2Fcontent%2F2%2Fgu%25C3%25ADa%2520r%25C3%25A1pida_skechup.pdf%3Fforcedownload%3D1&usg=AFQjCNG0EyRzWtaXMbQ7OH4QWGuLQSflKg&sig2=h5P67rgTekRak4h-MLyf2g&bvm=bv.113034660,d.dmo&cad=rja
34. Bedolla C. Métodos de detección de la mastitis bovina (Methods of detection of the bovine mastitis). *Redvet.* 2007;3(9):1-17.
35. De Vlieghe S, Fox LK, Piepers S, McDougall S, Barkema HW. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci.* 2012;95(3):1025-1040. doi:10.3168/jds.2010-4074

36. Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002. doi:10.1023/A:1020347818725
37. Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol*. 1988. doi:10.1016/0378-1135(88)90126-5
38. Deb R, Kumar A, Chakraborty S, et al. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. *Pakistan J Biol Sci PJBS*. 2013;16(23):1653-1661. doi:10.3923/pjbs.2013.1653.1661
39. Bedolla, C., y Ponce De León M. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera - Economic causalties inflicted by the bovine mastitis in the milk industry). *Redvet*. 2008;9(4):1-26.
40. Piepers S, Peeters K, Opsomer G, Barkema HW, Frankena K, De Vliegher S. Pathogen group specific risk factors at herd, heifer and quarter levels for intramammary infections in early lactating dairy heifers. *Prev Vet Med*. 2011;99(2-4):91-101. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.02.010
41. Romero RAR. Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio. *Mastit Bact en ganado Bov Etiol y técnicas diagnóstico en el Lab*. 2014:15.
42. Tomazi T, Gonçalves JL, Barreiro JR, Arcari MA, dos Santos M V. Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. *J Dairy Sci*. 2015;98(5):3071-3078. doi:10.3168/jds.2014-8466
43. Lago A, Godden SM, Bey R, Ruegg PL, Leslie K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *J Dairy Sci*. 2011;94(9):4441-4456. doi:10.3168/jds.2010-4046
44. Lago A, Godden SM, Bey R, Ruegg PL, Leslie K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: II. Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival. *J Dairy Sci*. 2011;94(9):4457-4467. doi:10.3168/jds.2010-4047

45. Pinedo PJ, Fleming C, Risco CA. Events occurring during the previous lactation, the dry period, and peripartum as risk factors for early lactation mastitis in cows receiving 2 different intramammary dry cow therapies. *J Dairy Sci.* 2012;95(12):7015-7026. doi:10.3168/jds.2012-5398
46. De Vries R. *Dry Period Length of Dairy Cows Milk Composition and Quality.*; 2017.
47. Bradtmueller A, Amaral-Phillips DM. *Dry Period-An Important Phase for a Dairy Cow.*
48. Schukken YH, Gurjar A, Moroni P. Physiology and pathophysiology of the udder during the dry period. *Large Anim Rev.* 2011;17(6).
49. William RO. *Functional Anatomy and Fphysiology of Domestic Animals.* 4ta. Edici.; 2009.
50. Borm AA, Fox LK, Leslie KE, et al. Effects of Prepartum Intramammary Antibiotic Therapy on Udder Health, Milk Production, and Reproductive Performance in Dairy Heifers. *J Dairy Sci.* 2006;89(6):2090-2098. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72279-2
51. Janosi S. The use of the dry cow therapy in the control of bovine mastitis. *Vet Med - Czech.* 2001;46(2):55-60.
52. Rollin E, Dhuyvetter KC, Overton MW. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Prev Vet Med.* 2015. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.11.006
53. Hogeveen H, Huijps K, Lam TJGM. Economic aspects of mastitis: New developments. *N Z Vet J.* 2011;59(1):16-23. doi:10.1080/00480169.2011.547165
54. Trinidad P, Nickerson SC, Adkinson RW. Histopathology of staphylococcal mastitis in unbred dairy heifers. *J Dairy Sci.* 1990;73(3):639-647. doi:10.3168/jds.S0022-0302(90)78715-2
55. DeGo OK, van Dijk JE, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet Q.* 2002;24(4):181-198.

doi:10.1080/01652176.2002.9695135

56. Keefe GP. Streptococcus agalactiae mastitis: A review. *Can Vet J.* 1997;38(7):429-437. doi:1997-008
57. Roberson JR. Establishing treatment protocols for clinical mastitis. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 2003. doi:10.1016/S0749-0720(02)00071-3
58. Pritchard DE. *Review Your Clinical Mastitis Treatment Protocol.*
59. Thomas V, De Jong A, Moyaert H, et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Int J Antimicrob Agents.* 2015. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.03.013
60. de Jong A, Garch F El, Simjee S, et al. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Vet Microbiol.* 2018. doi:10.1016/j.vetmic.2017.11.021
61. Zhang W, Li X, Xu T, Ma M, Zhang Y, Gao MQ. Inflammatory responses of stromal fibroblasts to inflammatory epithelial cells are involved in the pathogenesis of bovine mastitis. *Exp Cell Res.* 2016;349(1):45-52. doi:10.1016/j.yexcr.2016.09.016
62. Ziv G, Sulman FG. Absorption of antibiotics by the bovine udder. *J Dairy Sci.* 1975;58(11):1637-1644. doi:10.3168/jds.S0022-0302(75)84762-X
63. Timonen AAE, Katholm J, Petersen A, Orro T, Mötus K, Kalmus P. Elimination of selected mastitis pathogens during the dry period. *J Dairy Sci.* 2018;101(10):9332-9338. doi:10.3168/jds.2018-14759
64. Simojoki H, Salomäki T, Taponen S, Iivanainen A, Pyörälä S. Innate immune response in experimentally induced bovine intramammary infection with *Staphylococcus simulans* and *S. epidermidis*. *Vet Res.* 2011;42(1):1-10. doi:10.1186/1297-9716-42-49
65. Abebe R, Hatiya H, Abera M, Megersa B, Asmare K. Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk

- shed, South Ethiopia. *BMC Vet Res.* 2016;12(1):1-11. doi:10.1186/s12917-016-0905-3
66. ØSterås O, Aursjø J, Gjul GG, Jørstad A. Effect of Dry-cow Therapy on Subclinical Mastitis—an Evaluation of Long-acting and Short-acting Intramammaria. *J Vet Med Ser B.* 1994;41(1-10):529-540. doi:10.1111/j.1439-0450.1994.tb00260.x
 67. Cameron M, Keefe GP, Roy J-P, Stryhn H, Dohoo IR, McKenna SL. Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Milk yield and somatic cell count in the subsequent lactation. *J Dairy Sci.* 2015;98(4):2427-2436. doi:10.3168/jds.2014-8876
 68. Olivares-Pérez J, Kholif AE, Rojas-Hernández S, et al. Prevalence of bovine subclinical mastitis, its etiology and diagnosis of antibiotic resistance of dairy farms in four municipalities of a tropical region of Mexico. *Trop Anim Health Prod.* 2015. doi:10.1007/s11250-015-0890-8
 69. Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *AdvDrug DelivRev.* 2001;50(0169-409X):245-259. doi:10.1016/S0169-409X(01)00160-0
 70. Scherpenzeel C. *Selective Dry Cow Treatment in Dairy Cows.*; 2017.
 71. Urbana I. Complete Versus Selective Dry Cow Therapy for Mastitis Control 1 Infections of *Staphylococcus aureus* , *Streptococcus agalactiae* , other strepto- cocci , and gram negative rods were. doi:10.3168/jds.S0022-0302(78)83753-9
 72. Scherpenzeel CGM, Tijs SHW, den Uijl IEM, Santman-Berends IMGA, Velthuis AGJ, Lam TJGM. Farmers' attitude toward the introduction of selective dry cow therapy. *J Dairy Sci.* 2016;99(10):8259-8266. doi:10.3168/jds.2016-11349
 73. Giner Almaraz S, Canos Cabedo M, Rodilla Calvelo F, Ferrer Gomez C. Nuevos Macrolidos. Superan a Eritromicina? *Farm Hosp.* 1995;19(5):259-265.
 74. Carbon C. Pharmacodynamics of macrolides, azalides, and streptogramins: effect on extracellular pathogens. *Clin Infect Dis.* 1998;27(1):28-32. doi:10.1086/514619
 75. Mestorino N, Errecalde JO. Tilmicosina : Un Nuevo Antibiótico Macrólido De Uso

Veterinario. *Analecta Vet.* 2004;24(2):21-28.

76. Rivas L, McDonnell MJ, Burgess CM, et al. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int J Food Microbiol.* 2010;139(1-2):70-78. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.029
77. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000;88(2):308-316. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x
78. Khan ST, Khan M, Ahmad J, et al. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *AMB Express.* 2017;7(1):49. doi:10.1186/s13568-017-0344-y
79. Nagoor Meeran MF, Javed H, Tae H Al, Azimullah S, Ojha SK. Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: Prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. *Front Pharmacol.* 2017;8(JUN):1-34. doi:10.3389/fphar.2017.00380
80. Palaniappan K, Holley RA. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2010;140(2-3):164-168. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.001
81. Zarrini G, Delgosha ZB, Moghaddam KM, Shahverdi AR. Post-antibacterial effect of thymol. *Pharm Biol.* 2010;48(6):633-636. doi:10.3109/13880200903229098
82. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2474-2478. doi:10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005
83. Tisserand R, Young R. *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals: Second Edition.*; 2013. doi:10.1111/jfd.12251
84. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.* 2001;91(3):453-462. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x

85. Leite-Silva VR, De Almeida MM, Fradin A, Grice JE, Roberts MS. Delivery of drugs applied topically to the skin. *Expert Rev Dermatol.* 2012;7(4):383-397. doi:10.1586/edm.12.32
86. Bhowmik D, Gopinath H, Pragati Kumar B, Duraivel S, Sampath Kumar KP. THE PHARMA INNOVATION Recent Advances In Novel Topical Drug Delivery System. *Pharma Innov.* 2012;1(9):12-31.
87. Alkilani AZ, McCrudden MTC, Donnelly RF. Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics.* 2015;7(4):438-470. doi:10.3390/pharmaceutics7040438
88. USP38/NF33. <1225>Validation of Compendial Methods Section. *United State Pharmacopeial/National Formul.* 2015:2256. doi:10.14227/DT170410P12
89. Mohammed Haneefa KP, Easo S, Hafsa P V., Prasad Mohanta G, Nayar C. Emulgel: An advanced review. *J Pharm Sci Res.* 2013;5(12):254-258.
90. Kumar V, Bhagwat P, Sharma D. EMULGEL-NOVEL TOPICAL DRUG DELIVERY SYSTEM – A COMPREHENSIVE REVIEW Davinder Kumar, Jasbir Singh, Mamta Antil and Virender Kumar * College of Pharmacy, Pandit Bhagwat Dayal Sharma Postgraduate Institute of Medical Sciences, University of Health Sciences, . 2016;7(12):4733-4742. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.7(12).4733-42
91. Berdey II, Voyt OI. Rheological properties of emulgel formulations based on different gelling agent. *Pharma Innov J TPI.* 2016;76(54):76-79.
92. Tripathi A, Patel K, Patel P, BS N, V S. International Journal for Pharmaceutical Research Scholars. *Int J Pharm Res Sch.* 2015;4:1-18. doi:10.4172/2155-9872.1000233
93. Lane ME, Santos P, Watkinson AC, Hadgraft J. *Passive Skin Permeation Enhancement.*; 2012. doi:10.1002/9781118140505.ch2
94. Ajazuddin, Alexander A, Khichariya A, et al. Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel. *J Control Release.* 2013;171(2):122-132.

doi:10.1016/j.jconrel.2013.06.030

95. Vanić Ž, Holsæter AM, Škalko-Basnet N. (Phospho)lipid-based nanosystems for skin administration. *Curr Pharm Des.* 2015;21(29):4174-4192. doi:10.2174/1381612821666150901095838
96. Carlucci AM, Cicconi Vidal M, Bregni C. Las microemulsiones como vehículos para administración de drogas. *Acta Farm Bonaer.* 2004;23(4):550-557.
97. Madhav S, Gupta D. a Review on Microemulsion Based System. *Int J Pharm Sci Res.* 2011;2(8):1888-1899.
98. Mishra A, Panola R, Director ACR, Rana AC. Microemulsions: As drug delivery system. *J Sci Innov Res JSIR.* 2014;3(34):467-474.
99. Tang BC, Dawson M, Lai SK, et al. Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(46):19268-19273. doi:10.1073/pnas.0905998106
100. Lino ME de S, Ruela ALM, Perissinato AG, Pereira GR, Mudrik PS. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian J Pharm Sci.* 2016;52(3):527-544. doi:10.1590/s1984-82502016000300018
101. Vogel HG. *Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays.* Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2008 The; 2008.
102. Iberoamericana R, Hern E, Angulo LS, Materiales N, Supramolecular E. Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. 2004;5(1):55-70.
103. R.S. Langer; N.A. Peppas. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials.* 1981;2:201-214.
104. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad. *Organ Mund la Salud.* 2004.
105. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (26th ed.)

CLSI M100-S20. *Clin Lab Stand Inst.* 2016;(27):1-15.

106. LAURA G. ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS SEMISÓLIDOS BIOADHESIVOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA PARA EL TRATAMIENTO DE ECTOPARÁSITOS (B. MICROPLUS) EN BOVINOS. 2009.
107. Bonnier M, Doré C, Amédéo J, Guérin-Faublée V. In vitro activity of tylosin and tilmicosin against cocci isolated from bovine mastitis. *Rev Med Vet (Toulouse)*. 2006;157(10):486-489.
108. Wang Y, Wu CM, Lu LM, Ren GWN, Cao XY, Shen JZ. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol.* 2008;130(1-2):118-125. doi:10.1016/j.vetmic.2007.12.012
109. Pfister P, Jenni S, Poehlsgaard J, et al. The Structural Basis of Macrolide – Ribosome Binding Assessed Using Mutagenesis of 23 S rRNA Positions 2058 and 2059. *J Mol Biol.* 2004;342:1569-1581. doi:10.1016/j.jmb.2004.07.095
110. Debono M, Willard KE, Kirst HA, et al. Manuel Debono, Kevin E. Willard, Herbert A. Kirst, Julie A. Wind, Gary D. Crouse, Eddie V. Tao, Jeffrey T. Vicenzi, Fred T. Counter, John L. Ott, Earl E. Ose and Satoshi Omura* The Lilly Research Laboratories,. *J Antibiot (Tokyo)*. 1989;XL(8):1253-1267.
111. Bahraminia F, Emadi SR, Emaneini M, Farzaneh N, Rad M, Khoramian B. A high prevalence of tylosin resistance among *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Vet Res Forum.* 2017;8(2):121-125.
112. Malinowski E, Ossowska AKŁ, Kaczmarowski MŁ, Lassa H, Ma K KUŻ. ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM AFFECTED WITH MASTITIS COWS. *B Vet Ins Pulawy.* 2002:289-294.
113. Huang AT, Lin TL, Wu CC, Huang T, Lin TL, A CCW. Antimicrobial Susceptibility and Resistance of Chicken *Escherichia Coli* , *Salmonella spp* ., and *Pasteurella Multocida* Isolates Antimicrobial Susceptibility and Resistance of Chicken *Escherichia coli* , *Salmonella spp* ., and *Pasteurella multocida* Isolates. 2009;53(1):89-93.

114. Dal Pozzo M, Santurio DF, Rossatto L, et al. Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2011;63(5):1229-1232. doi:10.1590/S0102-09352011000500026
115. Olasupo NA, Fitzgerald DJ, Gasson MJ, Narbad A. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. 2003:448-451. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01427.x
116. Walsh SE, Maillard J, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. 2003:240-247.
117. Haagsman HP, Burt SA, Veldhuizen EJA. Increase in Activity of Essential Oil Components Carvacrol and Thymol against *Escherichia coli* O157 : H7 by Addition of Food Stabilizers. 2005;68(5):919-926.
118. Burt S. Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. 2004;94:223-253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
119. Fisher K, Phillips C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food : is citrus the answer ? 2008;19:156-164. doi:10.1016/j.tifs.2007.11.006
120. Kifer D, Mužinić V, Klaric MŠ. Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth. *J Antibiot (Tokyo).* 2016;69(9):689-696. doi:10.1038/ja.2016.10
121. Dingwell RT, Leslie KE, Duffield TF, et al. Efficacy of Intramammary Tilmicosin and Risk Factors for Cure of *Staphylococcus aureus* Infection in the Dry Period. *J Dairy Sci.* 2003;86(1):159-168. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73596-6
122. Hensen SM, Pavic MJAMP. Location of *Staphylococcus aureus* Within the Experimentally Infected Bovine Udder and the Expression of Capsular Polysaccharide Type 5 in Situ. 2000;(27):1966-1975. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75073-9
123. Sordillo LM, Nickerson SC, Akers RM. Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis

- during lactogenesis: relationships with bovine mammary structure and function. *J Dairy Sci.* 1989;72(1):228-240. doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79101-3
124. Wang XF, Zhang SL, Zhu LY, et al. Enhancement of antibacterial activity of tilmicosin against *Staphylococcus aureus* by solid lipid nanoparticles in vitro and in vivo. *Vet J.* 2012;191(1):115-120. doi:10.1016/j.tvjl.2010.11.019
 125. Kissels W, Wu X, Santos RR. Short communication: Interaction of the isomers carvacrol and thymol with the antibiotics doxycycline and tilmicosin: In vitro effects against pathogenic bacteria commonly found in the respiratory tract of calves. *J Dairy Sci.* 2017;100(2):970-974. doi:10.3168/jds.2016-11536
 126. Cheesman MJ, Ilanko A, Blonk B, Cock IE. Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts / compounds with conventional antibiotics the solution? Author Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant Extracts / Compounds wit. *Pharmacogn Rev.* 2017;11:58-72. doi:10.4103/phrev.phrev
 127. Sah SK, Badola A, Nayak BK. Emulgel: Magnifying the application of topical drug delivery Emulgel: Magnifying the application of topical drug delivery. 2017;(May). doi:10.30750/ijpbr.5.1.4
 128. Kumar V, Bhagwat P, Sharma D. Emulgel- novel topical drug delivery system- A comprehensive review. 2016;7(12):4733-4742. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.7(12).4733-42
 129. Yapar EA, Ýnal Ö, Erdal MS. Design and in vivo evaluation of emulgel formulations including green tea extract and rose oil. *Acta Pharm.* 2013;63(4):531-543. doi:10.2478/acph-2013-0037
 130. Krstić M, Medarević Đ, Đuriš J, Ibrić S. *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) and Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems (SMEDDS) as Lipid Nanocarriers for Improving Dissolution Rate and Bioavailability of Poorly Soluble Drugs.*; 2018. doi:10.1016/b978-0-12-813687-4.00012-8
 131. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Trop J Pharm Res.* 2013;12(2):265-273.

doi:10.4314/tjpr.v12i2.20

132. Sharma S, Shukla P, Misra A, Mishra PR. *Interfacial and Colloidal Properties of Emulsified Systems*. Elsevier B.V.; 2014. doi:10.1016/b978-0-444-62614-1.00008-9
133. Lu GW, Gao P. *Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery*.; 2010. doi:10.1016/b978-0-8155-2025-2.10003-4
134. Cristina A, Barros G, Maria A, et al. Development , stability and in vitro permeation studies of gels containing mometasone furoate for the treatment of dermatitis of the scalp. 2010;46.
135. Preeti B, Gnanaranjan G, Nagar P. International research journal of pharmacy. 2013;4(2):12-16.
136. Joel I. Zatz, Ph.D. and Judith D. Segers MS. Techniques for Measuring In Vitro Release From Semisolids. *Dissolution Technol.* 1998;3-17. doi:dx.doi.org/10.14227/DT050198P3
137. Brown TDK, Tasker JB. INTRA-CELLULAR ACCUMULATION AND TRANS-EPITHELIAL TRANSPORT OF AIVLOSIN , TYLOSIN AND TILMICOSIN. *Pig J.* 2007;60:26-35.
138. Siepmann J, Siepmann F. Mathematical modeling of drug delivery. 2008;364:328-343. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.09.004
139. Mestorino N, Marchetti ML, Turic E, Bago B, Lucas M. Ocular penetration of tilmicosin administered subcutaneously in healthy cattle and in carriers of infectious and traumatic keratoconjunctivitis. *Vet Argentina.* 2007;239(November):651-664.
140. Mestorino N, Errecalde JO. Considerations for Bovine Mastitis Treatment. In: *A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine*. Buenos Aires, Argentina: intechopen; 2012:423-472. doi:10.5772/31721
141. Hector Sumano. Luis Ocampo. *Farmacologia Veterinaria*. Tercera Ed. McGrawHill; 2006.