



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

ELABORACIÓN DE MICROEMULSIONES CON ENROFLOXACINA
COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA

T E S I S

QUE PRESENTAN:
NOHEMÍ YUTZINE CAMARENA DÍAZ
Y
GUADALUPE JOCELYN ORNELAS LOBATO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO – BIOLÓGICA

TUTOR: DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD



Ciudad universitaria, Ciudad de México, 2022



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.

JURADO ASIGNADO

- ❖ **Presidente: María Josefa Bernad Bernad**
- ❖ **Vocal: Viridiana Gisela Llera Rojas**
- ❖ **Secretario: Carlos Juárez Osornio**
- ❖ **1er. Suplente: Gerardo Leyva Gómez**
- ❖ **2do. Suplente: Aurora Anais Zurita Cruz**

Este trabajo se desarrolló en el anexo del laboratorio 118, 120 y 121 de la Facultad de Química, UNAM

Asesora

Dra. María Josefa Bernad
Bernad
**(Facultad de Química,
UNAM)**

Supervisor técnico

Dr. Luis Medina Torres
**(Instituto de Materiales,
UNAM)**

Sustentantes

Nohemí Yutzine Camarena Díaz

Guadalupe Jocelyn Ornelas
Lobato

Agradecimientos

Primeramente, agradezco tanto a la Universidad y a la Facultad de Química por haberme permitido ser parte de la comunidad, como a la Dra. Bernad por haberme dado la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo desde el servicio social hasta el día de hoy. De igual manera, agradezco a todos y cada uno de mis profesores por los conocimientos que me transmitieron a lo largo de la carrera; en especial gracias a la Dra. Bernad, Perlita y Viri por además, su apoyo.

Quiero agradecer a todas aquellas personitas que han sido mis amigos durante muchos años: onee gracias por apoyarme y escucharme en cada momento que lo he necesitado; gracias a Kika, Isaac, Zaii, Yabín y Kesia por hacer de la prepa una de las mejores etapas de mi vida. También quiero agradecer a los amigos que hice durante la carrera: Omar, Memo, Danielo, Ara, Oswaldo, Euni, Fer, Moni, Pedrito, Arturo, Jes, Vic, Luis, Yair y Darwin porque sin ustedes la facultad no hubiese sido lo mismo. Pero, sobre todo, gracias al mejor equipo que pude haber conocido y que nadie más podrá tener, gracias a Lupilla Rivera por haber aparecido en mi camino, gracias porque más que amigas casi hermanas y roomies, somos compañeras de laboratorio; te amo.

Y, por último, pero no menos importante, gracias a mi familia que me apoyó y soportó mi mal humor cuando hacía tarea, los amo mucho. Gracias, mamá básicamente por todo, porque sin tí no estaría aquí el día de hoy; eres la mujer más trabajadora que conozco, gracias por sacarnos adelante a mi hermano y a mí a pesar de todo. Gracias, hermano por ser como eres, ya que siempre has logrado sacarme una sonrisa. Gracias abuelita por su cariño y apoyo. Gracias también a mis bebés por hacerme muy feliz y por las siestas: a mi Alfalfa por desvelarse conmigo cuando hacía tarea que, aunque el día de hoy ya no está con nosotros, siempre estará en nuestros corazones; a mi Yoyo por sus abrazos; a mi Donuts por amarme a su manera. Gracias Carlos porque últimamente has sido un gran apoyo para mí y gracias por traer a mi vida a mis otros bebés, Rory y Harvey quienes siempre nos quitan el estrés después del trabajo. Y, gracias Azyade por ser mi 25/8 y por secundarme en cada locura a la distancia.

-Yutzine Camarena-

A la persona más importante de mi vida, mi mamá, sin ella no habría llegado hasta aquí. Eres la base de todo, gracias por siempre estar para mí. Te amo.

A mi papá y mis hermanos que no dejaron que me rindiera nunca. Gracias por desvelarse conmigo y levantarme cuando ya no quería hacerlo.

A mis amigos Fer, Euni, Moni, Perlita, Pedrito, Diego e Itzel que siempre creyeron que llegaríamos a este momento.

A la dra. Bernad y Viridiana Llera por todo su apoyo y por compartir su conocimiento conmigo. Ustedes me inspiraron para seguir por este camino.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química por haberme dado la oportunidad de lograr este sueño.

Y por último, a Yutzine, mi otra mitad. Gracias por no rendirte hasta volvernos amigas. Luchar contigo por esto es de lo más difícil que he hecho en la vida, pero siempre supe que lo lograríamos. Eres lo mejor que me ha dejado la Facultad.

-Guadalupe Ornelas-

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	9
3. ANTECEDENTES.	11
3.1 Infecciones Bacterianas	11
3.1.1 Mastitis Vacuna.....	11
3.1.1.1 Tratamiento	14
3.1.2 Fluoroquinolonas.....	15
3.1.2.1 Enrofloxacin.....	16
3.1.2.2 Farmacodinamia.....	18
3.1.2.3 Actividad Antimicrobiana	19
3.1.2.4 Eficacia en bovinos.....	21
3.1.2.5 Resistencia Bacteriana.....	21
3.2 Sistemas de liberación modificada.	24
3.2.1 Control de la liberación	25
3.2.1.1 Microemulsiones.....	26
3.2.1.1.1 Preparación de microemulsiones.....	29
3.2.1.1.2 Métodos de Caracterización.....	29
3.2.1.1.3 Estabilidad termodinámica de las microemulsiones	35
3.3 Recomendaciones de la EPA para determinación de lesión dérmica en animales de laboratorio por distintos excipientes.	36
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	37
4.1 Planteamiento del problema	37
4.2 Objetivos	37
4.2.1. Objetivo general	37
4.2.2. Objetivos particulares.....	38
5. PARTE EXPERIMENTAL	39
5.1 Reactivos y Equipos	39
5.1.1 Reactivos.....	39
5.1.2 Equipos	39
5.2 Metodología	39
5.2.1 Ensayo de toxicidad.....	39
5.2.2 Obtención de microemulsiones aceite en agua (O/W) de un sistema CH ₂ Cl ₂ / H ₂ O /brij97+isopropanol (en proporción 1:2)	42
5.2.3 Determinación de la inversión de fases	44

5.2.4 Pruebas de solubilidad de enrofloxacin en CH ₂ Cl ₂ .	45
5.2.5 Evaluaci3n de la capacidad de incorporaci3n de enrofloxacin a las microemulsiones	45
5.2.6 Ensayos de liberaci3n de enrofloxacin desde microemulsiones	46
6. Resultados y Discusi3n	50
6.1 Ensayo de toxicidad.	50
6.2 Obtenci3n de microemulsiones aceite/agua (O/W) de un sistema CH₂Cl₂ / H₂O / brij97+isopropanol (en proporci3n 1:2).	56
6.3 Inversi3n de fases en las microemulsiones	58
6.3.1 Estudios de tama1o de gota	58
6.3.2 Conductividad	64
6.4 Ensayos de solubilidad de la enrofloxacin	67
6.5 Evaluaci3n de la capacidad de incorporaci3n del principio activo en la microemulsi3n.	67
6.6 Liberaci3n para las l3neas	71
7. Conclusiones	75
8. REFERENCIAS	77

1. RESUMEN

En los últimos años en el mundo, uno de los grandes problemas dentro del ámbito de la salud animal, es el elevado costo de un medicamento, debido principalmente a la relativamente poca investigación que existe y a la gran inversión que esta implica.

El desarrollo farmacéutico, aplicado a la industria veterinaria, tiene por objetivo innovar, modificar y optimizar formulaciones y formas farmacéuticas ya conocidas, con la finalidad de hacer de un fármaco, un medicamento seguro y efectivo, para de esta manera resolver las problemáticas en el sector ganadero, el cual actualmente presenta problemas de control sanitario en el ganado.

Una de las enfermedades con mayor importancia es la mastitis vacuna, la cual se presenta como una inflamación generalizada de la ubre de la vaca derivada de la invasión bacteriana, poniendo en riesgo la salud, la vida y la calidad de los productos provenientes de ésta.

Como una opción para el tratamiento de la mastitis bovina, en este trabajo se desarrolló la formulación de una microemulsión a partir de cloruro de metileno (fase oleosa), agua (fase acuosa), una mezcla de Brij 97® y alcohol isopropílico en una relación 1:2 (como tensoactivo y cotensoactivo, respectivamente) y como principio activo enrofloxacina, con el objetivo de lograr una liberación prolongada, menos riesgosa y de administración más fácil para el ganadero.

Para la elección de los componentes del sistema, se determinó el grado de lesión que producen algunos excipientes en animales de laboratorio, tal como lo marcan las guías de la Environmental Protection Agency (EPA)¹, concluyendo que los excipientes no producen daño en los animales a las concentraciones utilizadas. Después, se establecieron las zonas de formación de microemulsiones tanto O/W como W/O en un diagrama ternario y mediante análisis de conductimetría, inspección visual y tamaño de partícula, se eligieron aquellas en donde se encuentran las microemulsiones O/W.

Posteriormente, se prepararon 6 lotes distintos de microemulsiones O/W (A, B, C, D, E y F) derivados del diagrama de fases, con diferentes concentraciones de enrofloxacin en CH₂Cl₂ (0, 25, 37, 50 y 62.5 mg/mL) para determinar la máxima cantidad de principio activo que puede ser solubilizado. A las preparaciones que soportaron mayor cantidad de enrofloxacin y demostraron presentar estabilidad física, se les realizó un estudio de la liberación de principio activo *in vitro* empleando celdas de difusión de Franz, esto se comparó contra la liberación de una formulación comercial en solución inyectable (Baytril® de Bayer Veterinaria).

Los resultados obtenidos muestran la formación de microemulsiones con enrofloxacin, las cuáles presentaron una liberación modificada comparada con la liberación del producto comercial, en el que se observó una liberación rápida del principio activo.

2. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, uno de los principales problemas a los que se enfrenta el sector ganadero es el brote de agentes infecciosos, los cuales repercuten fuertemente en la calidad y peso de los animales lo que conlleva a una gran pérdida económica. El control y prevención de las enfermedades que producen estos agentes incrementa la productividad del negocio y mejora la calidad del producto.

La mastitis bovina, es una de las enfermedades infecciosas que tiene gran impacto en la industria láctea a nivel mundial; esta enfermedad es una reacción inflamatoria del tejido de la glándula mamaria muy frecuente en las vacas lecheras.

Actualmente, en el mercado existe una amplia variedad de medicamentos antibacterianos de amplio espectro, utilizados para el tratamiento oportuno de las enfermedades del ganado. Estos principios activos suelen presentarse en formas farmacéuticas en las que se dosifican a concentraciones muy altas, en tiempos muy cortos y en ocasiones en condiciones que le provocan al animal un estrés derivado de la aplicación. Esto conlleva a la búsqueda de nuevos sistemas de liberación de fármacos, como las microemulsiones que son sistemas de liberación modificada, en los cuáles se busca que, además de regular la liberación, sean lo menos riesgosos a la salud del animal.

Uno de los principios activos más utilizados para el tratamiento de la mastitis es la enrofloxacin, considerada un antibiótico de amplio espectro, administrado en limitadas formas farmacéuticas, debido a sus características fisicoquímicas (como su baja solubilidad en agua). Este antibacteriano es parte de una generación de fármacos quinolónicos fluorados, los cuales resultan adecuados para el tratamiento de la mastitis y algunas otras infecciones bacterianas que padecen los bovinos.

Tomando como prioridad la optimización de los procesos y los regímenes de dosificación de los fármacos, la investigación está dirigida hacia los sistemas de liberación modificada con la finalidad de obtener formas farmacéuticas seguras y efectivas dentro del índice terapéutico.

Las microemulsiones son dispersiones coloidales que consisten en tres componentes: una fase acuosa, una fase oleosa y tensoactivo; en algunas ocasiones, son necesarios algunos componentes adicionales como un cosolvente o un cotensoactivo. La organización de su estructura es comúnmente aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O).

Las microemulsiones O/W actúan como sistemas de liberación modificada debido a que son consideradas como soluciones micelares, teniendo como característica principal un tamaño de partícula menor a 200nm, y la capacidad de soportar dentro de éstas un principio activo no soluble en agua.

Así, en este trabajo se pretende obtener microemulsiones que tengan las mejores proporciones de las fases que la forman, que sean físicamente estables y que soporten la mayor cantidad de enrofloxacin como principio activo, liberándola de manera sostenida.

3. ANTECEDENTES.

3.1 Infecciones Bacterianas

Es bien sabido que las infecciones bacterianas son un factor importante que limita la producción de animales de engorda. En los últimos años, el número de enfermedades presentes en animales ha ascendido a un número importante. Las enfermedades en animales son producidas por diversos factores entre los que se encuentran:

1. La contaminación de aire, agua y suelos.
2. La falta de limpieza de los lugares en donde se crían los animales.
3. Las enfermedades de transmisión dadas por el ser humano y otro tipo de animales.
4. Las mutaciones de los microorganismos como síntoma de supervivencia al medio ambiente y por ende la resistencia a fármacos.
5. La falta de información que algunos ganaderos tienen al momento de criar animales para consumo humano.

El diagnóstico de las infecciones bacterianas se ha vuelto difícil, debido a que día con día se vuelven más complejas. Pero no todo queda en el diagnóstico como pudiera pensarse, la elección del tratamiento adecuado para la enfermedad diagnosticada es un factor crucial en estos casos ya que, estas enfermedades llegan a cobrar cientos de vidas animales, las cuales, en industrias como la ganadera se reflejan como una pérdida económica importante.

3.1.1 Mastitis Vacuna

La mastitis bovina es una enfermedad del ganado lechero causada por diversos microorganismos la cual, afecta la calidad y el rendimiento de la leche, lo que resulta en grandes pérdidas económicas.¹ Esta enfermedad es una reacción inflamatoria del tejido de la glándula mamaria (Figura 1), la inflamación de la ubre ocurre en respuesta a la invasión bacteriana de la glándula a través del canal del pezón.²



Figura 1. Inflamación de la ubre por mastitis.

Esta inflamación se desarrolla debido a la presencia de leucocitos y bacterias. Los leucocitos son creados por el sistema inmune de la vaca y transportados hacia la ubre debido a la presencia de bacterias en el canal del pezón, las cuales una vez infiltradas en el canal, se multiplican en número y producen toxinas que causan la destrucción del tejido mamario cuya función es la producción de leche. Esto significa que el potencial productivo de la ubre disminuye dado que la cantidad de células encargadas de generar leche es menor, además altera la composición "normal" de esta. En conjunto, estos cambios afectan negativamente la calidad y cantidad de los productos lácteos.³ Durante este proceso el objetivo del sistema inmune de la vaca es el de destruir o neutralizar la infección para que así, el tejido mamario en la ubre pueda empezar a sanar y eventualmente retorne a su estado productivo normal. Diferentes tipos de daños pueden causar infecciones en el tejido mamario dentro de la ubre, incluyendo toxinas producidas por bacterias, químicos que irriten el pezón, o cualquier traumatismo recibido por el pezón o la ubre. En vacas lactantes, la mastitis es casi exclusivamente causada por bacterias que llegan a invadir la ubre y se multiplican dentro del tejido mamario generando toxinas que son las causantes de las lesiones.

La abertura (esfínter) del pezón representa la primera línea de defensa contra cualquier infección. El interior del canal del pezón está compuesto por un tejido musculoso que sirve como "válvula". La función de esta válvula es mantener el canal del pezón cerrado. Así, se previene el flujo de la leche hacia el exterior y la entrada de bacterias hacia el interior de la ubre. Las células que componen el interior del canal del pezón producen una sustancia llamada queratina que está compuesta por un material fibroso proteico y ácidos grasos que en conjunto poseen

un fuerte poder antibacterial por lo que, es una barrera efectiva contra la introducción de bacterias en la ubre. Durante el ordeño, las bacterias pueden estar presentes cerca del esfínter del pezón; estas bacterias pueden originarse debido a la presencia de lodo, tierra, estiércol y humedad cerca de o en el esfínter del pezón. La colonización bacteriana también puede ocurrir si la piel del pezón tiene alguna lesión, si la superficie de las pezoneras o mangueras de conducción de leche están sucias, y principalmente si el procedimiento de preparación pre-ordeño no es lo suficientemente sanitario e higiénico.

Cualquier trauma que reciba el pezón también puede afectar su grado de susceptibilidad hacia invasiones bacterianas, colonización y eventualmente infecciones. Traumas físicos pueden llegar a destruir la queratina. Una vez que el trauma ha ocurrido, el esfínter del pezón puede permanecer abierto.

La respuesta inflamatoria se inicia una vez que la bacteria ingresa en la ubre y esto constituye la segunda línea de defensa contra infecciones (Figura 2). Aquí, las bacterias se multiplican y producen toxinas, enzimas, y otras sustancias que estimulan la producción de un sin número de químicos en las células de la vaca que son utilizadas para prevenir la inflamación del tejido mamario. La magnitud con la cual se desarrolla una inflamación en la ubre está influenciada por el tipo de bacteria, los días en lactancia, la edad, la genética, y el estado nutricional de la vaca. Leucocitos, neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y fagocitos son transportados por medio de la sangre desde la médula ósea hacia el tejido donde la invasión bacteriana está ocurriendo. Un gran número de PMN son atraídos hacia el lugar de la invasión por medio de "mensajeros químicos" y otros "agentes químicos" que sirven como señales (se comunican con la médula ósea), originados en los tejidos afectados por una invasión bacteriana. Desde la sangre, los PMN pueden fácilmente atravesar el tejido mamario y llegar hacia los vasos lactíferos de la ubre donde se acumula la leche. Esto da lugar al incremento en el recuento de células somáticas (RCS; o SCC) en la leche y también puede causar el daño del tejido mamario. Las células somáticas consisten casi exclusivamente de PMN o células blancas de la sangre.³



Figura 2. Presencia de bacterias en el canal del pezón, causa principal de mastitis.

En el lugar de la infección, los PMN acaparan a las bacterias y liberan enzimas que pueden destruir a estos organismos. Los leucocitos presentes en la leche también son capaces de producir y liberar ciertas sustancias que atraen más leucocitos hacia el área de infección para luchar contra las bacterias. El recuento de células somáticas se mantiene relativamente alto luego que las bacterias son eliminadas y hasta el momento en que el tejido mamario esté completamente sano. Los coágulos que se forman durante el agrupamiento de leucocitos y "factores coagulantes de la sangre" pueden llegar a bloquear los vasos lactíferos menores dentro de la ubre y prevenir un ordeño completo. El daño del tejido mamario y la obstaculización de los vasos lactíferos menores dentro de la ubre pueden llegar a causar la formación de cicatrices en algunos casos. Esto puede resultar en la pérdida permanente de esta porción de tejido y de su habilidad para producir leche. En otros casos, la inflamación puede desaparecer rápidamente, el tejido puede curarse, y la función del tejido puede llegar al 100% de lo que era antes del desarrollo de mastitis.

3.1.1.1 Tratamiento

El tratamiento de la mastitis vacuna se realiza por medio de una basta serie de antibacterianos de amplio espectro, entre ellos la enrofloxacin. Esta se encuentra en el mercado en distintas formas farmacéuticas y dosificaciones, tal como se muestra en la tabla 1. Las formas farmacéuticas más utilizadas para este tipo de padecimientos en bovinos son: la disolución oral y la disolución inyectable, a pesar de ser el mismo principio activo, las características entre estas dos formas farmacéuticas son distintas, es por eso la diferencia en las dosis.^{4, 5, 6, 7}

Tabla 1. Medicamentos en el mercado que contienen enrofloxacin.

NOMBRE COMERCIAL / LABORATORIO	FORMA FARMACÉUTICA	CONCENTRACIÓN	FRECUENCIA DE USO / DOSIFICACIÓN
ANDOFLOX 5 % / ANDOCI	Solución inyectable	5 %	1mL / 10 Kg de peso cada 24 horas durante 3 a 5 días.
AVIERIZOL-ENRO® / RIVERFARMA	Polvo oral	20 %	Aves. 1 g por cada 4 L de agua de bebida cada 24 horas durante 3 a 5 días.
AVIFLOX® / AVI-MEX	Solución oral	10 %	Aves. 10 mg / Kg de peso equivalente a 0.5 mL por litro de agua de bebida cada 24 horas durante 5 a 7 días.
BAYTRIL ^{MR} / BAYER	Solución oral	0.5 %	0.5 mL / Kg de peso cada 24 horas durante 3 días.
BAYTRIL ^{MR} 5 % INYECTABLE / BAYER	Inyectable	5 %	2.5 mg / Kg de peso equivalente a 1 mL por cada 20 Kg de peso cada 24 horas durante 3 días.
BIOQUIN / BIO ZOO	Solución inyectable	12 %	2.5 mg / Kg de peso equivalente a 1 mL por cada 50 Kg de peso cada 24 horas durante 3 a 8 días.
CETRYL® AVES 5 % / PARFARM	Solución oral	5 %	Aves. 50 mL / Kg peso equivalente a 1 mL por cada litro de agua de bebida cada 24 horas durante 3 a 5 días.
ENROFLOXIL 5 % INYECTABLE / TORNEL	Solución inyectable	5 %	1 mL / 20 Kg peso cada 24 horas.

3.1.2 Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son un grupo de agentes antibacterianos sintéticos usados en medicina tanto humana como veterinaria para el tratamiento de una variedad de enfermedades infecciosas. Aunque se han sintetizado muchas de ellas, las más conocidas entre las desarrolladas y usadas en medicina veterinaria incluyen la amifloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina,

marbofloxacin, norfloxacin y sarafloxacin. Otras, como la premafloxacin, fleroxacin y difloxacin están siendo evaluadas o ya han sido adoptadas para el uso terapéutico.^{4,5,6,7}

3.1.2.1 Enrofloxacin

La enrofloxacin (1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-acidoquinolenicocarboxilico), mostrada en la figura 3, es un miembro de la tercera generación de la familia de las quinolonas, exclusivamente es de uso veterinario.^{8, 9, 10, 11}

La enrofloxacin es una fluoroquinolona derivada del ácido nalidíxico y, como todos los compuestos genéricamente llamados quinolonas tienen un núcleo químico básico denominado "dihidroquinolina" o anillo 4-quinolnico.¹²

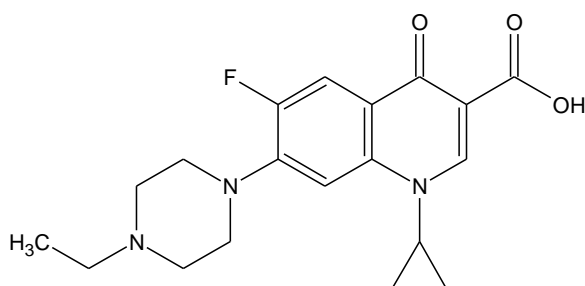


Figura 3. Estructura química de la enrofloxacin. P.M. = 359.39 g/mol.

La sustitución con flúor en la posición 6 (dando origen así a las fluoroquinolonas) fue el cambio que representó un salto cualitativo en el desarrollo de estos compuestos. Con ello se mejoró la unión a la enzima diana, la DNA girasa bacteriana, y se aumentó la penetración celular hasta 70 veces con respecto a las quinolonas que no tienen flúor en esa posición. Además, con esta sustitución se aumentó la eficacia contra patógenos Gram negativos y se amplió el espectro de actividad al actuar contra patógenos Gram positivos.¹³

En la posición 7 tiene un anillo 4-metilopiperazin-1-il, cuyo volumen espacial le confiere mayor potencia con respecto a aquellas quinolonas que tienen moléculas lineales en esa posición.¹³ Por otra parte, la presencia de un grupo etilo en la posición 4 de este anillo parece aumentar la absorpcion digestiva y la

disponibilidad, así como lograr que la enrofloxacin alcance el doble de la concentración plasmática de la ciprofloxacina, la cual tiene una estructura similar pero no posee el mencionado radical. La enrofloxacin tiene un bajo peso molecular, lo cual favorece su penetración tisular y en su forma neutra tiene la menor solubilidad en medios acuosos (Tabla 2). La enrofloxacin es un polvo amarillo, higroscópico, de sabor amargo y de olor característico, con un punto de fusión de 220 °C.¹⁴

Tabla 2. Solubilidad de enrofloxacin en tres diferentes disolventes.

Disolvente	Solubilidad (g/L)
Agua	3.59×10^{-4}
Cloruro de metileno	224.17
Solución amortiguadora pH=7.5 0.1 M	1.0
Acetonitrilo	4.06

Una propiedad fisicoquímica de la enrofloxacin es la absorción en la región UV (presenta 2 puntos máximos de absorción a 270 ± 1 y 314 ± 2 nm); es una molécula pH dependiente y varían esos puntos de absorción máxima de acuerdo con el medio en el que se encuentra (Figura 4). Además, en análisis de fluorescencia presenta un máximo de emisión en 275 nm y 315 nm, y presenta dos constantes de disociación principalmente $pK_{a1} = 5.94 \pm 0.09$ y un $pK_{a2} = 8.70 \pm 0.44$.⁴

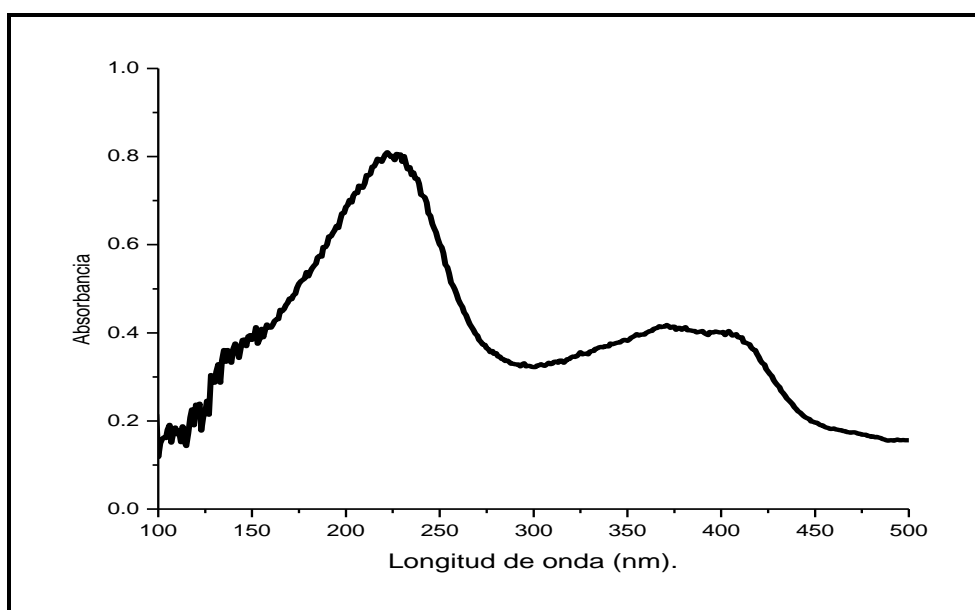


Figura 4. Espectro U.V. de la enrofloxacin a pH 7.5.

3.1.2.2 Farmacodinamia

El principal mecanismo de acción de las quinolonas es la inhibición de la DNA-girasa, una enzima bacteriana involucrada en la mayoría de los procesos biológicos que comprometen al DNA, tales como la transcripción, recombinación, replicación y reparación de este. La DNA-girasa es una topoisomerasa tipo II, y es la única de su tipo capaz de introducir un súper enrollamiento helicoidal negativo dentro de la molécula de DNA, desempeñando un rol crítico en el mantenimiento de la densidad genómica súper helicoidal. Las quinolonas inhiben, además, a la Topoisomerasa IV, otra topoisomerasa tipo II esencial en la segregación cromosómica de las células procariotas.¹⁵

Recientes investigaciones han sugerido que en los organismos Gram positivos, la principal diana para algunas quinolonas es la DNA-girasa, tal como *E. coli*; mientras que, en otras, como *S. aureus*, lo es la Topoisomerasa IV. Considerando que estas enzimas tienen funciones distintas, es probable que las bacterias difieran en sus respuestas a las quinolonas de acuerdo con cuál sea la diana principal.¹⁶

Todas las quinolonas tienen el mismo mecanismo básico de acción llamado mecanismo A que requiere RNA y síntesis de proteínas, así como división celular, para ejercer acción bactericida.

Algunas nuevas quinolonas exhiben otro mecanismo, llamado B, son capaces de matar bacterias que no se están dividiendo, y en ausencia de síntesis de RNA o proteínas. Y unas pocas quinolonas mantienen actividad bactericida en ausencia de multiplicación celular, pero requieren síntesis activa de proteínas y RNA, este es el llamado mecanismo C. El tipo de mecanismo de acción puede depender del microorganismo en cuestión.

La enrofloxacin muestra los mecanismos A y B contra *E. coli*, pero solamente el A frente a *S. aureus*. Debe hacerse notar que las topoisomerasas se encuentran también en organismos eucariotas, desde levaduras hasta en seres humanos. La topoisomerasa tipo II eucariota difiere estructuralmente de la bacteriana y, si bien hace cortes al DNA, no produce súper enrollamiento negativo; aún así, se ha demostrado que esta topoisomerasa eucariota tiene una secuencia parcial de

aminoácidos homóloga a la enzima bacteriana, que podría representar un sitio de acción para las quinolonas.

3.1.2.3 Actividad Antimicrobiana

Al actuar específicamente sobre el DNA, las fluoroquinolonas son rápidamente bactericidas activas a muy bajas concentraciones y muestran efecto post-antibiótico. Algunos autores sostienen que este efecto hace que las fluoroquinolonas sean considerablemente menos eficaces a concentraciones mucho mayores que en su concentración inhibitoria mínima (CIM). Sin embargo, en la práctica debería alcanzarse una concentración plasmática inusual antes de que el efecto sea clínicamente aparente.¹⁷

La enrofloxacin actúa como un antibiótico concentración-dependiente para las bacterias Gram negativas. Sin embargo, contra bacterias Gram positivas el efecto es tiempo-dependiente, o una combinación de ambos efectos. Se ha observado que la enrofloxacin ejerce efecto post-antibiótico sobre varias cepas bacterianas, incluyendo, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. La enrofloxacin tiene un efecto post-antibiótico de 1 a 4 horas de duración (según dosis y microorganismo). Aún a concentraciones por debajo de la CIM la enrofloxacin inhibe la división celular, reduce la tasa de crecimiento bacteriano, induce cambios en la ultraestructura de la superficie bacteriana que previenen la colonización de tejidos específicos, interfiere en la expresión de factores de virulencia, y aumenta la susceptibilidad de algunos microorganismos a la fagocitosis. Además, durante la fase pos-antibiótica podrían deprimirse algunos de los mecanismos de resistencia bacteriana.¹⁸

En ocasiones la eficacia de la enrofloxacin es afectada por el pH del medio. Se ha comprobado menor actividad contra bacterias Gram negativas en medio ácido que en medio básico. Sin embargo, la eficacia frente a bacterias Gram positivas, no parece ser afectada por el pH del medio. Algunos de los compuestos exhiben una actividad considerablemente menor (de hasta 100 veces) en presencia de orina, aunque otros, como la marbofloxacin, han mantenido su actividad bactericida en orina por hasta cinco días luego de una sola aplicación. Wetzstein demostró que en pH ligeramente ácido (característico de tejidos inflamados,

abscesos o fagocitos) se reduce la tasa de muerte de algunas bacterias en presencia de enrofloxacin. En contraste, a pH 8 la actividad bactericida de la enrofloxacin casi no varía. Las fluoroquinolonas en general tienen poca actividad contra los anaerobios y son menos eficaces contra anaerobios facultativos desarrollados en condiciones anaeróbicas. El mecanismo de resistencia intrínseca de este tipo de bacterias es poco conocido. Sin embargo, la eficacia de algunos compuestos como la ciprofloxacina no es afectada por las condiciones anaeróbicas y el pH ácido característico del medio purulento de un absceso. La presencia de cationes divalentes en el medio disminuye la susceptibilidad microbiana a las fluoroquinolonas.⁹

Estos compuestos tienen una excelente actividad contra *Enterobacteriaceae*, bacterias Gram negativas y *P. aeruginosa*; buena a moderada actividad contra *Staphylococcus* spp., *Mycobacterium* spp., *Chlamydia* spp, *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp.; y poca o ninguna actividad contra estreptococos (particularmente del grupo D), enterococos y bacterias anaerobias. Las fluoroquinolonas son activas contra una variedad de patógenos veterinarios Gram negativos y algunos Gram positivos, y han demostrado significativa actividad contra patógenos intracelulares pertenecientes a los géneros *Brucella*, *Listeria* y *Chlamydia*.^{14, 16} Es bactericida y mycoplasmicida a bajas concentraciones, y eficaz contra organismos que son resistentes a los β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, antagonistas del ácido fólico y macrólidos. Cuando se comparó su efecto *in vitro* con el de otros antimicrobianos tales como la gentamicina, ampicilina, cloramfenicol, tetraciclinas, trimetoprima / sulfametoxazol, penicilina G y oxacilina, se encontró que la enrofloxacin era claramente superior en el rango de los Gram negativos. Los valores de CIM para cocos Gram positivos estaban dentro del rango de eficacia de la penicilina G, ampicilina, oxacilina y gentamicina, aunque la enrofloxacin fue superior en eficacia contra estafilococos meticilino-resistentes. Comparada con otros derivados quinolónicos de uso en medicina veterinaria (flumequine por ejemplo) la enrofloxacin se distingue por un valor de CIM considerablemente menor (factor 20-50) y la ventaja adicional de su eficacia contra *Mycoplasma* spp., *Pseudomonas* spp., y *Streptococcus* spp. Más del 50 % de los aislamientos de *P. aeruginosa* realizados a partir de perros, gatos, caballos,

cerdos y bovinos demostraron susceptibilidad a la enrofloxacin. Además, el hecho de que la enrofloxacin sea mycoplasmicida, le da ventajas frente a otros agentes con buena actividad micoplasmática.¹⁹

La enrofloxacin se metaboliza en parte a ciprofloxacina, y ese metabolismo es beneficioso desde el punto de vista microbiológico, ya que muchas bacterias Gram negativas tienen valores de CIM menores para la ciprofloxacina, y es probable que el efecto antimicrobiano sea aditivo entre la droga madre y el metabolito.¹⁷

3.1.2.4 Eficacia en bovinos

Se demostró en terneros la eficacia de la enrofloxacin en diarreas y sepsis producidas por *E. coli*, en infecciones experimentales del tracto respiratorio con *Pasteurella haemolytica* y *Mycoplasma bovis*, y en infecciones latentes o manifiestas producidas por *Salmonella spp.* En bovinos adultos, se ha informado la alta eficacia de bajas dosis de enrofloxacin en el tratamiento de la fiebre de embarque, atribuible a la actividad del compuesto frente a *Pasteurella spp.* y *Mycoplasma spp.* Asimismo, se obtuvieron buenos resultados en el tratamiento de mastitis bovinas causadas por *E. coli*, *S. aureus* y *Mycoplasma bovis*. Algunos autores citan eficacia terapéutica en mastitis causadas por *Streptococcus spp.*, mientras que otros pocos sostienen que el efecto antibacteriano no es suficiente.^{11, 20}

3.1.2.5 Resistencia Bacteriana

El amplio espectro de actividad antimicrobiana y el excelente comportamiento farmacocinético han hecho de las nuevas fluoroquinolonas agentes muy atractivos para el tratamiento de enfermedades infecciosas severas, tanto en el hombre como en los animales. Sin embargo, se ha informado de una alarmante tasa de resistencia bacteriana en casos clínicos humanos aislados y hay evidencias que indican la generación de bacterias resistentes en animales tratados. La mayor incidencia de bacterias resistentes a las fluorquinolonas en personas no expuestas a estos agentes podría ser el resultado del uso excesivo de estos antimicrobianos en medicina veterinaria.^{9, 10}

La resistencia bacteriana a las fluorquinolonas se debe a mutación cromosómica. Hasta el momento no se ha demostrado resistencia mediada por plásmidos, probablemente debido a que estas drogas inhiben la conjugación. Tampoco se ha descrito inactivación de quinolonas y fluoroquinolonas por enzimas microbianas.

La mutación cromosómica confiere resistencia a las quinolonas por varios mecanismos:

- (a) alteración de las enzimas blanco;
- (b) alteración en la permeabilidad de la membrana celular, y
- (c) mecanismo de expulsión activa.

El principal mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas se debe a alteraciones en las enzimas diana y se origina en mutaciones espontáneas de los genes *gyrA* y *gyrB* que codifican las subunidades de la DNA girasa y en los genes *parC* (*grlA*) y *parE* (*grlB*) que codifican las subunidades de la topoisomerasa IV.^{9,10}

La resistencia puede deberse a mutaciones puntuales en uno o más genes, a mutaciones en más de un sitio del mismo gen o a mutaciones múltiples, particularmente en *gyrA* y *parC* (*grlA*) en forma simultánea. Las secuencias aminoacídicas de las regiones determinantes de resistencia a las fluorquinolonas son altamente conservadas. El mecanismo de resistencia por impermeabilidad se ha descrito únicamente en las bacterias Gram negativas y se produce por disminución en la expresión de algún tipo de proteína de la membrana externa (porinas OmpF, OmpC en *E. coli*) o debido a modificaciones de los lipopolisacáridos. Esto resulta en una menor acumulación del antimicrobiano y en una consecuente disminución de la susceptibilidad microbiana.¹⁶

Algunas bacterias expresan sistemas de flujo activo codificados cromosómicamente que expulsan quinolonas desde el interior. Este sistema fue descrito inicialmente en *E. coli*, y luego en otras bacterias Gram negativas y Gram positivas y se debe a una sobre expresión del gen *norA* que codifica a la proteína

de membrana que interviene en el mecanismo de flujo activo de fluoroquinolonas y otros fármacos. Este mecanismo de resistencia parece afectar a las quinolonas en distinto grado, dependiendo de las propiedades físicas de cada una y aparentemente es más activo con las fluorquinolonas hidrofílicas tales como la ciprofloxacina y norfloxacina.

La resistencia cruzada entre quinolonas se observa con mayor frecuencia entre las más antiguas como el ácido nalidíxico y el flumequine, pero puede existir entre éstas últimas y las fluoroquinolonas; entre las fluoroquinolonas usadas en animales y aquellas de uso humano es un aspecto particularmente importante para la Salud Pública. Existe una asociación temporal entre la introducción de las fluoroquinolonas en la crianza de aves y el sustancial aumento en la prevalencia de *Campylobacter jejuni* resistentes a quinolonas aislados de aves, carne de aves y humanos infectados. Además, estudios recientes han confirmado la similitud entre cepas de *Campylobacter spp.* resistentes a las fluoroquinolonas aisladas de animales y humanos. Existe también una relación entre la introducción de las fluoroquinolonas en la producción animal y la aparición de cepas de *Salmonella typhimurium* DT104 y variantes de *S. typhimurium* DT204 resistentes a estos antimicrobianos. Varios países han informado un aumento en las cepas bacterianas con menor susceptibilidad a las fluoroquinolonas en animales luego de la introducción de estos compuestos para su uso en producción animal. Hay que destacar que ya se ha reportado resistencia a la enrofloxacin en *E. coli*, *Campylobacter jejuni* y *C. coli*.²¹

Es por esto que, hoy en día se utilizan medicamentos con enrofloxacin para el tratamiento de estas infecciones sobre el ganado vacuno (tabla 1) lamentablemente estas formas farmacéuticas no son tan seguras y efectivas como quisiéramos, las administraciones se dan en tiempos muy cortos, algunas disoluciones inyectables están formuladas a un pH cercano a 10 trayendo consecuencias de estrés en los animales, además de necrosis de tejido. Debido a esto, en la actualidad se buscan nuevas formas de administrar principios activos como la enrofloxacin en animales de una forma segura y efectiva, como los sistemas de liberación modificada.⁶

3.2 Sistemas de liberación modificada.

Una rama importante del desarrollo farmacéutico es el área de sistemas de liberación modificada, la cual tiene sus inicios en la primera década del siglo XX por Paul Ehrlich que se planteaba la búsqueda de una sustancia capaz de eliminar solamente al organismo productor de la enfermedad.²² Ehrlich halló el dioxidiamidoarsenobenzol, que poseía propiedades parasitótropas y no organotrofas. Este era el compuesto 606 al que le puso el nombre de salvarsán, o "arsénico que salva". Más tarde, conforme al método científico, verificó las hipótesis y estableció las pautas de administración y así logró eliminar los gérmenes causantes de la sífilis sin lesionar al organismo mediante la inyección de un producto en la sangre, que denominó "balas mágicas" una especie de medicina dirigida a un punto en específico.²³

Durante los siglos XIX y XX, se presentó la revolución de los fármacos, se desarrollaron nuevos productos como polvos o líquidos de administración oral o de aplicación externa. A partir de la década de los 30's se comenzó a hablar acerca de los sistemas de liberación controlada y en 1937 la Royal Society of Medicine en Londres describe una preparación de hormonas de administración subcutánea que muestra una liberación continua durante tres meses en diversos animales. Esta idea se practicó de manera eficiente en 1950 en el ganado para mejorar el crecimiento. El desarrollo de formulaciones de liberación sostenida de administración intramuscular y subcutánea se ha incrementado en la industria veterinaria en las últimas dos décadas.²⁴

La aplicación más popular de los sistemas de liberación modificada de fármacos tiene por objetivo la administración de un sistema que genere efectividad terapéutica durante períodos de tiempo amplios en comparación con los sistemas de liberación convencionales (Figura 5). Durante el desarrollo de un sistema de liberación es necesario considerar la biocompatibilidad de todos los agentes, los cuales deben ser químicamente inertes, no carcinogénicos, hipoalergénicos y estables en el sitio de implante.²⁵

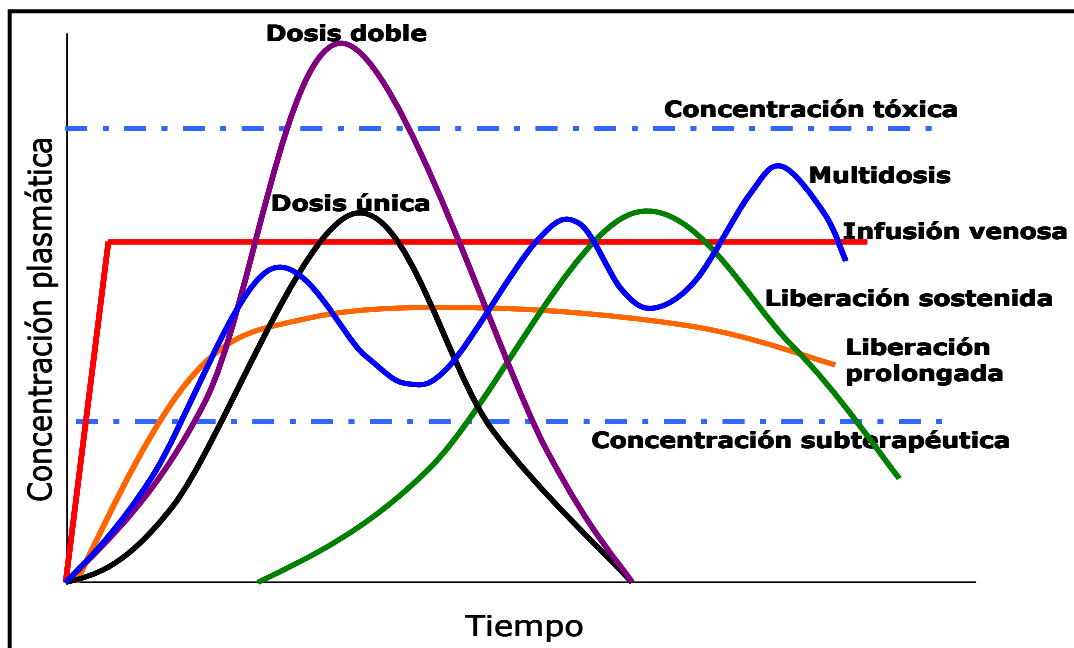


Figura 5. Perfiles de liberación de fármacos.

3.2.1 Control de la liberación

Se describen dos tipos de control de liberación de fármacos: control temporal y control espacial. El primero es utilizado para terapias de tiempo prolongado, ayuda a la administración de fármacos que se metabolizan y eliminan rápidamente del organismo después de su administración. Clínicamente estos sistemas producen un mejoramiento en la terapia de fármacos. El segundo tipo favorece la liberación del fármaco en el sitio de acción, es útil para fármacos cuya distribución causa efectos colaterales o cuando el fármaco no llega a su sitio de acción de manera eficiente.²⁴

Algunas ventajas de los sistemas de liberación modificada son: proteger al fármaco de su metabolismo, la habilidad de liberar localmente el fármaco en el sitio de inyección y reducir la toxicidad sistémica. Otra ventaja que ofrecen este tipo de sistemas sobre las formas de dosificación convencionales es el aumento en la eficacia debido a la mejora en la biodisponibilidad del fármaco.

Los sistemas coloidales para transportar fármacos incluyen las microemulsiones, emulsiones (o/w, w/o y w/o/w), liposomas, micropartículas y nanopartículas de polímeros sintéticos o naturales y de lípidos.²⁵

3.2.1.1 Microemulsiones

En el siglo antepasado sin saberlo, las amas de casa australianas lavaban la lana usando una microemulsión la cual, formaban añadiendo al agua aceite de eucaliptos y virutas de jabón. Lo único que se sabía era que poseía buenas cualidades de detergencia que conserva la suavidad de la lana. Sin embargo, la primera microemulsión que se patentó y luego se comercializó como tal, en el siglo XX fue hecha por George Rodawald en Saint Louis, Missouri (USA) en 1928, se trataba de una dispersión de cera de carnauba en agua, obtenida gracias a una mezcla de tensoactivos, entre los cuales figuraba el oleato de potasio. Esta dispersión resultó ser el antecesor de las ceras líquidas llamando la atención por su estabilidad.²⁶

En los últimos años, los sistemas denominados microemulsiones, han tenido un amplio desarrollo, ya que debido a su estabilidad y estructura formada por pequeñas gotas suspendidas en otro líquido han permitido una gran aplicación en diversos campos. En el año de 1943 Schulman y Hoar identificaron tipos especiales de dispersiones coloidales y a partir de 1958 se les asignó el nombre de microemulsiones.²⁷

Desde 1955 se han utilizado estos sistemas, aunque con frecuencia se realizaron sin tener conocimiento de que se trataba de microemulsiones. Entre sus primeras aplicaciones se encuentran: aceites, detergentes, ceras para pisos, pinturas, etc. Después se llevaron a investigación, especialmente cuando aparecieron aplicaciones potenciales en la recuperación del petróleo. En la actualidad se pueden encontrar microemulsiones en el campo de materiales fisiológicos, farmacéuticos y cosmetológicos. Por ejemplo: champús y liberación controlada de principios activos.²⁶

No obstante, en los inicios del estudio de las microemulsiones resultó difícil establecer una clara delimitación entre soluciones micelares, emulsiones y microemulsiones. Schulman y Hoar en 1943 definieron a las microemulsiones como "Dispersiones líquidas transparentes de agua en aceite a las cuales llamaron: hidromicelas oleofáticas" (micelas de agua en aceite, figura 6).²⁸

Posteriormente Clayton define a una emulsión como “Un sistema formado por dos fases líquidas inmiscibles o casi inmiscibles. Una de las cuales se encuentra dispersa como glóbulos en la otra. El líquido que forma los glóbulos se llama fase dispersa o interna y el líquido que rodea a esta última se le llama fase continua o externa”.

Las emulsiones tienen como rasgo común la presencia de un tensoactivo y el hecho de que requieren trabajo mecánico para dispersar un líquido en otro como gotas, por medio de, ya sea agitación, homogenización y/o ultrasonido. En cambio, las microemulsiones son sistemas pseudoternarios constituidos generalmente por aceite, agua, tensoactivo y co-tensoactivo (comúnmente un alcohol de cadena corta) que pueden estar formadas por gotas de aceite en agua o viceversa. Apareciendo fluidas, ópticamente isotrópicas (homogéneas en todas direcciones del sistema), transparentes y estables termodinámicamente, formándose espontáneamente (aunque eso no implica que el proceso sea instantáneo). Las gotas poseen diámetros entre 10 y 200 nm.^{29, 30, 31}

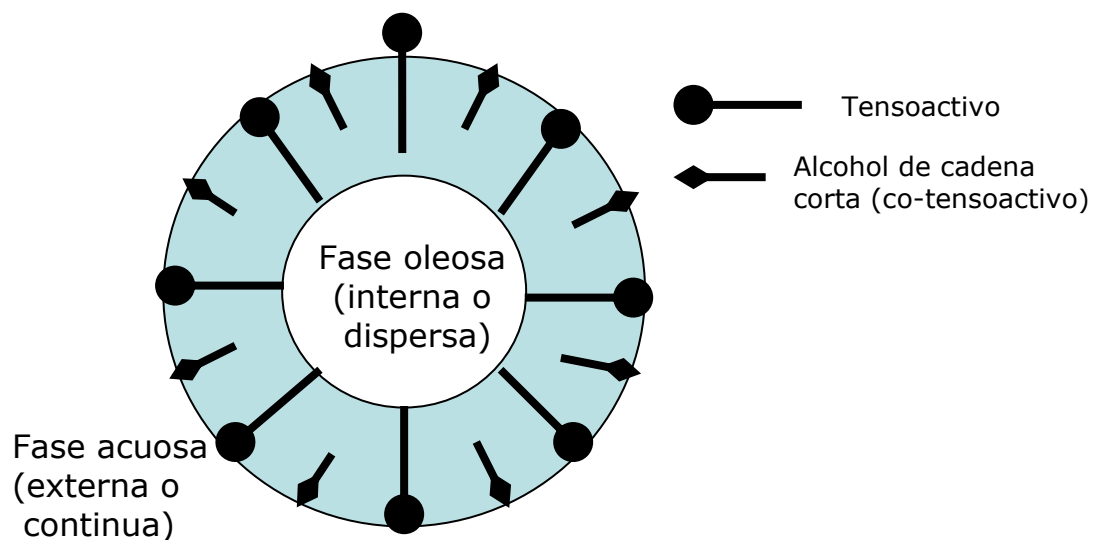


Figura 6. Esquema teórico de una micela, dentro de una microemulsión o/w.

Existen microemulsiones agua en aceite (w/o) y aceite en agua (o/w), las cuales pueden invertirse una a la otra por adición gradual de la fase que constituye su fase interna (fase continua) o por cambio del agente emulsificante (figura 7).^{32, 33, 34} Por ejemplo, partiendo de una microemulsión w/o, al ir adicionando agua, el

sistema pasa por un "estado de gel viscoelástico" (el cual puede ser casi sólido) y al adicionar más agua el sistema se convierte en una microemulsión o/w, otra vez fluida. Este estado de gel viscoelástico aparece en la "zona de inversión" de algunos sistemas de microemulsión (no en todos) caracterizándose por ser un gel que presenta recuperación elástica al deformarse durante el flujo.³⁵

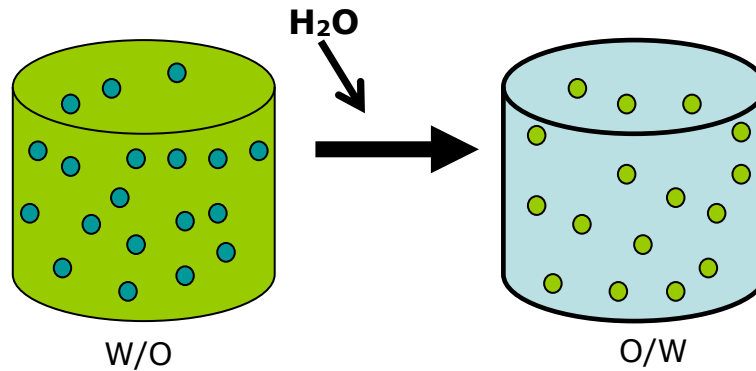


Figura 7. Cambio del tipo de microemulsión al titular con la fase externa. En este caso agua, y aceite como fase interna.

Según la aplicación deseada, la formulación de una microemulsión involucra: adecuado manejo de HLB (balance lipofílico - hidrofílico), temperatura de inversión de fase, tensoactivo, variación de pH, concentración de electrolitos y tipo de aceite y/o disolvente. Esto último resulta muy importante, ya que no todos los aceites son capaces de formar microemulsiones.³¹

Las microemulsiones se pueden presentar como sistemas homogéneos y heterogéneos. Los primeros son sistemas que a simple vista parecen una sola fase, siendo w/o o o/w. En el segundo caso, se incluyen sistemas de varias fases, estudiados por Winsor y Palit en los que coexiste una fase acuosa con una microemulsión w/o, una fase oleosa con una microemulsión o/w, o una fase acuosa, una fase oleosa y una fase rica en tensoactivo al mismo tiempo. Son estos últimos sistemas, los heterogéneos, los que son útiles en la recuperación terciaria del petróleo.^{36, 37}

Para reconocer una microemulsión y entender su funcionamiento se recurre a mediciones físicas entre las que se encuentran: dispersión de luz, reología, conductividad y resonancia magnética nuclear. Cada una de estas técnicas va a

proporcionar diferentes parámetros como son diámetro de la gota, forma del agregado, estabilidad y dinámica de la interfase, entre otros.³⁸

3.2.1.1.1 Preparación de microemulsiones

El mecanismo para formar microemulsiones difiere al usado para emulsiones en ciertos aspectos; la diferencia más significativa radica en que para la elaboración de macroemulsiones se adiciona trabajo y un tensoactivo para mejorar su estabilidad, no así para las microemulsiones. En estos sistemas su formación depende de las interacciones entre moléculas de aceite, agua, un tensoactivo y un cotensoactivo. Si no se presentan las interacciones mencionadas, ningún tipo de trabajo producirá una microemulsión. Uno de los requerimientos que se deben de cumplir para formar una microemulsión es disponer de una cantidad adecuada de la mezcla de tensoactivos (generalmente alta), ya que es preciso formar micelas dentro de la fase externa.^{39, 40}

En la mezcla del tensoactivo-cotensoactivo la función del cotensoactivo (molécula anfifílica de bajo HLB, como un alcohol de cadena corta) es disminuir considerablemente la tensión interfacial.^{29, 34}

3.2.1.1.2 Métodos de Caracterización

Los métodos de estudio son importantes para reconocer las microemulsiones, entender su comportamiento y las variables que las afectan, entre estos podemos citar:

- I. Inspección visual
- II. Centrifugación
- III. Prueba de tinción
- IV. Dilución
- V. Dispersión de luz
- VI. Birrefringencia óptica.
- VII. Reología.
- VIII. Conductividad.
- IX. Resonancia magnética nuclear.
- X. Rayos X
- XI. Microscopía electrónica.

I. Inspección visual

La apariencia de estos sistemas, basados en las definiciones mostradas, debe de ser un sistema translúcido o transparente. Para que un sistema pueda presentar dichas propiedades debe contar con un tamaño de glóbulo de aproximadamente un cuarto de la longitud de onda para la luz visible (0.25λ); sin embargo, también se han reportado sistemas ligeramente opalescentes lo que indica que su tamaño es ligeramente mayor a un 0.25λ . El rango de longitud de la luz visible va del violeta con $\lambda=400$ nm hasta el rojo con $\lambda=700$ nm.

En dispersiones acuosas, la dispersión de luz se observa a simple vista como EFECTO TYNDALL que corresponde a la porción de luz polarizada que es dispersada. Lord Rayleigh fue el primero que trabajó con el fenómeno de dispersión de luz, observándolo en el azul del cielo y el rojo-naranja del ocaso.

De acuerdo con la apariencia de la luz dispersada se pueden identificar microemulsiones y medir aproximadamente el tamaño de las gotas. Con ayuda de la siguiente tabla se puede, al menos, estimar el tamaño de las gotas.

En microemulsiones o/w normales, el tamaño de las gotas está en el intervalo de 10 a 200 nm, a causa de la gran cantidad de tesoactivo presente.

Tabla 3. Estimación del tamaño de partícula por apariencia.

ESTRUCTURA	DIAMETRO (nm)	APARIENCIA
Molécula de agua	0.27	Transparente
Micela de jabón	3.5 -7.5	Transparente
Solución micelar	5 - 15	Transparente
Unidad visible macroscópicamente	100 - 200	Translúcida cuando hay dispersión
Macroemulsión	200 - 10 000	Opaca, lechosa

En microemulsiones o/w normales, el tamaño de las gotas está en el intervalo de 10 a 200 nm, a causa de la gran cantidad de tesoactivo presente.

II. Centrifugación

Esta prueba es empleada para determinar si el sistema se encuentra en equilibrio termodinámico, es decir que sea una sola fase. La centrifugación de estos sistemas permite determinar de manera rápida su estabilidad.

Las velocidades de sedimentación se pueden medir en un campo gravitacional a 1 G. en cilindros graduados de una centrifuga de laboratorio de 100 a 500 Gs o en una ultracentrifuga de altas velocidades. Bastan solo 5 minutos de rotación para dar a conocer la estabilidad de las microemulsiones.

III. Prueba de tinción

Esta prueba es útil para determinar el tipo de emulsión, se basa en el hecho de añadir un colorante hidrofílico y uno lipofílico a la dispersión en cuestión. El colorante que se incorpore estará en función de la polaridad de la fase externa de la microemulsión. Esta prueba se apoya por lo general de un microscopio óptico para hacer una mejor observación.

IV. Dilución

Esta prueba es útil para la identificación del tipo de microemulsión, consiste en dos partes:

- a) Tomar una parte de la microemulsión y valorarla con una disolución acuosa (agua) y observar si hay cambios, por ejemplo, que la microemulsión se ponga opaca
- b) Tomar la parte restante de la microemulsión y valorarla con una solución oleosa y observar cambios, por ejemplo, que la microemulsión se ponga opaca.

En cualquiera de los dos casos se observará que la microemulsión se romperá. Es decir, se formarán dos fases, lo cual quiere decir que la fase interna aumentara en proporción e inestabilizará al sistema. Por lo cual se concluye que la microemulsión tiene la fase interna semejante a la disolución valoradora.

V. Dispersión de luz

En dispersiones acuosas, la dispersión de luz se observa a simple vista como efecto TYNDALL que corresponde a la porción de luz polarizada que es dispersada. En este sentido, las microemulsiones aparecen azules para luz reflejada y rojo-naranja para luz transmitida debido a las longitudes de onda de la luz que no atraviesa la microemulsión y la que si la puede penetrar.

Un sistema donde las partículas son grandes en comparación a la longitud de onda de la luz blanca (560 nm aproximadamente), se verá color blanco ya que refleja y refracta la luz de una manera regular. Cuando las gotas están por debajo de $\frac{1}{4}$ de la longitud de onda de la luz blanca (140 nm de diámetro) la luz puede pasar a través de la dispersión y esta se ve translúcida u opalescente (de color azul/blanco). Dependiendo del índice de refracción relativo del aceite y del agua, tales sistemas aparecerán transparentes a simple vista cuando las gotas son de aproximadamente 200 nm de diámetro.

Si se requiere información cuantitativa, por ejemplo, en estudios de investigación o control de calidad, los instrumentos de medición de dispersión de luz más utilizados son entre otros: Fotómetro Brice Phoenix, Microfotómetro Ester, Nanosizer (de Malvern Instruments), entre otros.

Como ya se mencionó, estos efectos ópticos también dependen del índice de refracción de las sustancias involucradas y de la concentración de las gotas. Por ejemplo, una gota de un material de alto índice de refracción como el poliestireno en el látex, necesitaría tener un diámetro de 80 nm, en vez de 100 nm, para verse transparente en agua.

Dentro del fenómeno de dispersión de luz, la temperatura de inversión de fase (PIT), juega un rol importante ya que arriba de la temperatura crítica de completa miscibilidad de líquidos una microemulsión transparente dispersa la luz y el sistema se observa translucido u opalescente. Esta opalescencia se debe a la asociación de las moléculas de uno de los componentes del sistema para formar agregados de dimensiones coloidales.

VI. Birrefringencia óptica

La birrefringencia es un fenómeno de dispersión de luz que se agrupa aparte porque se requiere de una fuente de luz polarizada y cierta instrumentación. El aparato es simple; consiste en prismas de Nicol cruzados que normalmente extinguen la luz blanca completamente y pueden ser de una película plástica polarizada, dos portaobjetos de microscopio y una fuente de luz blanca.

Cuando se colocan una o dos gotas de una microemulsión (constituida por agregados de diferentes dimensiones) entre dos portaobjetos y se comprimen para producir flujo, por observación en los prismas cruzados, el campo iluminado aparecerá como modelos coloreados. Esto es debido a la dispersión y repolarización de la luz polarizada.

Este fenómeno se usa como herramienta para explicar que secuencia de estructuras aparecen cuando un sistema de microemulsión se invierte a través de un estado de gel viscoelástico de microemulsión o/w a w/o o viceversa. Si los agregados son esféricos y homogéneos, el sistema aparece negro cuando se ve a través de prismas de Nicol. Sin embargo, tan pronto como los agregados cambian a arreglos hexagonales de cilindros de agua o a micelas laminares (presentes en la zona de inversión), exhiben modelos de birrefringencia coloreados, los cuales no desaparecen hasta que los agregados cambian a esferas nuevamente. Esto ocurre cuando la luz esta polarizada. Al mismo tiempo, sin los prismas de Nicol cruzados, los agregados no isotrópicos pueden aparecer opalescentes a simple vista cuando su tamaño en cualquier dimensión excede los 100 nm.

VII. Conductividad

Shah y Hamlin estudiaron los cambios en claridad óptica y birrefringencia, los cuales ocurrían junto con modificaciones en la conductividad. Esto dio un método para determinar en qué punto en el estado de gel viscoelástico los agregados cambian de cilindros a micelas laminares. Para la medición de la conductividad se utiliza un conductímetro, el cual mide la facilidad con la que un electrón pasa de polo a polo en una muestra de microemulsión; es decir, mide el inverso de la resistencia.²⁷

En la actualidad la conductividad se usa para seguir además de lo anterior, la zona de inversión de fases a la que se encuentra sometida una microemulsión, la cual va de un volumen menor de agua en proporción al porcentaje de aceite, hasta un volumen de agua mayor en relación con la cantidad del aceite y de la mezcla de tensoactivos presentes en la mezcla.

VIII. Resonancia Magnética Nuclear

Las mediciones de resonancia magnética nuclear (RMN) se usan para resolver cuestiones teóricas, respecto al estado o localización de las moléculas de una microemulsión. Por ejemplo, la línea ancha en un espectro de RMN de protones puede ser una indicación de la libertad de las moléculas al movimiento térmico. También el cambio o sustitución química del agua, es diferente cuando está distribuido en esferas o micelas cilíndricas o laminares.⁴¹

IX. Rayos X

Los estudios de rayos x de bajo ángulo se han utilizado como herramienta para medir el diámetro de gotas de agua y aceite. Se sabe que las gotas de agua dan una dispersión de rayos X más fuerte y menos difusas que las de aceite en la diferenciación en microemulsiones.⁴²

X. Microscopia Electrónica

La característica requerida para investigar la estructura de las microemulsiones con microscopio electrónico de alta resolución es que las gotas de aceite en un sistema o/w sean resistentes al rayo de electrones.

Los sistemas o/w pueden contrastarse directamente con ácido ósmico si la fase oleosa se hace reactiva a esta sustancia. El agua en los sistemas oleosos puede contrastarse del mismo modo si se adicionan proteínas a la fase acuosa, tal que las gotas de agua puedan verse por el óxido metálico adherido a la proteína. En el sombreado de gotas se usa el OsO₄ entre otros óxidos metálicos, de esta manera la muestra es microtomada por secciones delgadas de 300 – 900 Å de espesor.^{24, 43, 44, 45}

3.2.1.1.3 Estabilidad termodinámica de las microemulsiones

El tratamiento termodinámico de las microemulsiones ha sido profundizado por diversos autores. En todos los casos se hacen consideraciones especiales para el manejo de las variables, tales aproximaciones han ayudado a formular y predecir el comportamiento de diversos sistemas.

Las funciones prácticas de los tensoactivos y cotensoactivos son múltiples, lo que hace que la descripción teórica de las microemulsiones sea difícil. Estos distintos elementos contribuyen a la energía del sistema que indudablemente hay que añadir a la energía interfacial.

Un sistema agua + tensoactivo + cotensoactivo + aceite puede generar microemulsiones cuando se cumplen dos principios:

1) el tensoactivo es capaz de saturar la interfase en lugar de constituir agregados puros dentro de una de las dos fases.

2) la interfase es altamente fluida entre el tensoactivo y la fase externa y las interacciones de rango largo (fuerzas de London) son débiles.

Algunos tensoactivos o mezclas de tensoactivos (tensoactivo + cotensoactivo) tienden incrementar el área total de la interfase entre el aceite y el agua. Esto conduce a sistemas altamente divididos, que caen en cualquiera de las dos clases siguientes:

1) Las regiones de agua y aceite forman una "ordenación periódica" basada principalmente en laminillas. En una escala microscópica, las estructuras periódicas se comportan como sólidos débiles, dando altas viscosidades aparentes.

2) En otros casos las placas o láminas interfaciales no constituyen una ordenación regular, sino que son distribuidas al azar, esto ocurre en forma de micelas a bajas concentraciones de aceite o agua. En estos casos, el sistema se comporta como un fluido transparente de baja viscosidad llamado microemulsión.

3.3 Recomendaciones de la EPA para determinación de lesión dérmica en animales de laboratorio por distintos excipientes.

Para aplicación subcutánea:

1. Animales de laboratorio adultos y saludables aclimatados a las condiciones de laboratorio por lo menos 5 días. Serán divididos en grupos de al menos 5 animales por sustancia a analizar.

2. Los grupos se formarán al azar de una cepa de ratas hembras de edad entre 8 y 12 semanas y el peso de estas debe estar en la media \pm 20 %.

3. Los animales de laboratorio serán marcados con un número único y diferenciando a que grupo pertenecen mediante un sistema de rastreo que permita la fácil identificación.

4. Los animales de laboratorio permanecerán en contenedores individuales.

5. Las condiciones óptimas deberán ser: temperatura $22 \pm 3^{\circ}$ C para roedores.

6. La humedad relativa del laboratorio de experimentación animal deberá ser del 30 al 70%.

7. Las fases de luz y sombra deberán ser de 12 cada una y serán de luz artificial.

8. La aplicación deberá ser en vehículos líquidos forzosamente.

9. El periodo de observación de los animales de laboratorio deberá de ser por lo menos de 14 días. Y en el caso de fallecimiento de alguno, se deberá practicar la necropsia correspondiente y hacer un estudio histológico del tejido.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

4.1 Planteamiento del problema

Con la información que se tiene acerca de la enrofloxacin (propiedades químicas, físicas, farmacológicas y fisicoquímicas), se considera candidato a la formulación en nuevos sistemas de liberación modificada, como lo son las microemulsiones, ya que actualmente las formulaciones más comunes de enrofloxacin son disoluciones inyectables con pH's cercanos a 10, lo cual tiene como consecuencia la necrosis de tejidos en los animales. Por otro lado, la administración de la forma farmacéutica convencional es multidosis, ya que el principio activo se libera demasiado rápido, en consecuencia, se tiene que volver a administrar el medicamento para mantener las concentraciones del fármaco dentro de la ventana terapéutica (Figura 5 y tabla 1). Además, los bolos que se administran a los animales son muy concentrados y esto trae como consecuencia a mediano plazo, la resistencia bacteriana.

La contribución que se puede generar a partir de la experimentación con microemulsiones y la enrofloxacin es la modificación de la solubilidad de la enrofloxacin utilizando como vehículo a la microemulsión, la cual es un sistema coloidal que funciona como un sistema de liberación modificada.

Es por eso por lo que, es necesario contribuir al desarrollo una nueva formulación con enrofloxacin en donde sus propiedades fisicoquímicas sean modificadas para beneficio de su liberación y solubilidad principalmente, con procedimientos sencillos que sean factibles para llevarlos al escalamiento dentro de la industria farmacéutica veterinaria.

4.2 Objetivos

4.2.1. Objetivo general

Diseñar, desarrollar y evaluar microemulsiones de enrofloxacin

4.2.2. Objetivos particulares

- Determinar el daño en tejido provocado por los excipientes de una microemulsión en animales de laboratorio.
- Obtener microemulsiones aceite/agua (O/W) de un sistema CH_2Cl_2 / H_2O / Brij 97®+isopropanol (en proporción 1:2).
- Determinar la cantidad máxima de enrofloxacin solubilizada en preparados de microemulsiones de un mismo sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ / Brij 97®/ Isopropanol.
- Determinar el perfil de liberación que presentan las microemulsiones preparadas con respecto a una solución inyectable de enrofloxacin (BAYTRIL ® de Bayer Veterinaria).

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Reactivos y Equipos

5.1.1 Reactivos

Para la elaboración de este trabajo se utilizó enrofloxacin proporcionada por Química Barca, Brij 97® o 96 (polioxietileno 10 oleil-eter) FLUKA, agua destilada y filtrada por filtros millipore 0.02 µm, isopropanol RA J.T. BAKER, cloruro de metileno RA J.T. BAKER, fosfato monobásico de sodio RA J.T. BAKER, fosfato dibásico de sodio RA J.T. BAKER, cloruro de sodio RA J.T. BAKER. Todos los reactivos fueron utilizados como se suministraron sin ningún trato previo.

Para las pruebas en animales se usaron 25 ratas cepa Sprague Dowley hembras de 6 semanas de edad y complejión constante, proporcionadas por el bioterio "centro UNAM HARLAN "conjunto E Facultad de Química UNAM.

5.1.2 Equipos

Espectrofotómetro Ocean Optics SAD 500 modelo 52000, Zetasizer Modelo Nano ZS de Malvern Instruments, parrillas de agitación con fuente de calor Fisher Scientific, balanza analítica digital Ohaus, celdas de difusión de Franz horizontales termostatadas a 37 °C, baño termostatado Scorpion Scientific con agitación.

5.2 Metodología

5.2.1 Ensayo de toxicidad

Para el estudio de lesión a nivel de tejido, se dividieron en cuatro grupos (a, b, c y d) 20 ratas hembras cepa Sprague Dowley de 2 semanas de vida, a las que se les administraron distintas soluciones preparadas con los excipientes a evaluar.

La administración de cada uno de los excipientes de la microemulsión en animales de laboratorio se realizó en un volumen de 0.5 mL, el cual corresponde al volumen máximo permitido para este tipo de animales. Las soluciones para administrar se prepararon de la siguiente manera:

- a) Preparación de la disolución de Brij 97® (tabla 4).

Tabla 4. Cantidad de excipientes para la preparación de la disolución de Brij 97®.

Componente	Cantidad
Brij 97®	830 mg
NaCl	45 mg
Agua	5 mL

La solución tiene una concentración final de 166 mg/mL de Brij 97®, por lo tanto, en 0.5 mL se tienen 83 mg. Esta cantidad es superior a la que se utilizará en las microemulsiones por preparar, puesto que, se busca elucidar el daño producido en animales de laboratorio en presencia de altas concentraciones de los excipientes.

b) Preparación de la disolución de isopropanol (tabla 5).

Tabla 5. Cantidad de excipiente para la preparación de la disolución de isopropanol.

Componente	Cantidad
Isopropanol	1770 mg
NaCl	45 mg
Agua	5 mL

La concentración final de la solución es de 354 mg/mL de isopropanol, por lo tanto, en 0.5 mL se tiene la cantidad de 177 mg.

El isopropanol está considerado en la lista Q3C de la FDA como un reactivo de clase 3, lo que implica que es de bajo riesgo dado que la cantidad permitida es hasta 5 mg/mL (5000 ppm).

c) Preparación de la disolución de Cloruro de Metileno (tabla 6).

Tabla 6. Cantidad de excipientes para la preparación de la disolución de Cloruro de metileno.

Componente	Cantidad
Cloruro de Metileno	2350 mg
NaCl	45 mg
Agua	5 ml

La concentración final de la solución de cloruro de metileno es de 470 mg/mL, teniendo en 0.5 mL la cantidad de 235 mg.

Al cloruro de metileno se le considera dentro de la lista de la FDA Q3C como una sustancia de riesgo para la salud considerándola de clase 2, en donde se permite tenerla en una concentración de hasta 600ppm, la cual es muy alta y sirve para elucidar los posibles efectos tóxicos sobre un animal de laboratorio.

La elección de un disolvente de esta naturaleza como fase oleosa responde a la propiedad de ser inmisible en agua por su baja constante dieléctrica, lo que permite formular una microemulsión. Además, es un buen disolvente para la enrofloxacin y al tener una presión de vapor alta favorece su posterior eliminación. Microemulsiones de esta naturaleza pueden ser utilizadas para generar nanopartículas poliméricas como sistemas de liberación modificada, o bien, en síntesis.

d) Preparación de la microemulsión (tabla 7).

Tabla 7. Cantidades de excipientes en la preparación de la microemulsión.

Componente	Cantidad
Mezcla de tensoactivos	0.846 mg
Cloruro de metileno	0.482 mg
Agua	2.25 mL

La microemulsión está compuesta en relación porcentual de: 81.81% de agua, 14.54 % de CH₂Cl₂ y 3.63% de la mezcla de tensoactivos (v/v), que representan en conjunto cerca de un 18 % de masa de excipientes en 0.5 mL de la muestra; muy poco concentrado en comparación con los ensayos anteriores.

5.2.2 Obtención de microemulsiones aceite en agua (O/W) de un sistema CH₂Cl₂ / H₂O / brij97+isopropanol (en proporción 1:2)

La obtención del diagrama de fases pseudoternario se obtuvo a partir de:

a) Preparación de la mezcla de tensoactivos, (Brij 97® + isopropanol en relación 1:2 p/p).

$$20 \text{ mL}_{\text{isopropanol}} * 0.7667 \frac{\text{g}}{\text{mL}_{\text{isopropanol}}} = 15.334 \text{ g}$$

∴ la masa de Brij 97® corresponde a la mitad de esta cantidad

$$\Rightarrow \frac{15.334 \text{ g}}{2} = 7.667 \text{ g de Brij 97®}$$

b) Titulación con agua de las preparaciones con mezcla de un volumen fijo de cloruro de metileno y un volumen fijo de la mezcla de tensoactivo-cotensioactivo hasta un volumen final de 2000 µL.

A cada muestra se le agregaron alícuotas de agua de 50µL y se agitaron con la ayuda de una parrilla de agitación a temperatura constante.

Después de agregar la alícuota de agua a la preparación, se procedió a realizar una inspección visual de la muestra. Como lo hizo en el año del 1998 Gratz K. al estudiar el comportamiento de un sistema de microemulsiones compuestas por agua y n-heptano con un tensoactivo no iónico como el Igepal®; en ese estudio observaron el comportamiento de las microemulsiones y determinaron mediante un diagrama de fases las características de esta, semejante a lo realizado por Wang W. al sintetizar nanopartículas a partir de microemulsiones de Span y Tween, las cuales durante su preparación fueron inspeccionadas visualmente para determinar si el sistema daba por resultado microemulsiones.⁴⁶

Los resultados se trataron usando el software de cálculo (Microsoft Excel® y Origin 2016®). De esta manera se obtuvo el diagrama de fases pseudoternario y así se elucidaron las zonas donde se forma la microemulsión. Posteriormente, esto se corroboró experimentalmente eligiendo 30 puntos de manera aleatoria.

Tabla 8. Proporciones de los excipientes para la formación de las microemulsiones.

Volumen de cloruro de metileno inicial (μL)	Porcentaje de cloruro de metileno inicial	Volumen de la mezcla de tensoactivos inicial (μL)	Porcentaje de la mezcla de tensoactivos inicial	Volumen final de la muestra (μl)	Porcentaje final de la muestra
200	10.0%	1800	90.0%	2000	100%
300	15.0%	1700	85.0%	2000	100%
400	20.0%	1600	80.0%	2000	100%
500	25.0%	1500	75.0%	2000	100%
550	27.5%	1450	72.5%	2000	100%
600	30.0%	1400	70.0%	2000	100%
650	32.5%	1350	67.5%	2000	100%
700	35.0%	1300	65.0%	2000	100%
750	37.5%	1250	62.5%	2000	100%
800	40.0%	1200	60.0%	2000	100%
850	42.5%	1150	57.5%	2000	100%
900	45.0%	1100	55.0%	2000	100%
950	47.5%	1050	52.5%	2000	100%
1000	50.0%	1000	50.0%	2000	100%
1100	55.0%	900	45.0%	2000	100%
1200	60.0%	800	40.0%	2000	100%
1300	65.0%	700	35.0%	2000	100%
1400	70.0%	600	30.0%	2000	100%
1500	75.0%	500	25.0%	2000	100%
1600	80.0%	400	20.0%	2000	100%
1700	85.0%	300	15.0%	2000	100%
1800	90.0%	200	10.0%	2000	100%
1850	92.5%	150	7.5%	2000	100%
1900	95.0%	100	5.0%	2000	100%

5.2.3 Determinación de la inversión de fases

Para esta determinación se utilizaron microemulsiones derivadas del diagrama de fases pseudoternario. Se prepararon 30 muestras de diferente composición que se mantuvieron en agitación a temperatura constante (25° C).

Tabla 9. Serie de microemulsiones utilizadas en la medición de tamaño de partícula.

MUESTRA	CH ₂ Cl ₂ (μL)	TENSOACTIVO 1:2 (μL)	AGUA (μL)	VOLUMEN FINAL (μL)
1	400	3600	400	4400
2	400	3600	2100	6100
3	200	1800	2050	4050
4	100	900	2075	3075
5	100	900	3175	4175
6	50	450	3175	3675
7	1000	3000	400	4400
8	1000	3000	1400	5400
9	500	1500	1900	3900
10	500	1500	3300	5300
11	200	600	4760	5560
12	170	510	4300	4970
13	2000	2000	150	4150
14	1500	1500	1950	4950
15	500	500	3100	4100
16	500	500	4850	5850
17	500	500	5700	6700
18	375	375	5250	6000
19	3000	1000	300	4300
20	1500	500	2700	4700
21	1500	500	5100	7100
22	750	250	4600	5600
23	750	250	6050	7050
24	375	125	4125	4624
25	3600	400	100	4100
26	1800	200	1900	3900
27	900	100	3625	4625
28	900	100	4475	5475
29	900	100	4750	5750
30	900	100	5050	6050

A las muestras preparadas (tabla 9) se les determinó el tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz y ensayos de conductividad por movilidad microelectroforética (Nanosizer de Malvern Instruments model ZE3200, figura 9),

con el fin de determinar la inversión de fases. Todos estos ensayos se realizaron por triplicado para obtener datos estadísticos confiables.



Figura 9. Nanoziser de Malvern Instruments; utilizado para medir conductividad y tamaño de partícula.

5.2.4 Pruebas de solubilidad de enrofloxacin en CH₂Cl₂.

Para determinar la cantidad de enrofloxacin máxima solubilizada en CH₂Cl₂ se realizó lo siguiente: Se pesó una muestra de enrofloxacin (mayor de 20 mg) y se colocó en un vial y poco a poco se añadieron volúmenes pequeños de cloruro de metileno a baja temperatura con agitación constante hasta observar que ya no existían partículas de enrofloxacin suspendidas en el disolvente. Este ensayo se realizó 3 veces para sacar un promedio y así obtener la cantidad máxima de enrofloxacin disuelta en CH₂Cl₂. La justificación de este ensayo es porque debido a la volatilidad del cloruro de metileno no se encontró un método por el cual se pudiera conocer la cantidad máxima de principio activo solubilizada en el disolvente sin que este se evaporara a la temperatura de trabajo.

5.2.5 Evaluación de la capacidad de incorporación de enrofloxacin a las microemulsiones

Para la determinación de la liberación de enrofloxacin se preparó una serie de microemulsiones derivadas del diagrama de fases (tabla 10), de naturaleza

O/W, las cuales fueron caracterizadas anteriormente por determinación de la inversión de fases en una línea de microemulsiones.

Tabla 10. Código de microemulsiones preparadas para la liberación de enrofloxacin.

CÓDIGO	PORCENTAJE v/v INICIAL DE CH₂Cl₂	PORCENTAJE v/v FINAL DE AGUA
A	10% (LINEA 1)	65%
B	10% (LINEA 1)	70%
C	10% (LINEA 1)	75%
D	15% (LINEA 2)	65%
E	15% (LINEA 2)	70%
F	15% (LINEA 2)	75%

Previamente, en la fase orgánica (cloruro de metileno) se disuelve una determinada cantidad de enrofloxacin, así como lo muestra la tabla 11.

Tabla 11. Cantidad de enrofloxacin disuelta en cloruro de metileno.

Muestra	Cantidad de enrofloxacin disuelta en CH₂Cl₂ (mg/mL)
1	0
2	25
3	37.5
4	50
5	62.5

Posteriormente, se prepararon las microemulsiones combinando fase orgánica, fase acuosa y mezcla de tensoactivo:cotensoactivo en las proporciones indicadas en la tabla 12, de las cuales solo a las que presenten estabilidad física y la mayor cantidad de activo disuelto se les realizará ensayo de liberación.

5.2.6 Ensayos de liberación de enrofloxacin desde microemulsiones

Los ensayos de liberación se llevaron a cabo en celdas de difusión de Franz en arreglo horizontal, con control de temperatura a 37°C ±0.5, en donador y receptor, como medio de disolución se utilizó buffer de fosfatos pH 7.5 ±0.1 y colocada sobre una parrilla magnética con agitación independiente.

Se realizó una curva de calibración de Enrofloxacin en buffer de fosfatos a pH 7.5 ± 0.1 (figura 11). Las concentraciones utilizadas en la preparación de la curva de calibración van desde 1×10^{-3} M hasta 1×10^{-2} M haciendo entre este intervalo de concentraciones 10 puntos que cumplan la ley de Lambert y Beer en absorbancia.

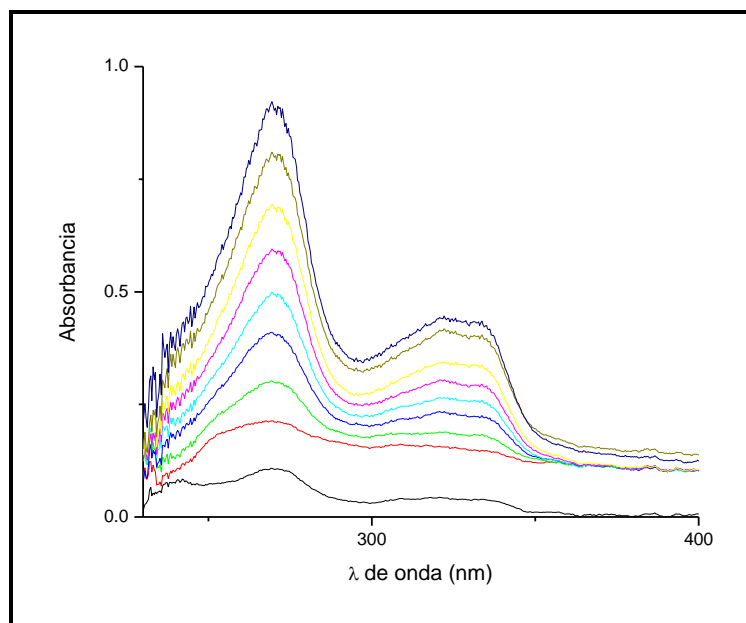


Figura 11. Curva de calibración de enrofloxacin.

Haciendo la regresión lineal con estos datos obtenemos la ecuación de la recta, que nos servirá para el cálculo de la cantidad de enrofloxacin liberada por las muestras.

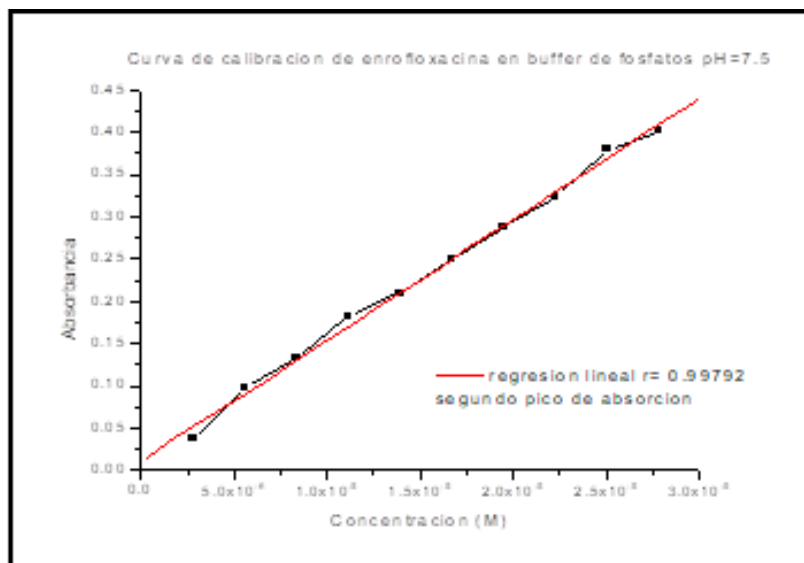


Figura 12. Gráfica de la curva de calibración.

A pesar de que la enrofloxacin tiene dos puntos máximos de absorción, se toma en cuenta solo el segundo pico dado que la absorción del Brij 97® está cerca del primer pico de la enrofloxacin y hay traslape de señales, para el segundo pico de absorción este traslape de señales desaparece y sigue un comportamiento lineal con las concentraciones utilizadas.

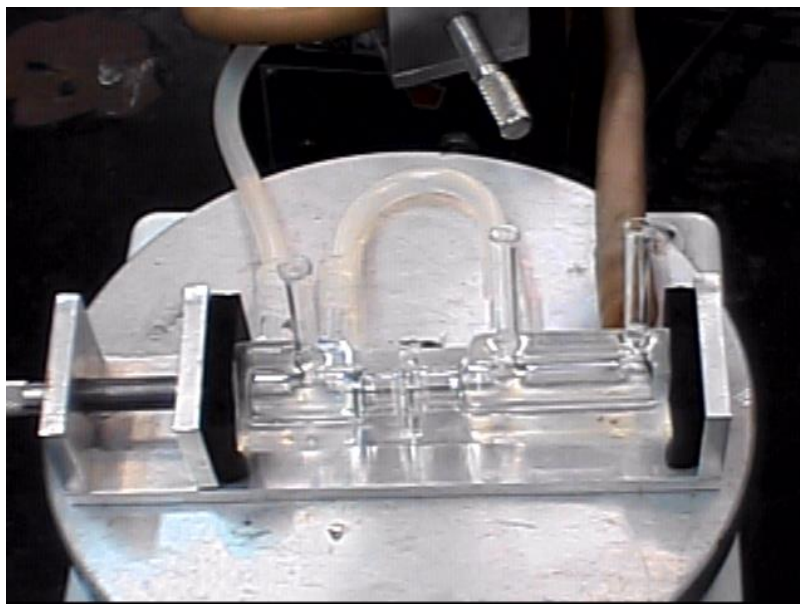


Figura 13. Celdas de liberación de Franz.

Para la liberación se tomaron 3 mL de la microemulsión con enrofloxacin y se introdujeron dentro de la celda donadora en el equipo de difusión de Franz (figura 13). Por otro lado, en la celda receptora se introdujo un volumen exacto de 5 mL de buffer de fosfatos pH 7.5. Se utilizó una membrana de celofán con tamaño de poro de 12-14 kD marca Spectrum Laboratorios Inc. Las muestras se tomaron en alícuotas de 2 mL para cada una, a intervalos de tiempo de 5, 10, 15, 30 y 60 minutos hasta completar al menos 60 horas.

Para la liberación de la muestra de Baytril® se tomaron 3 mL de la solución inyectable y se introdujeron de igual manera en la celda donadora de Franz y del otro lado se puso buffer de fosfatos pH= 7.5.

Tabla 12. Microemulsiones preparadas con distintas cantidades de enrofloxacin.

MUESTRA	AGUA		Ts(BRIJ 97+IsOH) 1:2		CH ₂ CL ₂		CANTIDAD DE ENROFLOXACINA (mg/ml)
	VOLUMEN μ l	%	VOLUMEN μ L	%	VOLUMEN μ l	%	
A ₁	1900	65.52	900	31.03	100	3.45	0
A ₂	1900	65.52	900	31.03	100	3.45	0.86
A ₃	1900	65.52	900	31.03	100	3.45	1.29
A ₄	1900	65.52	900	31.03	100	3.45	1.72
A ₅	1900	65.52	900	31.03	100	3.45	2.15
B ₁	2400	70.59	900	26.47	100	2.94	0
B ₂	2400	70.59	900	26.47	100	2.94	0.73
B ₃	2400	70.59	900	26.47	100	2.94	1.1
B ₄	2400	70.59	900	26.47	100	2.94	1.47
B ₅	2400	70.59	900	26.47	100	2.94	1.83
C ₁	3000	75	900	22.5	100	2.5	0
C ₂	3000	75	900	22.5	100	2.5	0.625
C ₃	3000	75	900	22.5	100	2.5	0.9375
C ₄	3000	75	900	22.5	100	2.5	1.25
C ₅	3000	75	900	22.5	100	2.5	1.5625
D ₁	1900	65.5	850	29.3	150	5.2	0
D ₂	1900	65.5	850	29.3	150	5.2	1.29
D ₃	1900	65.5	850	29.3	150	5.2	1.93
D ₄	1900	65.5	850	29.3	150	5.2	2.58
D ₅	1900	65.5	850	29.3	150	5.2	3.23
E ₁	2400	70.6	850	25.0	150	4.4	0
E ₂	2400	70.6	850	25.0	150	4.4	1.1
E ₃	2400	70.6	850	25.0	150	4.4	1.65
E ₄	2400	70.6	850	25.0	150	4.4	2.2
E ₅	2400	70.6	850	25.0	150	4.4	2.75
F ₁	3000	75	850	21.25	150	3.75	0
F ₂	3000	75	850	21.25	150	3.75	0.93
F ₃	3000	75	850	21.25	150	3.75	1.4
F ₄	3000	75	850	21.25	150	3.75	1.875
F ₅	3000	75	850	21.25	150	3.75	2.34

6. Resultados y Discusión

6.1 Ensayo de toxicidad.

a) Ensayos con Brij 97®

El comportamiento de los animales de laboratorio después de la administración de la solución de Brij 97® fue normal en todo momento, esto se debe a la baja toxicidad del tensoactivo y a la concentración, la cual era muy baja como para producir lesiones.



Figura 14. Animales de laboratorio tratados con Brij 97®.

La observación se realizó durante 14 días después de la aplicación del tensoactivo en el animal, durante este tiempo se tomaba la temperatura rectal y la capacidad de reacción. También se observó el comportamiento individual de cada individuo y la interacción que tenía con los de su especie.

Después de los estudios realizados se aplicó la eutanasia, para evidenciar el daño en órganos y tejidos. Estos estudios no revelaron modificaciones fisiológicas en ninguno de los animales de laboratorio. Para el caso de este tensoactivo no existen reportes de toxicidad por exposición en animales de laboratorio más que los mencionados en la hoja de seguridad de este material.

b) Ensayos con Isopropanol

Las observaciones que se realizaron después de la aplicación de este alcohol a los animales de laboratorio no reflejaron aparente daño al tejido del animal. Solo

en las primeras horas después de la aplicación se observaron zonas de irritación en el punto de aplicación de esta sustancia (figura 15).

El comportamiento de los animales fue definitivamente normal, la temperatura rectal en todos los casos no presentó variaciones.

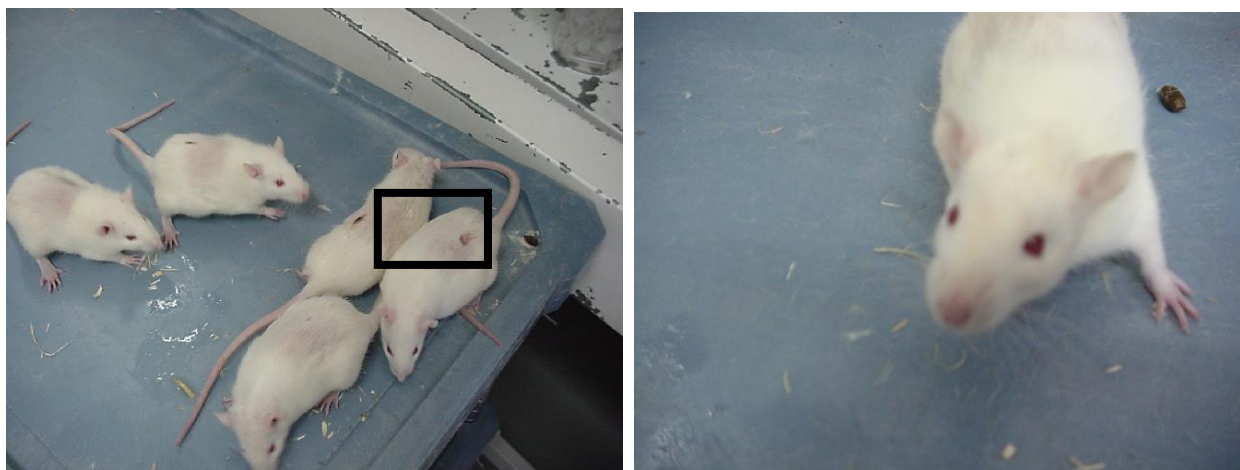


Figura 15. Imagen de los animales de laboratorio tratados con isopropanol.

Después de la eutanasia aplicada y la posterior necropsia, no se revelaron signos de daño tanto a nivel de tejidos como a nivel de órganos. Esto se debe a que el isopropanol es una sustancia que tiene muy poca toxicidad a esta concentración. Esto concuerda con lo reportado por Heather D. Burleigh-Flayer en donde estudió el efecto tóxico por exposición a vapores de isopropanol a diferentes concentraciones de hasta 5000 ppm concluyendo que el isopropanol causa irritación en vías respiratorias en animales de laboratorio sin afectar órganos y sistemas.⁴⁷

c) Ensayos con cloruro de metileno

El comportamiento de los animales varió con respecto al comportamiento con los demás excipientes. El grado de actividad era muy alto, los reflejos de los animales se vieron afectados dado que se observó que no reaccionaron rápidamente a las estimulaciones de sonido aplicadas. En el punto de aplicación de la sustancia se observó necrosis de tejido (figura 16), así como muertes de algunos animales dentro de las primeras horas, esto se debe principalmente a la toxicidad del cloruro de metileno y también a la aplicación errónea en el volumen de la disolución del cloruro de metileno, el cual no fue homogéneo en todos los

integrantes del grupo. Estas observaciones difieren en cuanto a las reportadas por John P. Groten quien demuestra que la toxicidad del cloruro de metileno por exposición durante cuatro semanas es muy baja y no presenta daños fisiológicos en los animales de laboratorio.⁴⁸

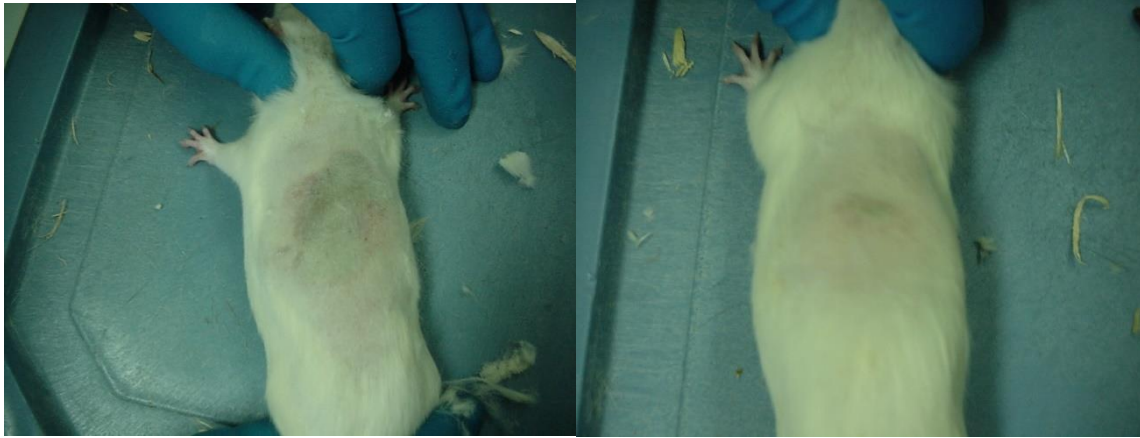


Figura 16. Imagen de los animales de laboratorio tratados con cloruro de metileno.

Se les realizó la necropsia y estudios histológicos (figura 17) en los cuales se muestra la degradación del tejido, el rompimiento de las capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis) produciendo un grado de lesión alto a estos animales.

Dentro de las observaciones más importantes, resalta la intoxicación de los animales por el cloruro de metileno, el cual se caracterizó por una cianosis generalizada.

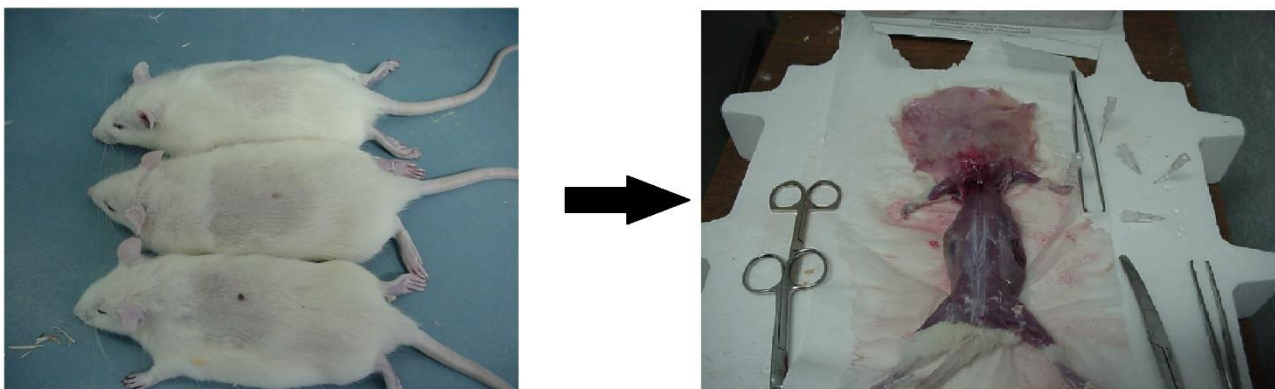


Figura 17. Necropsia aplicada a los animales de laboratorio después de su muerte.

En los estudios postmortem de los animales se lograron determinar varias causas de muerte. La figura 18, muestra el pulmón de uno de los ratones en el

que se observa la acumulación de agua y sangre debido a una posible insuficiencia cardiaca del animal, la cual se caracteriza por el aumento de la presión en las venas pulmonares provocando una congestión respiratoria derivada de la acción del cloruro de metileno dentro del organismo.



Figura 18. Pulmón de ratón luego de la administración de cloruro de metileno.

La piel presentó edemas ventrales, los cuales se caracterizan por la acumulación o retención de líquido en los tejidos (figura 19).

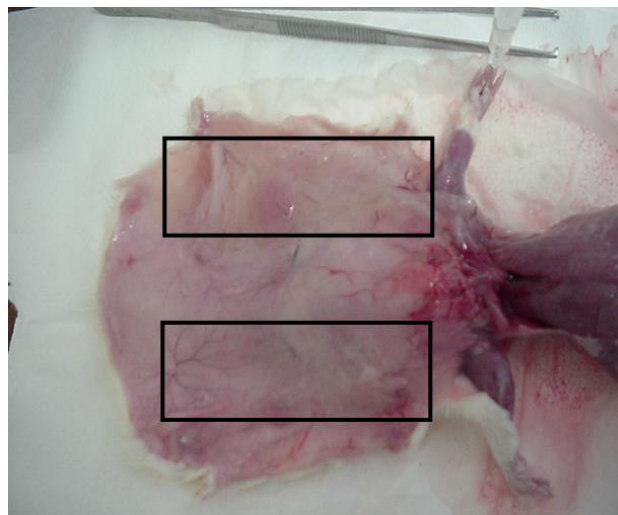


Figura 19. Piel de ratón luego de la administración de cloruro de metileno.

Los animales también mostraron la presencia de edemas cerebrales (figura 20), provocados por la alta permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la gran acumulación de líquidos posiblemente provocada por una hipoosmolaridad plasmática.

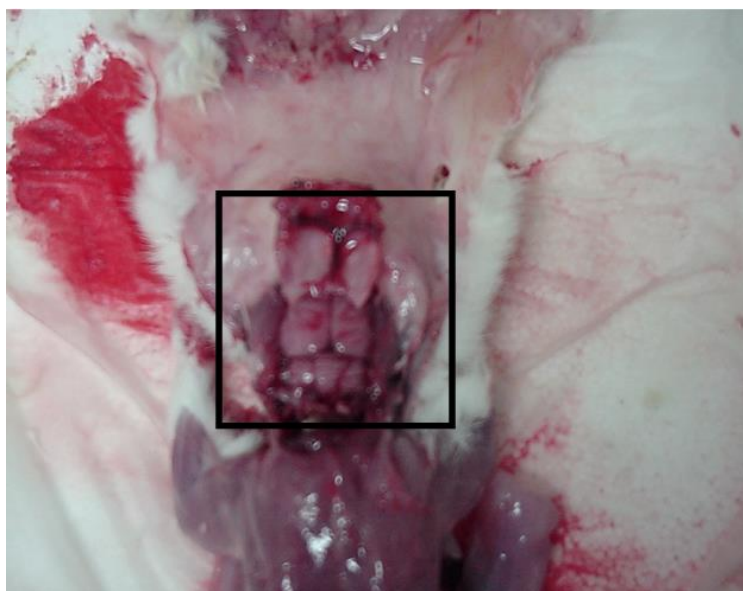


Figura 20. Edema cerebral de ratón administrado con cloruro de metileno.

En la figura 21 se observa la vista del lomo dañado de los animales tratados por inyección subcutánea. Debido a la diferencia de concentraciones aplicadas a estos animales, se observó una necrosis alrededor del punto de aplicación, a este tejido que se le realizaron estudios de histología.



Figura 21. Lomo de ratón luego de la aplicación de cloruro de metileno.

La figura 22 demuestra el daño que el cloruro de metileno provoca en los tejidos de la piel a altas concentraciones; concentraciones que las microemulsiones no poseen en los ensayos realizados. En la figura 22A, se observa una zona de tejido del lomo de un animal que no fue administrado con cloruro de metileno, en el cual se aprecia el tejido completo en sus tres capas, mientras que para la figura 22B se observa una parte del tejido dañada por la acción del cloruro de metileno.

Si bien es sabida la toxicidad del cloruro de metileno según la guía ICH Q3C de la FDA⁴⁶⁴⁶, este ensayo nos permite corroborar esa toxicidad.

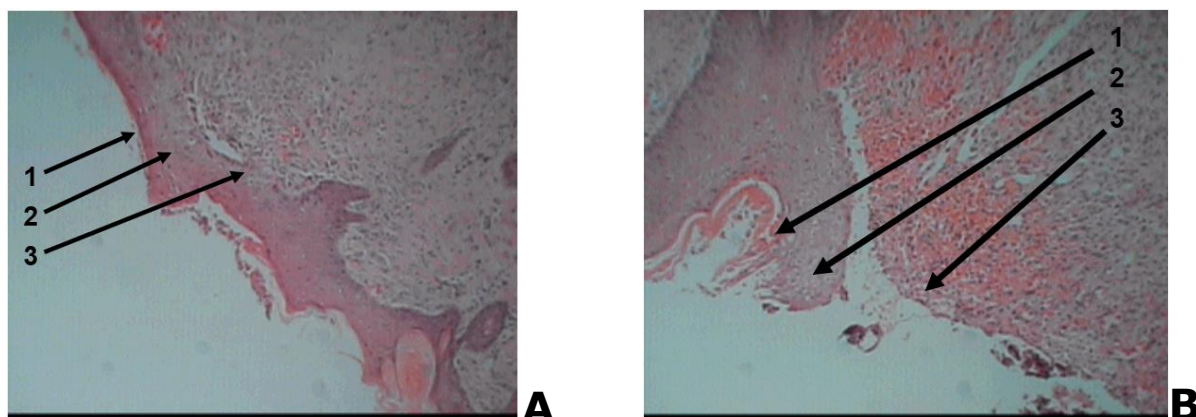


Figura 22. Histología de piel. A: tejido de piel sano; B: tejido de piel dañado por acción del cloruro de metileno. Los números corresponden a 1: epidermis; 2: dermis; 3: hipodermis.

b) Ensayos con microemulsiones.

Después de la administración de una microemulsión a los animales de laboratorio, no se observaron modificaciones en su comportamiento, temperatura fisiológica, y sensibilidad al sonido. Durante las primeras horas se observó un comportamiento normal el cual perduró hasta la culminación del experimento.

En la figura 23 no se observa alteración alguna sobre el tejido del animal después de la administración de la microemulsión. Cabe mencionar que, la microemulsión fue escogida de una zona conocida dentro del diagrama de fases, la única diferencia es que no se encontraba cargada con el fármaco.



Figura 23. Fotografía de los animales de laboratorio administrados con una microemulsión.

Durante la aplicación de la necropsia no se apreciaron daños a nivel de tejido, así como, rastros de lesión en órganos como el hígado, pulmones o cerebro. Esta

observación concuerda con las observaciones de Mohammad Changez quien al analizar la toxicidad tras la administración subcutánea de una formulación de microemulsión de lecitina en ratas de una cepa Wistar, observó que esta no daña epidermis, dermis y estrato corneo del tejido del animal.⁴⁹

6.2 Obtención de microemulsiones aceite/agua (O/W) de un sistema CH₂Cl₂ / H₂O /brij97+isopropanol (en proporción 1:2).

a) Diagrama de fases pseudoternario

La elaboración del diagrama de fases se obtuvo de la inspección visual de las preparaciones de cloruro de metileno y la mezcla de Brij 97® / isopropanol, tituladas con agua destilada y filtradas por una membrana de 0.02 µm Anatop Whatman® así como lo menciona Johan Reimer al describir el diagrama de fases del sistema agua/n-octano/octil-β-D-glucosido/l-octanol. Se interpreta como microemulsión a la mezcla homogénea que después de la adición de agua y agitación, permanece transparente a lo largo del tiempo.⁵⁰

En un inicio, todas las mezclas (compuestas únicamente de cloruro de metileno y tensoactivos) son transparentes. Al principio, el agua tiene la función de fase interna puesto que se encuentra en menor proporción respecto a los demás componentes y la mezcla de tensoactivos/cloruro de metileno funciona como la fase externa, esto se modificará al ir aumentando el volumen de agua. Conforme se va añadiendo agua las mezclas empiezan a presentar cambios en su apariencia debido al reordenamiento de las micelas de tensoactivo y al cambio de fase. Es importante mencionar que en este ensayo se trabajó por encima de la CMC del Brij 97® reportada en la literatura con un valor de 0.029 % (w/v).

El diagrama de fases pseudoternario generado (figura 25) muestra la distribución de las zonas de interés encontrando que una proporción muy pequeña dentro del diagrama corresponde a zonas de microemulsiones.

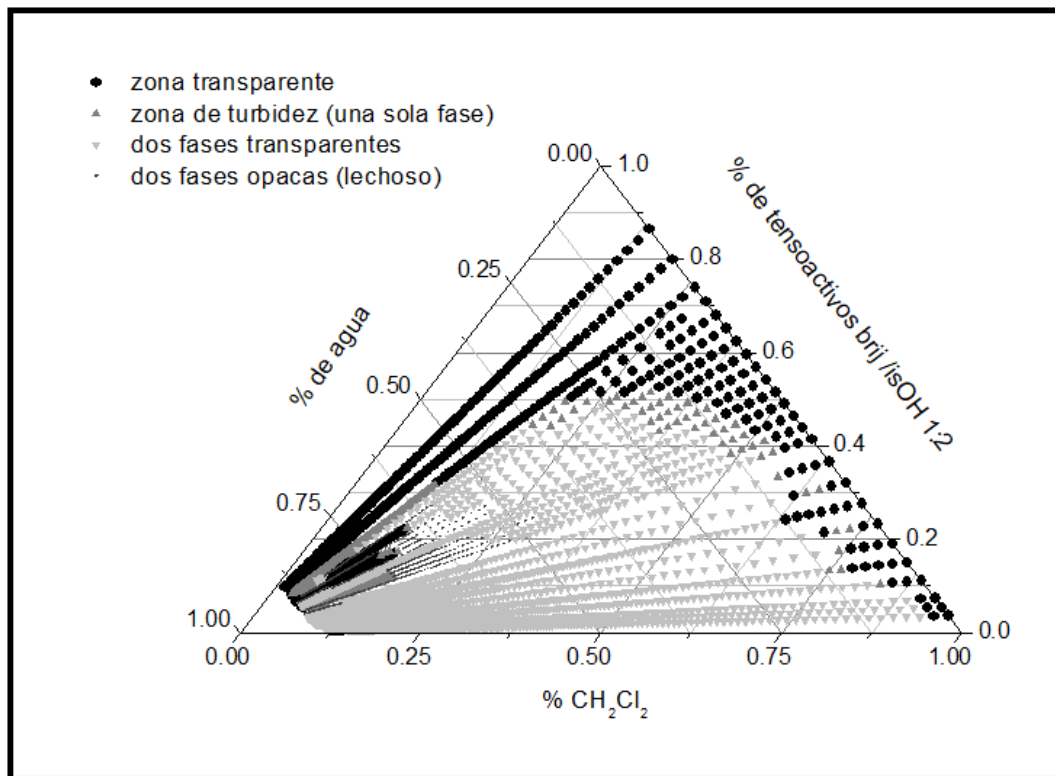


Figura 25. Diagrama de fases derivado de la inspección visual.

Se observa que se tienen diferentes tipos de comportamiento de fases. Sin embargo, las de interés en este trabajo son las mezclas transparentes, característica que indica la presencia de microemulsiones

Al ver la complejidad del diagrama, se buscó asegurar reproducibilidad en el comportamiento de este, por lo que, se elaboraron 30 mezclas con diferentes composiciones y se observaron a diferentes tiempos con la finalidad de asegurar tiempos de equilibrio, de esta prueba se derivó el diagrama presentado en la figura 26.

En el diagrama de fases se puede observar cómo influyen las proporciones de los componentes en la formación de las zonas de microemulsión, la zona oscura marca las zonas en las que la preparación se mantiene transparente (zonas de microemulsión tanto W/O como O/W). La tendencia es que, a mayor proporción de la mezcla de tensoactivos, se extiende más la formación de microemulsiones estables, ya que estas no se rompen con la adición de agua.

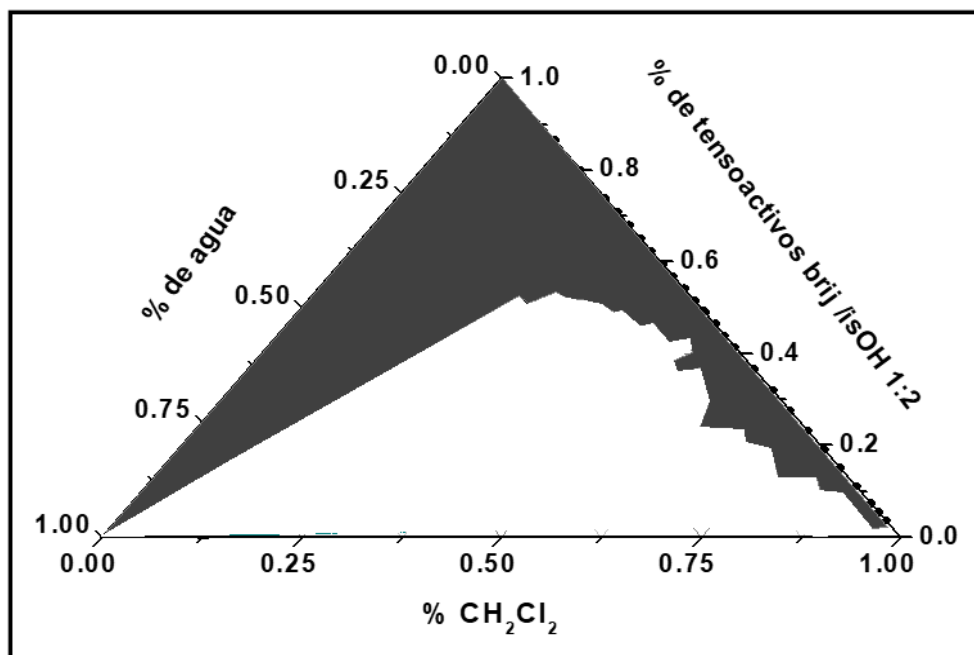


Figura 26. Diagrama de fases ordenado después de la inspección visual.

6.3 Inversión de fases en las microemulsiones

6.3.1 Estudios de tamaño de gota

Para la caracterización de la zona de microemulsión además de, la inspección visual, se utilizaron técnicas como la determinación de inversión de fases mediante la medición de tamaño de partícula por dispersión de luz y cambio en la conductividad de la preparación, tal y como lo menciona R.C. Baker al caracterizar microemulsiones del tipo Agua/Xileno/Sulfonato alquilbenceno de sodio.⁵¹

Las muestras preparadas para la corroboración del diagrama de fases (tabla 9) fueron sometidas a la medición del tamaño de partícula y conductividad para con esto discernir en que zonas del diagrama las microemulsiones son de naturaleza W/O o de naturaleza O/W a lo largo de una misma línea en el diagrama de fases; esto se puede ver cuando ocurre un cambio abrupto en la pendiente al ser graficadas estas propiedades contra la fracción de agua. En los siguientes gráficos mostrados en las figuras 28-33 se muestra la distribución del tamaño de partícula para una muestra con un porcentaje inicial de cloruro de metileno del 10% y 90% de la mezcla de tensoactivos.

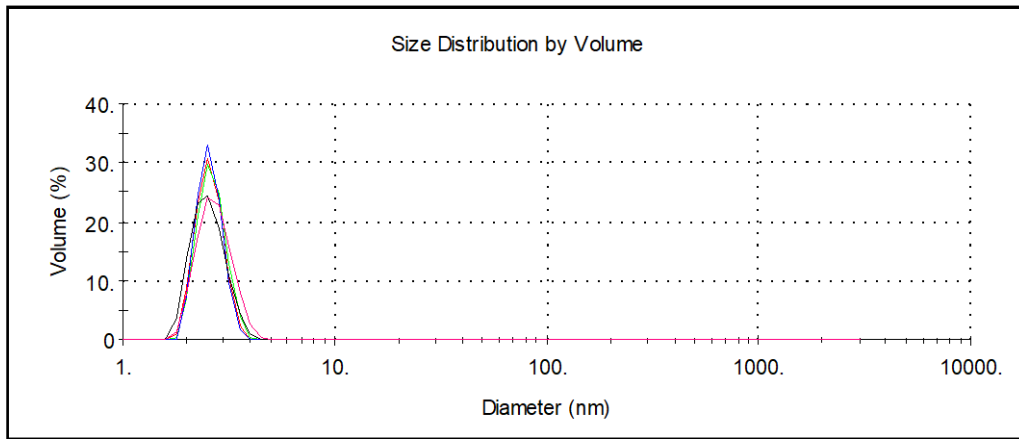


Figura 27. Tamaño de partícula del punto 1 del diagrama de fases (Tabla 9).
Composición: 9 % de agua, 9% CH₂Cl₂ y 82% tensoactivo (1:2).

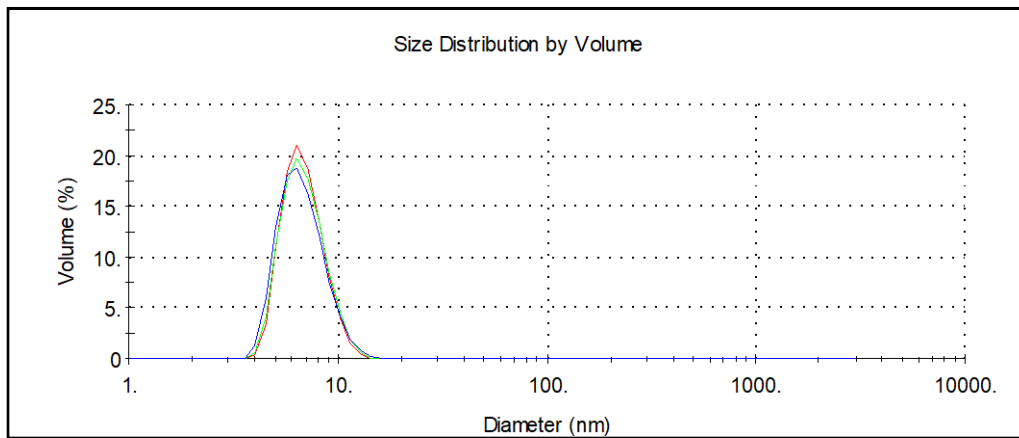


Figura 28. Tamaño de partícula del punto 2 del diagrama de fases (Tabla 9).
Composición: 34 % de agua, 7% CH₂Cl₂ y 59% tensoactivo (1:2).

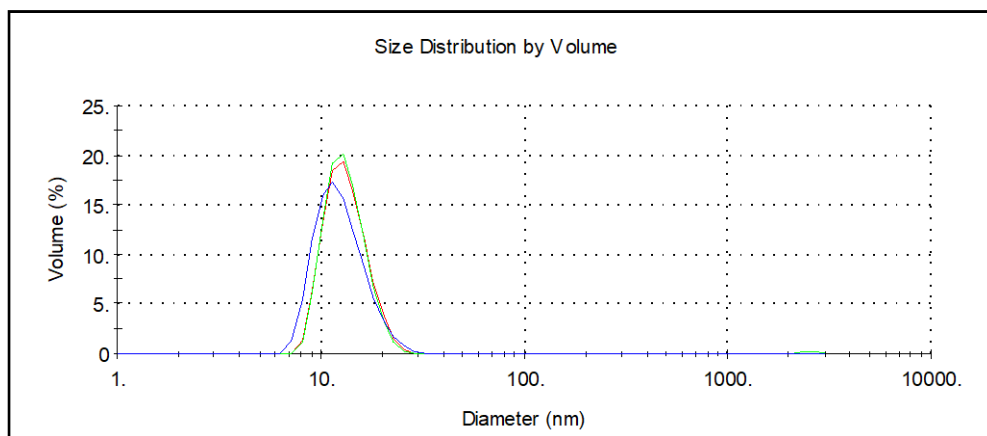


Figura 29. Tamaño de partícula del punto 3 del diagrama de fases (Tabla 9).
Composición: 51 % de agua, 5% CH₂Cl₂ y 44% tensoactivo (1:2).

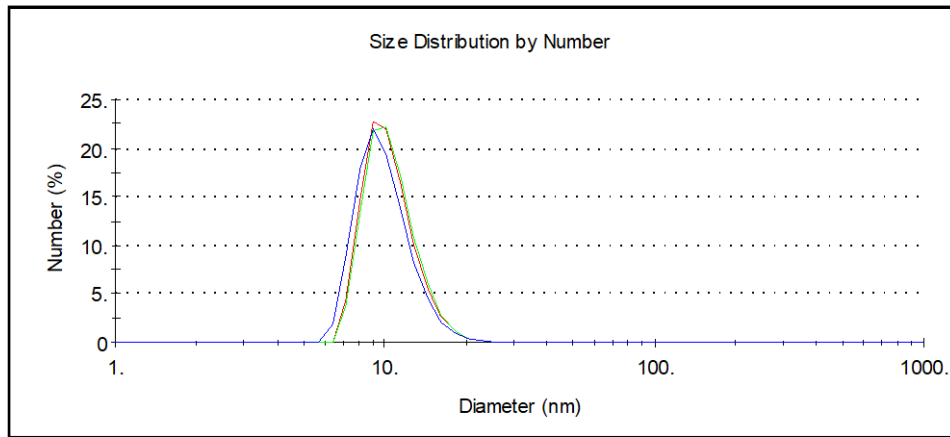


Figura 30. Tamaño de partícula del punto 4 del diagrama de fases (Tabla 9).
Composición: 67 % de agua, 3% CH₂Cl₂ y 29% tensoactivo (1:2).

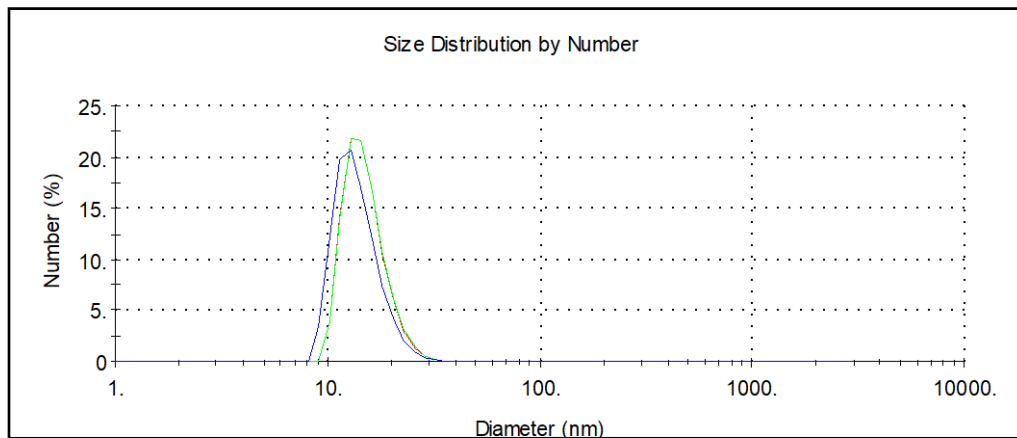


Figura 31. Tamaño de partícula del punto 4 del diagrama de fases (Tabla 9).
Composición: 76 % de agua, 2% CH₂Cl₂ y 22% tensoactivo (1:2).

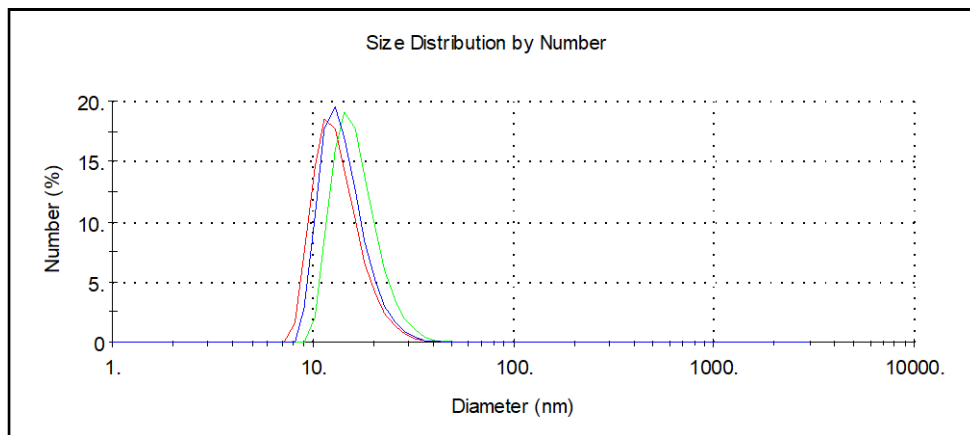


Figura 32. Tamaño de partícula del punto 4 del diagrama de fases (Tabla 9).
Composición: 86 % de agua, 1% CH₂Cl₂ y 12% tensoactivo (1:2).

En las distribuciones de tamaño de partícula (figuras 27-32) se observa que el tamaño de partícula incrementa conforme aumenta el volumen de agua en el sistema. Los datos obtenidos por separado no dicen mucho acerca de la naturaleza

de la microemulsión, pero si se relaciona el promedio de cada medición con el porcentaje de agua presente en el sistema, graficando en el eje de las ordenadas el tamaño de partícula y en las abscisas el porcentaje de agua, se obtiene el gráfico mostrado en la figura 33.

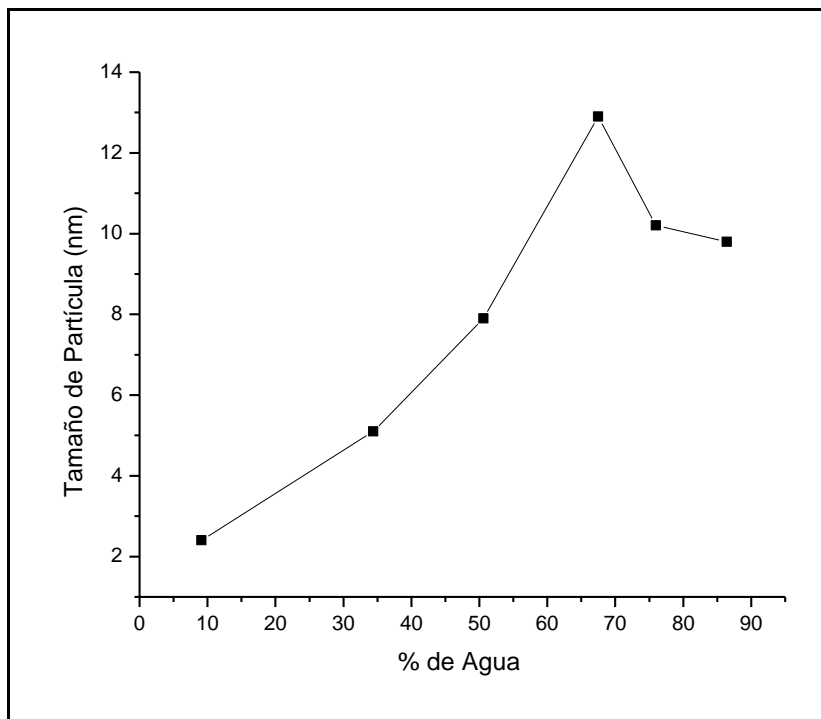


Figura 33. Diagrama de inversión de fases por tamaño de partícula obtenido de la línea inicial de 10% cloruro de metileno y 90% de la mezcla de tensoactivos.

El gráfico obtenido ahora indica la naturaleza de las microemulsiones dentro de esa línea (10% cloruro de metileno y 90% de la mezcla de tensoactivos inicial); el cambio en la pendiente sugiere que las microemulsiones que tienen un volumen de agua menor al 65 % son de naturaleza w/o; en cambio, las microemulsiones que poseen un volumen mayor a este 65 % ciertamente serán de naturaleza o/w. Esto es porque se parte de una mezcla en la que la fase interna es agua, por lo que se encontrará en el interior de las micelas que se forman; pero cuando la fase interna cambia a fase externa por el aumento en el volumen de agua, los glóbulos (micelas engordadas) que están presentes en el sistema, ahora contienen al cloruro de metileno dentro como su fase interna, provocando el cambio en el tamaño de partícula. Conforme se incrementa el volumen de la fase interna el tamaño de la gota va aumentando hasta llegar a un punto máximo que se identifica como el punto de inversión de fases. A partir de este, disminuye el tamaño del glóbulo debido a la reestructuración de la fase discontinua que ahora es

diclorometano; el menor radio obedece a una organización del sistema para aumentar su estabilidad cinética

Para el caso de las microemulsiones que contienen 75% de la mezcla de Tensoactivos y 25% de cloruro de metileno inicial, presentan dos fases casi desde el inicio de la valoración, por lo que no hay presencia de microemulsiones a lo largo de toda la línea, así que no se puede estudiar en que punto de la línea se da la inversión de fases, ya que no se puede determinar el tamaño de partícula para esta mezcla (figuras 34-36). Además, se corrobora que no hay formación de microemulsiones en este punto debido a que el sistema en un determinado volumen agregado de agua no es estable en consecuencia, la mezcla se torna en dos fases.

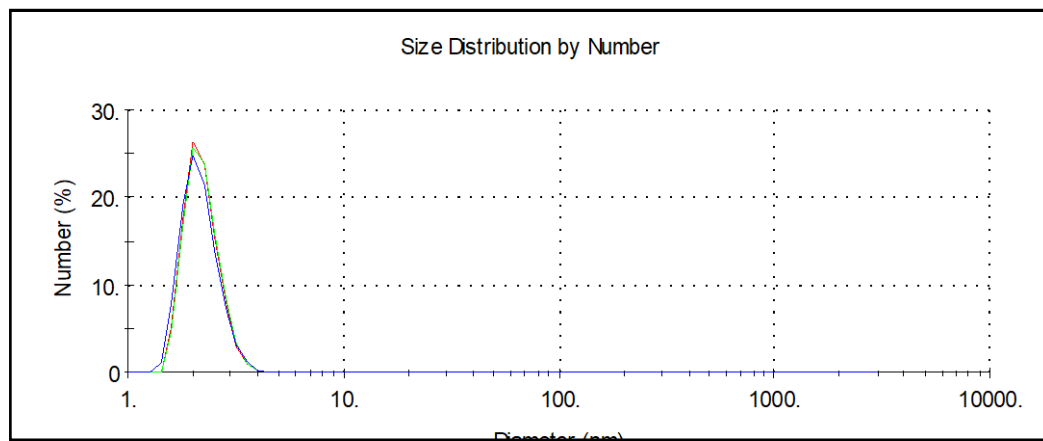


Figura 34. Tamaño de partícula del punto 7 del diagrama de fases (tabla 9). Composición: 9 % de agua, 23% CH₂Cl₂ y 68% tensoactivo (1:2).

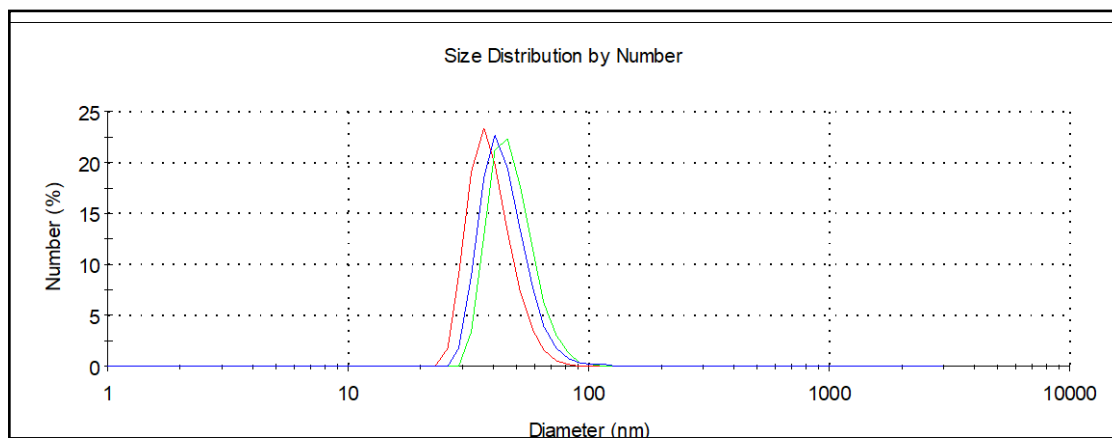


Figura 35. Tamaño de partícula del punto 11 del diagrama de fases (tabla 9). Composición: 86 % de agua, 4% CH₂Cl₂ y 11% tensoactivo (1:2).

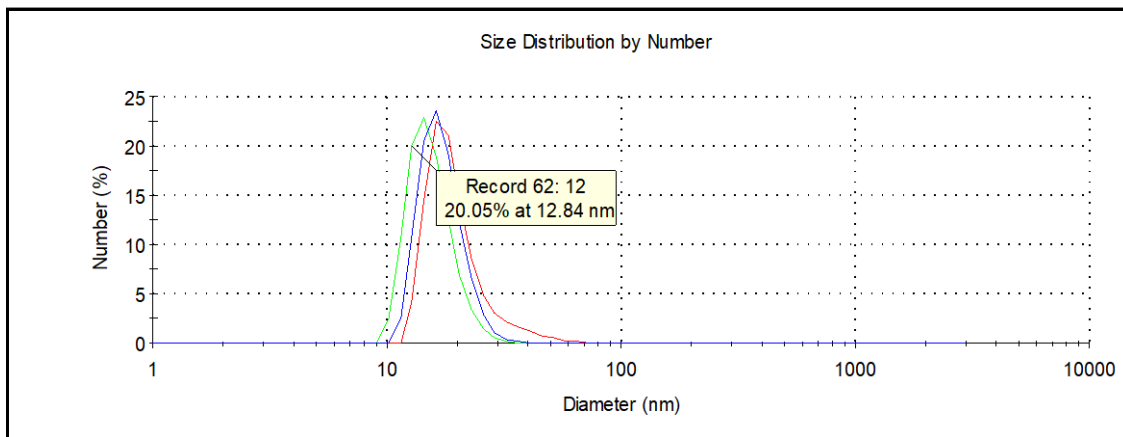


Figura 36. Tamaño de partícula del punto 12 del diagrama de fases (tabla 9).
Composición: 87 % de agua, 3% CH₂Cl₂ y 10% tensoactivo (1:2).

Para este caso solo se pudieron hacer tres medidas de las seis posibles, dejando indeterminado el estudio de inversión de fases, como se muestra en la figura 37.

Cabe mencionar que para mezclas iniciales con porcentajes mayores a 20 % de cloruro de metileno, la interpretación de la inversión de fases no está definida ya que el sistema se torna inestable y no hay formación de microemulsiones.

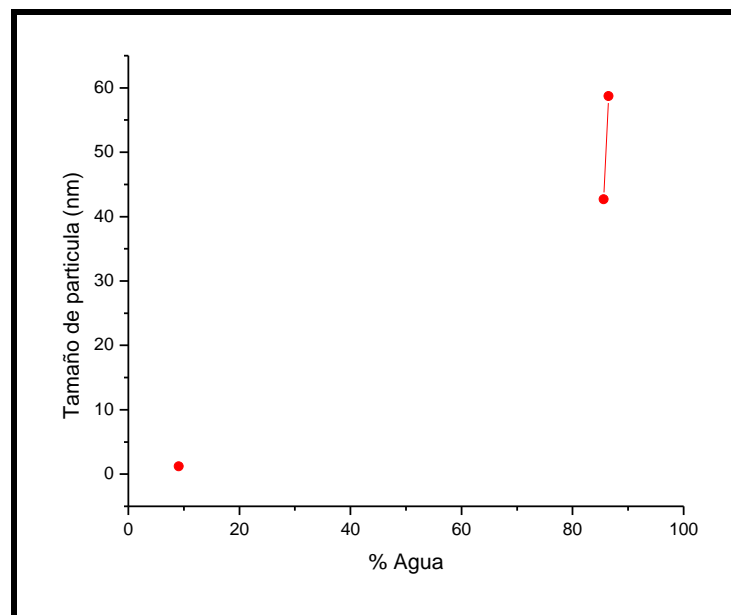


Figura 37. Diagrama de inversión de fases obtenido de la línea inicial de 25% cloruro de metileno y 75% de la mezcla de tensoactivos.

Para los estudios de liberación se volvieron a caracterizar las líneas de trabajo 1 y 2 para estar certeros de que las características no cambian y los procedimientos

son reproducibles. Nuevamente se tienen graficas de inversión de fases por tamaño de partícula quedando como la figura 37.

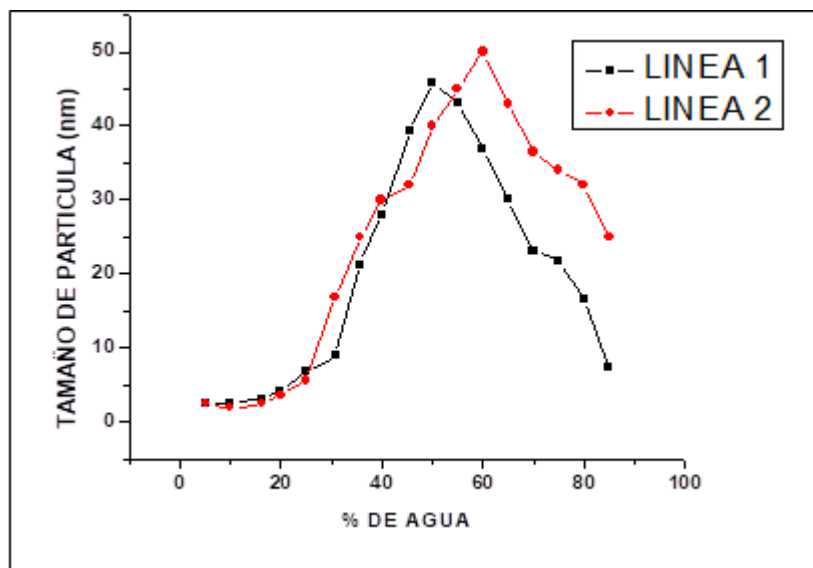


Figura 38. Diagrama de inversión de fases por determinación de tamaño de partícula para las líneas 1 y 2.

El gráfico presentado en la figura 39, muestra la inversión de fases de las dos líneas de investigación en la cual se corrobora que la inversión de las fases se da en valores mayores al 50% de agua en el sistema por lo que se confirma que se está trabajando con microemulsiones de naturaleza o/w.

6.3.2 Conductividad

Para los ensayos de conductividad se utilizaron las mismas preparaciones del ensayo anterior. En el caso de las preparaciones de mezcla inicial 10 % cloruro de metileno y 90 % de la mezcla de tensoactivos se determinó el punto de inversión (figura 39); caso contrario para las preparaciones que contenían un volumen inicial de cloruro de metileno mayor al 25%. y para corroborar se caracterizaron las líneas 1 y 2.

Las medidas de conductividad se obtuvieron del Nanosizer de Malvern Instruments modelo ZE3200 en su modalidad de conductividad de una disolución, el tratamiento de los datos se realizó en Origin 6.0[®] obteniendo la siguiente gráfica.

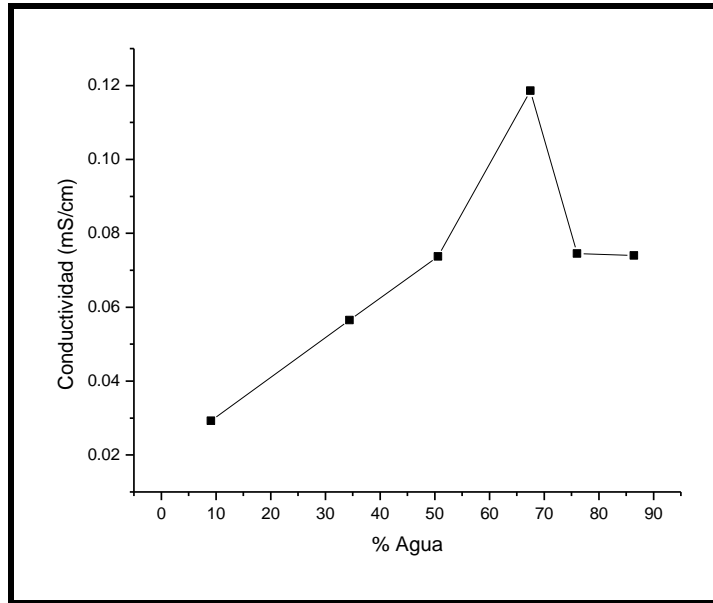


Figura 39. Diagrama de inversión de fases por conductividad obtenido de la línea inicial de 10% cloruro de metileno y 90% de la mezcla de tensoactivos.

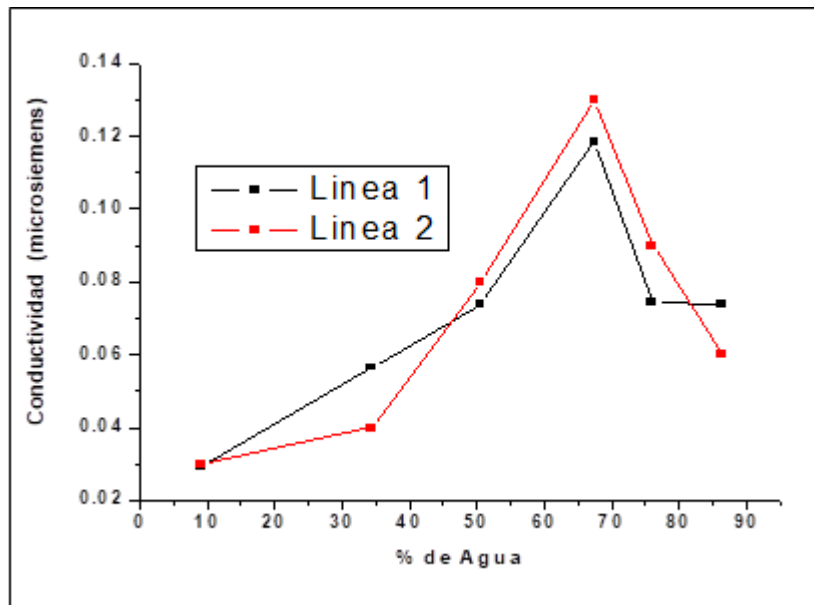


Figura 40. Corroboración del diagrama de conductividad. Composición: Línea 1, 10% CH₂Cl₂ y 90 % inicial de Brij 97®/isOH 1:2y. Línea 2, 15% CH₂Cl₂ y 85% inicial de Brij 97®/isOH 1:2.

Y aplicando el ensayo para resistencia de las microemulsiones para elucidar la inversión de fases por la medición de la resistencia, obtenemos un cambio de pendiente dentro del tratamiento de los datos. El cual indica que el cambio en las pendientes es el punto de inversión de fases (figura 40).

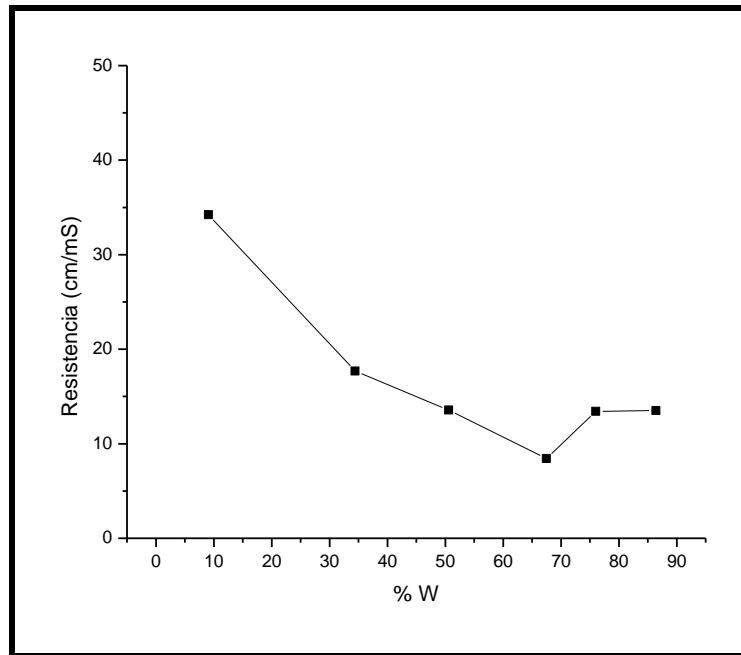


Figura 41. Gráfico de resistencia de las microemulsiones con 10% inicial de cloruro de metileno.

En la figura 41, se muestra el cambio de pendientes elucidando la inversión de fases cerca del 65-70% de agua.

Para corroborar lo anterior en el punto de inversión de fases, se midió la conductividad de la microemulsión de la proporción anterior, pero con cloruro de sodio 0.01% obteniendo el siguiente gráfico (figura 42).

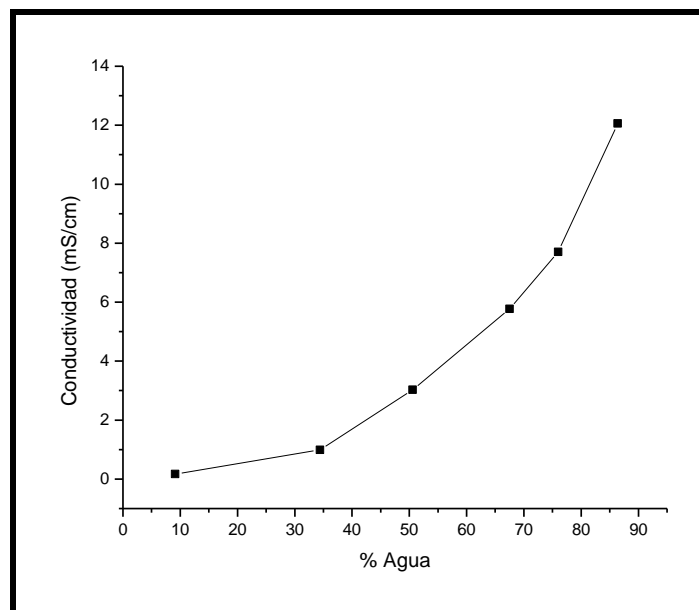


Figura 42. Gráfico de conductividad de la línea de 10% de cloruro de metileno inicial con cloruro de sodio.

En el gráfico de la figura 42 se muestra que, a mayor volumen de agua añadida la conductividad crece dado que las cargas presentes en el medio son cada vez más y se encuentran en un principio dentro de la micela como fase interna pero no siempre es así. Conforme aumenta el volumen de agua, la carga ahora esta en el medio en forma libre o disuelta y el cambio de la pendiente indica la inversión de fases ya que ahora el agua forma la fase externa de la microemulsión.

6.4 Ensayos de solubilidad de la enrofloxacin

Los ensayos de solubilidad de la enrofloxacin en cloruro de metileno se dado que no se encuentra reportada en la literatura la cantidad exacta o aproximada de enrofloxacin que puede ser disuelta en este disolvente y así conocer la cantidad máxima de activo que se puede disolver en las microemulsiones.

La siguiente tabla muestra los ensayos que se realizaron para la determinación de este valor.

Tabla 13. Determinación de la cantidad máxima de enrofloxacin disuelta de CH₂Cl₂.

Muestra	Volumen utilizado de CH ₂ Cl ₂ (μl)	Cantidad de enrofloxacin (mg)	Cantidad de enrofloxacin en mg solubilizada por ml de CH ₂ Cl ₂
1	2400	502.2	209.25
2	4600	1003.3	209.10
3	2400	509.1	212.12
4	3800	1011	266.21
Promedio			224.17

6.5 Evaluación de la capacidad de incorporación del principio activo en la microemulsión.

Se prepararon las microemulsiones con la composición descrita en la tabla 12, donde para la línea 1 le corresponden los puntos A, B y C y para la línea 2 los puntos D, E y F. A cada una de estas microemulsiones se les adicionó una cantidad diferente de enrofloxacin con el propósito de evidenciar la capacidad de incorporación de activo de la microemulsión. Para cada serie se encontró que no todas las microemulsiones soportan cantidades altas de enrofloxacin; esto se debe a que al adicionar el fármaco disuelto en cloruro de metileno por su carácter hidrofóbico desestabiliza la microemulsión ya que las proporciones de tensoactivo

no pueden generar los glóbulos pequeños y en consecuencia mantener una preparación transparente; incluso a veces se formaron dos fases haciendo evidente la pérdida de la microemulsión la cual es debido a que la cantidad de tensoactivo y cotensoactivo presente no es suficiente para disminuir la tensión interfacial para este sistema.

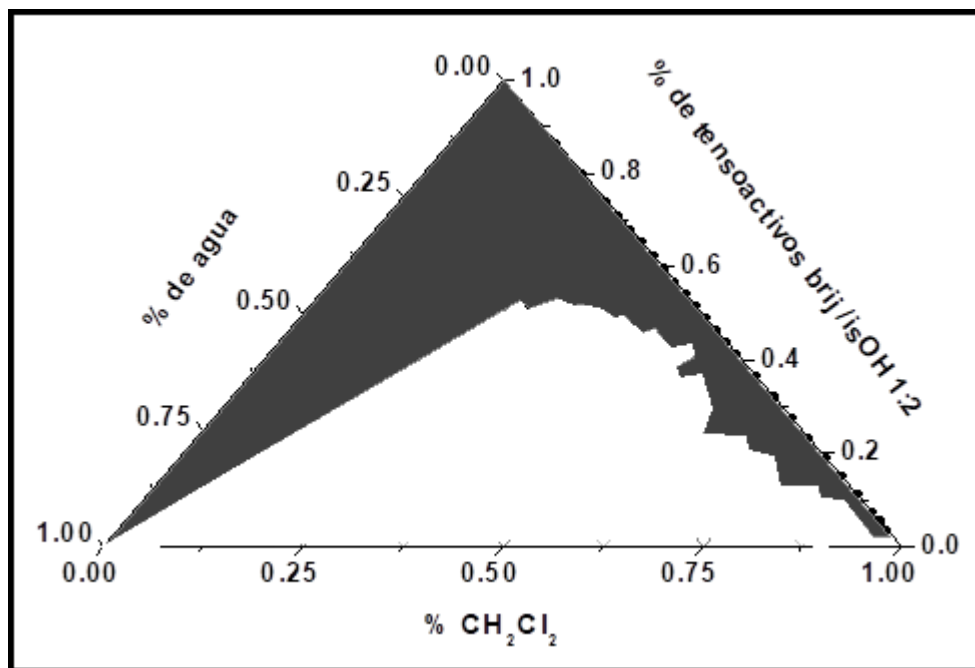


Figura 43. Zona de trabajo para la liberación; dentro del círculo están contenidas las líneas de trabajo 1 y 2 las cuales tienen composición inicial de CH₂Cl₂ del 10 y 15% y del 90 y 85% de la mezcla de tensoactivos respectivamente.

En la serie de imágenes de las figuras 44, 45 y 46, las microemulsiones con la nomenclatura A1, B1, C1, D1, y F1 no contienen enrofloxacin, son transparentes y confirman la formación de la microemulsión, en la microemulsiones nombradas con el sufijo 2 al 5, se presenta el efecto de la incorporación del sólido en diferentes concentraciones, donde podemos observar que para las microemulsiones, a medida que aumenta la cantidad de enrofloxacin en el sistema, éstas cambian de apariencia y, pasan de ser preparaciones transparentes a preparaciones turbias en algunos casos y en otros la pérdida ya mencionada de la microemulsión.



Figura 44. Imagen de las microemulsiones de la línea 1 en donde A1 corresponde al blanco de la serie al no contener al activo en la preparación, A2 y A3 aparentan tener estabilidad física ya teniendo en su interior al activo, a la derecha se observa la muestra A5 la cual se presenta turbia ya que la cantidad de activo en su interior es alta.

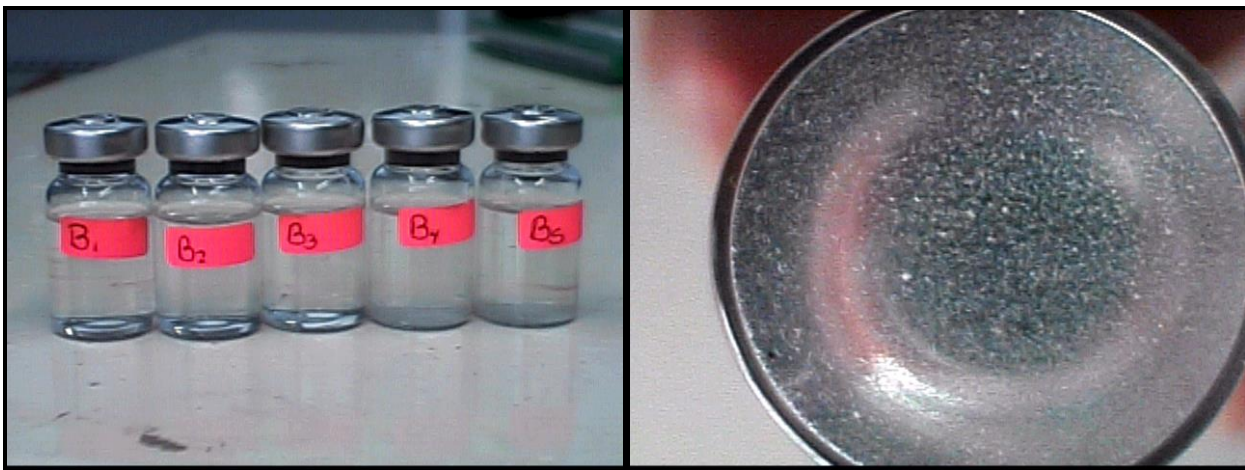


Figura 45. De la misma manera estas imágenes corresponden a la línea 1 en el punto B, aparentemente no se ve reflejado cambio alguno, pero en la imagen de la derecha se observa como el activo se deposita en el interior del frasco.



Figura 46. Esta imagen corresponde al punto C de la línea 1 en donde se puede observar que desde la muestra C3 la apariencia de las preparaciones es muy opaca, las cuales después de un tiempo se observa que el activo se precipita al fondo del frasco, aparentemente la muestra C2 está demasiado opaca pero no muestra depósito de activo en el frasco.

La tendencia en estas preparaciones es que a menor porcentaje de la mezcla de tensoactivo:cotensoactivo, la formación de la microemulsión es cada vez menos favorable. Caso semejante son las observaciones en la línea 2 (D, E, y F).

De estas observaciones queda claro que las microemulsiones que son candidatas para los ensayos de liberación in vitro corresponden a las preparaciones que se mantuvieron transparentes y con fármaco disuelto. Tales preparaciones se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Microemulsiones con enrofloxacin con estabilidad física, proporciones y cantidad de activo disuelto.

PUNTOS DE LIBERACIÓN					
Composición de las microemulsiones					
	Punto	% Cloruro de metileno	% Tensoactivo-cotensoactivo	% Agua	Cantidad de enrofloxacin mg/ml
Línea 1	A3	3.45	31.03	65.52	1.29
	B2	2.94	26.47	70.59	0.73
	C2	2.5	22.5	75	0.625
Línea 2	D2	5.2	29.3	65.5	1.29
	E2	4.4	25	70.6	1.1
	F2	3.75	21.25	75	0.93

Después de retar a las microemulsiones de las líneas de trabajo 1 y 2, a los puntos de la tabla 14, los cuales cumplen con las características de ser físicamente estables y contener una fase acuosa mayor al 50%, se les midió tamaño de

partícula con y sin principio activo, reflejándose una variación en el tamaño de gota con la incorporación del activo (Tabla 15).

Tabla 15. Tamaño de partícula con y sin enrofloxacin de las distintas muestras a probar en la liberación.

PUNTOS DE LIBERACIÓN						
Composición de las microemulsiones						
Punto	% Cloruro de metileno	% Tensoactivo-cotensoactivo	% Agua	Tamaño de partícula sin enrofloxacin (nm)	Tamaño de partícula con enrofloxacin (nm)	Cantidad de enrofloxacin mg/ml
A3	3.45	31.03	65.52	19	21.9	1.29
D2	5.2	29.3	65.5	46	38.3	1.29
B2	2.94	26.47	70.59	21	95.6	0.73
E2	4.4	25	70.6	36.5	29.1	1.1
C2	2.5	22.5	75	20	44.8	0.625
F2	3.75	21.25	75	34	42.5	0.93

De acuerdo con los resultados de la tabla 15, el tamaño de la gota en las diferentes microemulsiones tiene una variación del estado vacío a cuando se ha incorporado el principio activo. Para los sistemas A2 y D2 que en su composición hay un ligero decremento en la cantidad de tensoactivo-cotensoactivo presente la capacidad de incorporación de enrofloxacin es similar, pero el comportamiento en el tamaño de gota difiere, observando que para D2 al adicionar principio activo el tamaño de gota disminuye, esto puede ser debido a que se da una reestructuración del sistema al tener un quinto componente para conservar la estabilidad., en este caso una disminución del área de la gota a diferencia que A2 que hay un incremento en el tamaño de gota.

6.6 Liberación para las líneas

Los ensayos de liberación se realizaron a partir de las microemulsiones mencionadas en la tabla 14.

Cada una de las mediciones de absorbancia de las muestras obtenidas por el proceso de espectroscopia de ultravioleta y transformada esta absorbancia a concentración por conversión con la curva de calibración y la concentración a masa por los valores de volumen, se concentró en el siguiente gráfico para el cual se determinó las cantidades de enrofloxacin liberada de las microemulsiones más estables.

Los resultados de la liberación de obtenidos se muestran en la siguiente grafica en la cual se observan las tendencias de cada una de las microemulsiones.

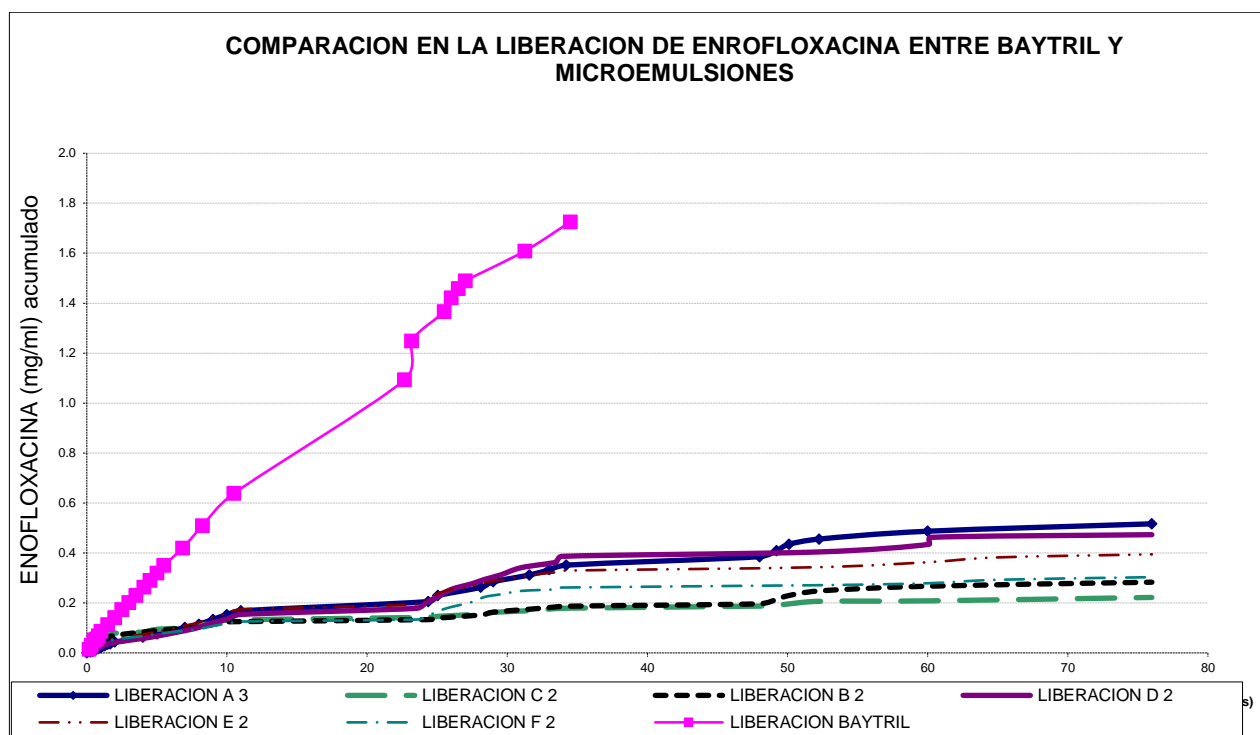


Figura 47. Cinética de liberación de las microemulsiones, estudiadas en celdas de difusión de Franz.

La liberación del principio activo en cada una de estas microemulsiones notoriamente es diferente. En el análisis de la figura 47 tenemos que relacionar un poco lo que ha sido el tamaño de partícula de estas preparaciones y las proporciones de los componentes. La primera comparación es entre las microemulsiones de la misma línea tal es el caso de A3, B2 y C2. en donde se observa que existe un aumento del tamaño de partícula cuando se incorpora a estas microemulsiones la enrofloxacin. Además, cabe mencionar que de estas tres muestras la microemulsión A3 contiene disuelta 1.29 mg de enrofloxacin por cada mililitro de la microemulsión, a diferencia de B2 y C2 las cuales solo soportan en su interior a 0.73 y 0.625 mg de enrofloxacin por mililitro respectivamente. Otra de las diferencias es que la muestra A3 libera mayor cantidad de enrofloxacin al paso de las 72 horas, esto se debe principalmente a que tiene mayor cantidad de esta; y por lo que se puede observar en las fotografías de las muestras, la muestra A3 es más estable a pesar de que solo contiene 65 % de agua en comparación de B2 y C2 las cuales tienen 70 y 75% de agua respectivamente.

En el caso de la línea 2 la comparación se da entre las muestras D2, E2 y F2 en las que también existe un aumento en el tamaño de partícula cuando se les añade en principio activo. Entre estas tres muestras también existe la diferencia en la cantidad de enrofloxacin solubilizada ya que la muestra D2, soporta hasta 1.29 mg de enrofloxacin por cada mililitro y E2 y F2 soportan 1.1 y 0.93 mg de este activo por cada mililitro.

De acuerdo con estos resultados, y debido a las proporciones de los componentes, las muestras que podríamos contemplar como buenos sistemas serian A3, D2, E2, y F2. pero al dejarlas en reposo durante unos días, las muestras E2 y F2, presentaron cristalización del principio activo y en consecuencia precipitación lo cual explica que no puedan ser consideradas.

Las observaciones posteriores de las muestras A3 y D2 mostraron diferencias en estabilidad ya que después de unas semanas de observación se pudo observar que en la muestra se comenzó a cristalizar el principio activo el cual se depositó en el interior del frasco. La explicación que le damos es que a pesar de solubilizar en su interior la misma cantidad de enrofloxacin que la muestra A3 esta muestra contiene menor cantidad de la mezcla de tensoactivos, lo cual provocara que sea un poco menos estable que la muestra A3.

Haciendo una observación más a este análisis, y considerando la cantidad de enrofloxacin solubilizada en cloruro de metileno que es de 224.17 mg /mL tenemos que en la muestra A3 se solubilizó en un volumen de 100 μ L un 5.7% respecto al parámetro antes mencionado, para la muestra B2 se solubilizó el 3.3% y aun así no fue estable, lo mismo sucedió para la muestra C2 la cual solo solubilizó el 2.8 % de la enrofloxacin en el volumen de cloruro de metileno dentro de la microemulsión. Para el caso de la línea 2, la muestra D2 solubilizó la misma cantidad que la muestra A3 pero en términos porcentuales se quedó con un 3.8% ya que esta microemulsión contenía un volumen mayor de cloruro de metileno dentro de la microemulsión (150 μ L) mismo volumen que se tenía en las muestras E2 y F2 las cuales solubilizaron el 3.3 y el 2.8% respectivamente pero aun así presentaron precipitación del principio activo.

Es por todo esto que la microemulsión que tiene las mejores características hasta ahora observada es la A3, la cual presenta estabilidad y solubiliza la mayor cantidad de enrofloxacin de todas las muestras que se analizaron. Está claro que el porcentaje de enrofloxacin solubilizada en la microemulsión comparada con la solubilidad máxima registrada en cloruro de metileno sola es muy baja, pero también se tienen que considerar que ahora el principio activo y el cloruro de metileno tienen que interactuar con el medio que los circunda, (tensoactivos y agua) y con toda razón esto disminuye la solubilidad de la enrofloxacin en el cloruro de metileno.

A pesar de lo anterior, lo más importante es comparar la liberación de las microemulsiones contra una forma farmacéutica que se encuentra en el mercado. Para esto se realizó también la liberación de una muestra de Baytril® de Bayer veterinaria y se comparó contra la liberación de las muestras de microemulsión.

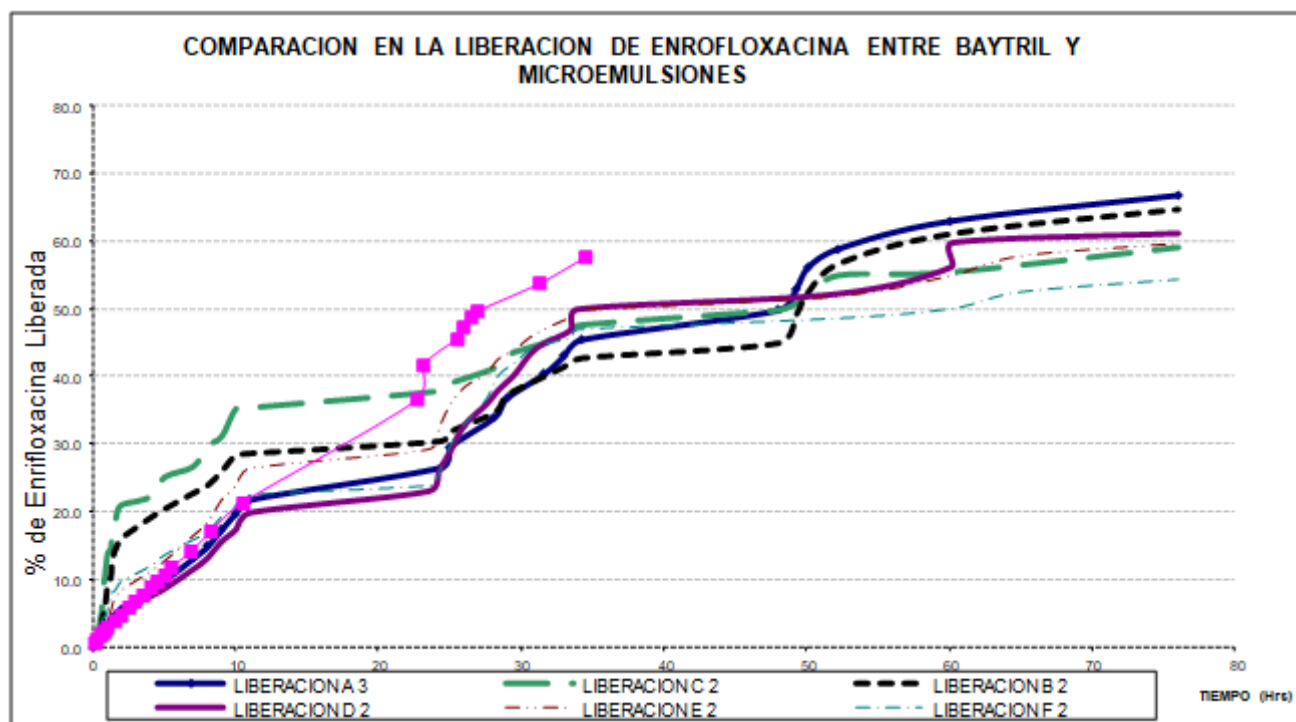


Figura 47. Comparación de la liberación del Baytril® contra las microemulsiones.

Es realmente notoria la diferencia entre la liberación del Baytril® y las microemulsiones ya que el patrón de liberación de las microemulsiones es modificada y la del Baytril® es una liberación de dosis única la cual se espera que descienda su concentración con forme pasen algunas horas más.

7. Conclusiones

- Las evidencias finales mostradas en cada una de las administraciones de los excipientes que componen una microemulsión del tipo oleoacuosa, muestran que cada uno de los excipientes y la mezcla entre ellos no producen daño al tejido de los animales de laboratorio, salvo el caso del cloruro de metileno, el cual en la administración sola provocó necrosis de tejido y una cianosis generalizada al organismo de los animales de laboratorio. Cabe mencionar que en este caso se trabajaron cantidades mucho muy superiores a las que contiene en realidad la matriz de la microemulsión y en consecuencia es muy probable que se presentaran problemas de este tipo, pero es importante mencionar que el cloruro de metileno en la microemulsión no produce daño alguno como se comentó anteriormente en los resultados. En el caso del Brij 97[®] y el isopropanol, sustancias de las cuales esperábamos obtener reacciones de irritación o degradación del tejido en el punto de aplicación, se presentaron con mínima frecuencia entre los animales administrados con estas sustancias, por lo que se considera que estas no son nocivas a los seres vivos en estas concentraciones. Lo importante en este estudio es que al no presentarse toxicidad por parte de la microemulsión en los seres vivos, se puede decir que los excipientes son buenos candidatos para la formación de una microemulsión de administración subcutánea.

- Se obtuvieron microemulsiones oleoacuosas estables que poseen un porcentaje de cloruro de metileno que va desde el 2.5% hasta un 4.4 %, con un porcentaje de la mezcla de tensoactivos que va desde un 21.25% hasta un 31.03 % y un porcentaje de agua que va desde un 65.5% hasta el 75%. Este panorama nos indica que la zona de microemulsión oleoacuosa es muy reducida. Por otro lado, la zona antes mencionada no es estrictamente la única zona de microemulsión oleoacuosa, sin embargo, si seguimos aumentando el porcentaje de agua, los porcentajes de cloruro de metileno se van disminuyendo y así la capacidad de acarrear a un principio activo con baja solubilidad en agua, pero aún sigue siendo zona de microemulsión oleoacuosa aunque posea esa desventaja.

- La cantidad máxima solubilizada de enrofloxacin en las microemulsiones se mostró en la muestra A3, que posee el mayor porcentaje de tensoactivos.

También, ésta presenta mayor estabilidad que el resto de las muestras. Además, se consiguió disolver 100000 veces más enrofloxacina que en agua.

- Las liberaciones de todas las muestras de microemulsión que se probaron muestran una tendencia a la liberación modificada como se planteó desde un principio. Esto aunado a la liberación que presenta el Baytril®, se demuestra en este estudio que las microemulsiones pueden servir como sistemas de liberación modificada para principios activos poco solubles en agua.

En conclusión, podemos decir que las microemulsiones del sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{BRIJ97}/\text{Isopropanol}$ se presenta como una opción más dentro del amplio campo de los sistemas de liberación modificada, acarreado dentro de su matriz un principio activo poco soluble en agua. La estabilidad de estos sistemas, su baja toxicidad a nivel de excipientes y los costos que se pueden evitar en el aspecto de trabajo humano, administraciones y dosis para el caso específico de la enrofloxacina y su uso en la veterinaria, se traduce como beneficio ya que se está mejorando la administración de este fármaco mediante el cambio de la forma farmacéutica.

8. REFERENCIAS

- ¹ Mastitis bovina podría afectar el consumo de leche en México. Bizarra Política (2022). Disponible en: <<http://bizarrapolitica.mx/2022/05/30/mastitis-bovina-podria-afectar-el-consumo-de-leche-en-mexico/>>
- ² Griffioen, K., Velthuis, A., Koop, G. & Lam, T. Effects of a mastitis treatment strategy with or without on-farm testing. *Journal of Dairy Science* 4665-4681 (2021).
- ³ Magariños, H. *Producción higiénica de la leche cruda*. 39-51 (Producción y Servicios Incorporados S. A., 2001).
- ⁴ Nelson, R. FDA to withdraw approval for enrofloxacin. *The Lancet infectious diseases*, 4, 258 (2004).
- ⁵ Lizondo, M., Pons, M., Gallardo, M. & Estelrich, J. Physicochemical properties of enrofloxacin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15, 1845-1849 (1997).
- ⁶ Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G. & Ellerbroek, L. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology* 88, 311-314 (2003).
- ⁷ Rao, G. et al. Pharmacokinetics of Enrofloxacin and its Metabolite Ciprofloxacin in Goats given Enrofloxacin Alone and in Combination with Probenecid. *The Veterinary Journal* 163, 85-93 (2002).
- ⁸ Wiuff, C., Lykkesfeldt, J., Svendsen, O. & Aarestrup, F. The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among Salmonella and coliforms in pigs. *Research in Veterinary Science* 75, 185-193 (2003).
- ⁹ e Souza, M., Bittencourt, C. & Morsch, L. LC determination of enrofloxacin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28, 1195-1199 (2002).
- ¹⁰ Mostafa, S., El-Sadek, M. & Alla, E. Spectrophotometric determination of enrofloxacin and pefloxacin through ion-pair complex formation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28, 173-180 (2002).
- ¹¹ Roque, A. & Gomez-Gil, B. Therapeutic effects of enrofloxacin in an experimental infection with a luminescent *Vibrio harveyi* in *Artemia franciscana* Kellog 1906. *Aquaculture* 220, 37-42 (2003).
- ¹² Daundkar, P., Vemu, B., Dumka, V. & Sharma, S. Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in buffalo calves. *Veterinary Medicine and Science* 1, 63-71 (2015).

-
- ¹³ Turel, I., Leban, I., Klintschar, G., Bukovec, N. & Zalar, S. Synthesis, crystal structure, and characterization of two metal-quinolone compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry* 66, 77-82 (1997).
- ¹⁴ Souza, M., Bittencourt, C. & Filho, P. Microbiological assay for enrofloxacin injection. *International Journal of Pharmaceutics* 271, 287-291 (2004).
- ¹⁵ Palumbo, M., Gatto, B., Zagotto, G. & Palù, G. On the mechanism of action of quinolone drugs. *Trends in Microbiology* 1, 232-235 (1993).
- ¹⁶ Vancraeynest, D. et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Veterinary Microbiology* 101, 245-251 (2004).
- ¹⁷ Schentag, J. Clinical Pharmacology of the Fluoroquinolones: Studies in Human Dynamic/Kinetic Models. *Clinical Infectious Diseases* 31, S40-S44 (2000).
- ¹⁸ Sood, D. et al. Antibacterial and Pharmacological Evaluation of Fluoroquinolones: A Chemoinformatics Approach. *Genomics & Informatics* 16, 44-51 (2018).
- ¹⁹ Otero, J., Mestorino, O. & Errecalde, J. Enrofloxacin: una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria. *analecta veterinaria* vol. 21, 42-49 (2001).
- ²⁰ Sommer, C. & Bibby, B. The influence of veterinary medicines on the decomposition of dung organic matter in soil. *European Journal of Soil Biology* 38, 155-159 (2002).
- ²¹ Vulfson, L. Serogroups and antimicrobial susceptibility among *Escherichia coli* isolated from farmed mink (*Mustela vison* Schreiber) in Denmark. *Veterinary Microbiology* 79, 143-153 (2001).
- ²² The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908. *NobelPrize.org* (2020). Disponible en: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/ehrlich/biographical/>>
- ²³ Paul Ehrlich. *Science History Institute* (2020). Disponible en: <<https://www.sciencehistory.org/historical-profile/paul-ehrlich>>
- ²⁴ Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H. & Doelker, E. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 24, 1113-1128 (1998).
- ²⁵ Matschke, C. Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products. *Journal of Controlled Release* 85, 1-15 (2002).
- ²⁶ Leon, P. *MICROEMULSION theory and practice*. 21-32 (1977).
- ²⁷ Günther, H. *NMR spectroscopy*. (John Wiley & Sons, 2001).
- ²⁸ Mishra, A., Panola, R. & Rana, A. Microemulsions: As drug delivery system. *Journal of Scientific and Innovative Research* 4, 467-474 (2014).

-
- ²⁹ Kang, B. et al. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics* 274, 65-73 (2004).
- ³⁰ Sintov, A. & Shapiro, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *Journal of Controlled Release* 95, 173-183 (2004).
- ³¹ Mittal, K. *Surfactants in Solution*. (Springer US, 1989).
- ³² Vandamme, T. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Progress in Retinal and Eye Research* 21, 15-34 (2002).
- ³³ Lawrence, M. & Rees, G. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 45, 89-121 (2000).
- ³⁴ Mittal, K. *Micellization, Solubilization, and Microemulsions*. (Springer US, 2012).
- ³⁵ Degiorgio, V. & Corti, M. *Physics of amphiphiles--micelles, vesicles, and microemulsions*, 1983. (North-Holland Pub. Co., 1985).
- ³⁶ Nielloud, F. & Marti-Mestres, G. *Pharmaceutical emulsions and suspensions*. 20-67 (Informa Healthcare, 2010).
- ³⁷ Agrawal, O. & Agrawal, S. An overview of new drug delivery system: Microemulsion. *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 2, 5-12 (2012).
- ³⁸ Thevenin, M., Grossiord, J. & Poelman, M. Sucrose esters/cosurfactant microemulsion systems for transdermal delivery: Assessment of bicontinuous structures. *International Journal of Pharmaceutics* 137, 177-186 (1996).
- ³⁹ Krauel, K., Davies, N., Hook, S. & Rades, T. Using different structure types of microemulsions for the preparation of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles by interfacial polymerization. *Journal of Controlled Release* 106, 76-87 (2005).
- ⁴⁰ Solans, C., IZquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N. & Garciacelma, M. Nanoemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10, 102-110 (2005).
- ⁴¹ Avallone, E. & Baumeister, T. Marks. *Manual del ingeniero mecánico*. (McGraw-Hill, 1995).
- ⁴² Groten, J. et al. Subacute Toxicity of a Mixture of Nine Chemicals in Rats: Detecting Interactive Effects with a Fractionated Two-Level Factorial Design. *Fundamental and Applied Toxicology* 36, 15-29 (1997).
- ⁴³ Fubini, B., Gasco, M. & Gallarate, M. Microcalorimetric study of microemulsions as potential drug delivery systems. I. Evaluation of enthalpy in the absence of any drug. *International Journal of Pharmaceutics* 42, 19-26 (1988).

-
- ⁴⁴ Fubini, B., Gasco, M. & Gallarate, M. Microcalorimetric study of microemulsions as potential drug delivery systems. II. Evaluation of enthalpy in the presence of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 50, 213-217 (1989).
- ⁴⁵ Fu, X., Feng, F. & Huang, B. Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for antimicrobial activity of glycerol monolaurate. *International Journal of Pharmaceutics* 321, 171-175 (2006).
- ⁴⁶ European Medicines Agency. *ICH guideline Q3C (R6) on impurities: guideline for residual solvents*. 1-39 (2019).
- ⁴⁷ Changez, M., Chander, J. & Dinda, A. Transdermal permeation of tetracaine hydrochloride by lecithin microemulsion: In vivo. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 48, 58-66 (2006).
- ⁴⁸ Burleigh-Flayer, H. Isopropanol 13-Week Vapor Inhalation Study in Rats and Mice with Neurotoxicity Evaluation in Rats. *Fundamental and Applied Toxicology* 23, 421-428 (1994).
- ⁴⁹ Reimer, J., Nilsson, M., Álvarez Chamorro, M. & Söderman, O. The water/n-octane/octyl- β -d-glucoside/1-octanol system: Phase diagrams and phase properties. *Journal of Colloid and Interface Science* 287, 326-332 (2005).
- ⁵⁰ Kunieda, H. & Shinoda, K. Phase behavior in systems of nonionic surfactant/water/oil around the hydrofile-lipophile-balance-temperature (HLB-temperature). *Journal of dispersión Science and technology* 3, 233-244 (1982).
- ⁵¹ Zhang, Y., Li, T., Jin, Z., Wang, W. & Wang, S. Synthesis of nanoiron by microemulsion with Span/Tween as mixed surfactants for reduction of nitrate in water. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China* 1, 466-470 (2007).