



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**FARMACOCINÉTICA ORAL DE UN PREPARADO  
FARMACÉUTICO DE FLORFENICOL EN EL ALIMENTO  
DISEÑADO PARA LARGA ACCIÓN EN AVES DE PRODUCCIÓN Y  
EN CONDICIONES DE TRASPATIO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**DIANA ALINE GUZMÁN FLORES**

Asesores:

Dra. Lilia Gutiérrez Olvera  
Dr. Héctor Salvador Sumano López  
Dra. Minerva Monroy Barreto

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIA**

A Evelyn, porque este trabajo es una muestra de que todos los días lucho por cumplir mi promesa.

A mi mamá por ser la mejor madre del mundo, dándome siempre su amor y apoyo incondicional. Gracias por ser mi mejor amiga y compañera.

A mi abuelita por ser como una segunda madre para mí y por todo el apoyo que siempre me ha brindado.

A mi hermano Lalo, por ser una de las personas más importantes en mi vida.

A Daisy, por darme las fuerzas para seguir adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá por su comprensión y apoyo durante todos mis años de estudio.

Al departamento de Fisiología y Farmacología por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de realizar diferentes actividades que enriquecieron mi desarrollo personal, académico y profesional.

Al Dr. Itzcoatl Aquino por todos sus consejos, enseñanzas y apoyo brindado durante la carrera.

A la Dra. Minerva Monroy Barreto por su disposición y participación en el presente proyecto. También, por todas sus enseñanzas y su paciencia.

A Whisky y Daisy por acompañarme en mis noches de desvelo, por hacer mis días más felices y por recordarme siempre la razón por la que estudié esta carrera.

A mis asesores, la Dra. Lilia Gutiérrez y el Dr. Héctor Sumano por todo el apoyo, confianza y paciencia hacia mi persona. También, por su participación en este proyecto.

A todos mis familiares, amigos y conocidos que con sus palabras me motivaron durante la realización de esta tesis.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a la revisión y observaciones de este escrito.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IT200222. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

# CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
ÍNDICE DE CUADROS .....	VII
GLOSARIO DE TÉRMINOS .....	VIII
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Aves de traspatio .....	4
1.2 Fenicoles.....	7
1.3 Florfenicol .....	8
1.3.1 Origen y características químicas.....	8
1.3.2 Espectro de acción.....	9
1.3.3 Indicaciones.....	9
1.3.4 Tiempos de retiro.....	10
1.3.5 Farmacocinética.....	10
1.3.6 Farmacodinamia .....	12
1.3.7 Efectos adversos .....	13
1.4 Carbopol .....	13
1.5 Capsaicina .....	15
1.6 Cromatografía de líquidos .....	16
2. HIPÓTESIS .....	18
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
4.1 Ubicación.....	18
4.2 Animales.....	19
4.3 Diseño de los preparados.....	19
4.4 Tratamientos .....	19
4.5 Procedimientos de muestreo.....	19
4.6 Procedimientos analíticos.....	20
4.6.1 Preparación de disoluciones <i>stock</i> .....	20
4.6.2 Preparación de disoluciones estándar .....	20
4.6.3 Preparación de muestras y extracción .....	20

4.7	Condiciones cromatográficas de análisis .....	21
4.8	Procesamiento de datos .....	21
4.9	Análisis estadístico .....	21
5.	RESULTADOS .....	22
5.1	Evaluación del disolvente de extracción .....	22
5.2	Linealidad del sistema .....	23
5.3	Linealidad del método .....	25
5.4	Resultados experimentales .....	28
6.	DISCUSIÓN.....	39
7.	CONCLUSIONES.....	42
8.	REFERENCIAS .....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

<b>Figura 1.</b> Estructura molecular de los fenicoles (se señalan sus diferencias). <sup>(31)</sup> .....	7
<b>Figura 2.</b> Estructura química del florfenicol <sup>(31)</sup> .....	9
<b>Figura 3.</b> Estructura química del monómero del carbopol <sup>(31)</sup> .....	15
<b>Figura 4.</b> Fórmula estructural de la dihidrocapsaicina <sup>(31)</sup> .....	16
<b>Figura 5.</b> Cromatogramas obtenidos para el intervalo de concentración de 0.5 a 15.75 ppm de florfenicol, adquiridos a 223 nm.....	23
<b>Figura 6.</b> Curva de calibración/regresión del sistema para florfenicol (AUC = área bajo la curva del cromatograma).....	24
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de suero de gallina de traspatio fortificado con florfenicol a 2 ppm.....	25
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de suero de gallinas de traspatio fortificado con florfenicol a 5 ppm.....	26
<b>Figura 9.</b> Cromatograma de suero de gallinas de traspatio fortificado con florfenicol a 10 ppm.....	26
<b>Figura 10.</b> Curva de linealidad del método en sueros fortificados con florfenicol a 2, 5 y 10 ppm (µg/mL) .....	27
<b>Figura 11.</b> Cromatograma del GO con el producto Nuflor® premix a la hora. ....	28
<b>Figura 12.</b> Cromatograma del preparado experimental 1 a las 0.5 h. ....	29
<b>Figura 13.</b> Cromatograma del preparado experimental 1 a la hora. ....	30
<b>Figura 14.</b> Cromatograma del preparado experimental 1 a las 18 h. ....	30
<b>Figura 15.</b> Cromatograma del preparado experimental 2 a las 0.5 h. ....	31
<b>Figura 16.</b> Cromatograma del preparado experimental 2 a la hora. ....	32
<b>Figura 17.</b> Cromatograma del preparado experimental 2 a las 18 h. ....	32
<b>Figura 18.</b> Curva de concentraciones vs tiempo de florfenicol en gallinas de traspatio en el grupo que recibió una dosis de 20 mg/kg del preparado Original (Nuflor® premezcla).....	33
<b>Figura 19.</b> Curva de concentraciones vs tiempo de florfenicol en gallinas de traspatio en el grupo que recibió una dosis de 20 mg/kg del preparado Experimental 1 .....	34
<b>Figura 20.</b> Curva de concentraciones vs tiempo de florfenicol en gallinas de traspatio en el grupo que recibió una dosis de 20 mg/kg del preparado Experimental 2 .....	35
<b>Figura 21.</b> Curva de concentraciones vs tiempo de los tres grupos dosificados con diferentes preparados orales de florfenicol a dosis de 20 mg/kg .....	36

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Tiempos promedio de tránsito gastrointestinal en aves comerciales. ....	12
<b>Cuadro 2.</b> Valores promedio de concentración mínima inhibitorias (CMI) de algunos patógenos en aves comerciales.....	13
<b>Cuadro 3.</b> Recuperación de florfenicol utilizando dos diferentes fases de extracción.....	22
<b>Cuadro 4.</b> Linealidad del sistema en la metodología analítica por HPLC .....	24
<b>Cuadro 5.</b> Resultados de la regresión lineal de los estándares de florfenicol .....	25
<b>Cuadro 6.</b> Resultados de la linealidad de la metodología analítica para cuantificación de sueros fortificados con florfenicol en HPLC.....	27
<b>Cuadro 7.</b> Valores obtenidos en el GO dosificado con el producto Nuflor® premix.....	28
<b>Cuadro 8.</b> Valores obtenidos en el grupo Exp 1 con el preparado de florfenicol en FOLA prototipo experimental 1 .....	29
<b>Cuadro 9.</b> Valores obtenidos en el grupo Exp2 con el preparado prototipo FOLA experimental 2 .....	31
<b>Cuadro 10.</b> Promedios $\pm$ 1DE de las variables farmacocinéticas de florfenicol en aves dosificadas a razón de 20 mg/kg administrados por vía oral directamente en el pico y con tres diferentes preparados del antimicrobiano: el producto de referencia (GO) y dos prototipos elaborados con la forma farmacéutica FOLA. ....	37
<b>Cuadro 11.</b> Relaciones PK/PD de tres preparados a base de florfenicol oral en gallinas de traspatio (GO = premezcla de referencia de Nuflor® y dos formas experimentales elaboradas tipo FOLA [EXP 1 y EXP 2]). Se determinaron el área bajo la curva en 24 horas dividido entre uno de dos valores de CMI ( $AUC_{0-24}/CMI$ ) y por ciento del tiempo en el que el florfenicol se encuentra por arriba de la CMI para los mismos patógenos seleccionados conforme a la literatura formal y en un intervalo de dosificación de 24 horas ( $\%T \geq CMI$ ).....	38



## GLOSARIO DE TÉRMINOS

°C	Grados Celcius
1M	Uno molar
ANOVA	Análisis de varianza
AUC	Área bajo la curva
b	Ordenada al origen
cbp	Cantidad bastante para
Cmax	Concentración máxima
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Dunntest	Prueba de Dunn de comparaciones múltiples
EMA	Agencia Europea de medicamentos
Exp 1	Experimental uno
Exp 2	Experimental dos
F	Biodisponibilidad
FOLA	Biodisponibilidad óptima de larga acción
GI	Gastrointestinal
GO	Grupo Original
h	Horas
HPLC	High performance liquid chromatography
ICb	Intervalo de confianza de la ordenada al origen
ICm	Intervalo de confianza de la pendiente
kg	Kilogramos
m	Pendiente
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MRL	Límite máximo de residuos
MRT	Tiempo medio de residencia
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amonio
nm	Nanómetros
ppb	Partes por billón

ppm	Partes por millón
$r^2$	Coefficiente de determinación
RAM	Resistencia bacteriana a los antimicrobianos
rpm	Revoluciones por minuto
Sb0	Desviación estándar de la ordenada al origen
Sm1	Desviación estándar de la pendiente
SNC	Sistema nervioso central
Sy/x	Desviación estándar de la regresión lineal
TGI	Tracto gastrointestinal
Tmax	Tiempo máximo
UV	Ultravioleta
Vd <sub>AUC</sub>	Volumen aparente de distribución
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{m}$	Micrómetro

## RESUMEN

**GUZMÁN FLORES DIANA ALINE.** Farmacocinética oral de un preparado farmacéutico de florfenicol en el alimento diseñado para larga acción en aves de producción y en condiciones de traspatio (bajo la dirección de: Dra. Lilia Gutiérrez Olvera, Dr. Héctor Sumano Salvador López y Dra. Minerva Monroy Barreto)

Idealmente el florfenicol debe superar concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) durante todo el intervalo de dosificación. Así se logra máxima eficacia clínica y la carga de florfenicol debe ser  $\geq 60$  ( $AUC_{0-24}/CMI$ ). El tránsito gastrointestinal en pollos es muy rápido y es necesario incluir el florfenicol en vehículos que ralenticen su tránsito, evitando al mismo tiempo interacciones indeseables con los alimentos. En este ensayo se evaluaron dos formulaciones de florfenicol basadas en FOLA (F = biodisponibilidad; O = óptima; L = larga; A = acción). Se incluyeron un total de 90 aves criollas divididas en tres grupos: grupo original o de referencia (GO), que recibió dosis única del producto comercial original de premezcla de florfenicol (20 mg/kg), grupo experimental 1 (Exp1= 1 vehículo + fármaco) y grupo experimental 2 (Exp2= 2 vehículos + fármaco), que recibieron la misma dosis, pero presentados como FOLA (*pellets*). La técnica analítica utilizada fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los grupos Exp1 y Exp2 lograron una  $C_{max}$  más alta que GO (8,65 y 10,31  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente frente a 7,17  $\mu\text{g/mL}$ ) y lograron un tiempo de residencia más largo, así como una mayor  $AUC_{0-24}$  (6,10, 7,03 h vs. 3,45 h y 33,50, 41,18  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$  frente a 17,25  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ , respectivamente para Exp1, Exp2 y GO). Estos valores representan una mejor farmacocinética de florfenicol para Exp1 y Exp2 y, por lo tanto, ofrecen mejores relaciones PK/PD. Se postula que estos resultados farmacocinéticos pueden traducirse en mejores resultados clínicos, propuesta que debe ser verificada en campo.

## ABSTRACT

Florfenicol is required to achieve minimum inhibitory concentrations that reach 100% of the dosing interval to reach the maximum clinical antibacterial efficacy (%T >MIC). Also, the florfenicol load received by the organism should get 60 or more when  $AUC_{0-24}/MIC$ . The gastrointestinal transit in chickens is short-lived. Including florfenicol in vehicles that promote its absorption and prolong its stay within the GI tract in this species while avoiding undesirable interactions with food is necessary. Hence, two formulations of florfenicol based on FOLAs (F = bioavailability; O = optimal; L = long; A = action) were evaluated. A total of 90 creole birds divided into three groups were included: original or reference group (GO), which received the dose with the commercial-original product of florfenicol-premix (20 mg/kg), experimental group 1 (Exp1= 1 vehicle + drug), and experimental group 2 (Exp2= 2 vehicles + drug), which received the same dose, but presented as FOLA pellets. The analytical technique utilized was high-performance liquid chromatography (HPLC). The Exp1 and Exp2 groups achieved higher  $C_{max}$  than GO (8.65 and 10.31  $\mu\text{g/mL}$ , respectively vs. 7.17  $\mu\text{g/mL}$ ) and achieved a longer residence time as well as a higher  $AUC_{0-24}$  (6.10, 7.03 h vs. 3.45 h and 33.50, 41.18  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$  vs. 17.25  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ , respectively for Exp1, Exp2 and GO). These values represent better pharmacokinetics of florfenicol for Exp1 and Exp2 and, therefore, offer better PK/PD ratios. It is postulated that these pharmacokinetic results can translate into better clinical results, a proposal that must be verified in the field.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos en medicina veterinaria no solo son utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas, sino también se les emplea como tratamiento metafiláctico y en profilaxis,<sup>(1)</sup> incluso se les llegó a utilizar como promotores del crecimiento por muchos años en dosis subterapéuticas. Actualmente está prohibido su uso para este fin, ya que muchos de estos fármacos se utilizan en la terapéutica humana y veterinaria, y se pretende limitar el surgimiento de resistencia a los antimicrobianos (RAM).<sup>(2)</sup> La sub o sobre dosificación, la mala calidad de los principios activos y los diagnósticos erróneos, han provocado el surgimiento de RAMs,<sup>(1)</sup> y esta se puede definir como la capacidad de las bacterias para impedir que los antibacterianos actúen en contra de ellas. Evidentemente los fármacos pierden su eficacia y esto a su vez provoca la persistencia de infecciones que pueden transmitirse de un individuo a otro. Los antibacterianos requieren alcanzar su punto de acción óptima al lograr una cierta concentración y durante un tiempo específico para lograr inhibir el desarrollo o provocar la muerte de la bacteria. A esta relación se le conoce como proporciones farmacocinéticas/farmacodinámicas (PK/PD). Aunque se busca la destrucción de patógenos bacterianos, estos logran con mayor o menor éxito modificar sus mecanismos de resistencia a través de mutaciones y con ello, que los antibióticos no puedan ejercer su acción en contra de ellas. Las bacterias patógenas adquieren resistencia por dos vías: vertical y horizontal. La resistencia vertical se lleva a cabo con la acumulación de cambios genéticos durante la replicación del genoma y la resistencia horizontal se realiza con la transmisión de genes de resistencia entre microorganismos.<sup>(3)</sup> Asimismo, la RAM puede ser de dos tipos: natural o adquirida. La resistencia natural o intrínseca, se refiere a las bacterias que pertenecen a una misma cepa y son resistentes a cierto antibiótico, ya sea por carecer del sitio de acción o porque este no es accesible al antibacteriano. La resistencia adquirida, ocurre por mutaciones cromosómicas o por la adquisición de nuevos genes y hace referencia a la resistencia bacteriana que solo se manifiesta en algunas cepas de una misma especie bacteriana y que, generalmente, son sensibles al antibiótico.<sup>(4)</sup> Hoy en día, diversos estudios han reconocido bacterias resistentes a antibacterianos que tienen gran importancia en la clínica de animales de producción o en los alimentos y se considera a la transferencia de bacterias multirresistentes de animal al humano, por medio de la cadena trófica, como un problema de seguridad alimentaria.<sup>(5)</sup> Se han identificado en años recientes nuevas o

crecientes incidencias de RAMs, principalmente en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoea*, *Shigella dysenteriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae* y *Plasmodium falciparum*.<sup>(6)</sup> Con esta tendencia se ha estimado que para el año 2050 la tasa de mortalidad anual provocada por infecciones de microorganismos multirresistentes será de 10 millones, cifra que supera el número de personas que hoy en día mueren a causa de cáncer cada año.<sup>(7)</sup>

Es evidente que el fenómeno de las RAMs es una problemática mundial que repercute tanto en el ámbito veterinario como en el humano. Por ello la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) han establecido recomendaciones para el buen uso de los antibacterianos y así preservar su eficacia.<sup>(1)</sup> Las explotaciones dedicadas a la cría, engorda y reproducción de animales para consumo humano dependen en gran medida del uso de antibióticos para el control de enfermedades, las cuales pueden presentarse en diferentes etapas de la vida del animal, por lo que es necesario generar conciencia en los productores, mejorar la bioseguridad en las granjas, aplicar buenas prácticas de manejo, hacer uso de medicina preventiva y en lo que respecta al uso de antimicrobianos, optimizar y racionalizar su uso.<sup>(8)</sup> Se han tomado medidas al respecto. Por ejemplo, en México y muchos otros países, está prohibido el uso de antibióticos como método de prevención de enfermedades y como promotor de crecimiento. Su uso en estos sentidos se considera incorrecto, un abuso que fomenta las RAMs.<sup>(2)</sup> Por su parte, la RAM debe considerarse un fenómeno natural que se da con el paso tiempo. Esto obliga a buscar alternativas terapéuticas a los grupos de antibióticos que han generado mayor resistencia y mejorar la forma de administración y diseño farmacéutico de los antibacterianos existentes para que se ajusten mejor a sus proporciones PK/PD.<sup>(9)</sup>

## **1.1 Aves de traspatio**

El sistema de crianza animal de traspatio es un tipo de sistema de producción caracterizado por generar bienes pecuarios destinados a mejorar la alimentación e ingresos de las familias campesinas, aprovechando el espacio disponible y la mano de obra familiar. A partir de esta

actividad se obtienen productos de alto valor nutricional, como lo son la carne, el huevo y la leche.<sup>(10)</sup> La avicultura de traspatio, rústica o familiar se puede definir como la cría doméstica tradicional que ocupa pocos recursos e incorpora diferentes especies de aves como: pavos, patos, gallinas, gansos, pichones, faisanes, codornices y gallinas de Guinea. Se tiene evidencia de que esta actividad se realiza desde la época prehispánica con los guajolotes (*Meleagris gallopavo*) y que era un animal muy valorado.<sup>(11)</sup>

Es importante destacar que las aves de corral son de las especies más comunes en el sistema de producción de traspatio. Su manejo es sencillo y los productos obtenidos son de alta calidad nutricional y de bajo costo.<sup>(12)</sup> El término ave de corral hace referencia a un ave que ha sido domesticada y que se cría para obtener productos de origen animal, como carne y huevo. Dentro de las aves de corral se incluye el orden Galliforme, como son los pollos y los pavos, y el orden Anseriforme, que comprende a las aves acuáticas como los patos y los gansos.<sup>(11)</sup> A pesar de la importancia relativa de la crianza de aves de traspatio en México, se tiene muy poco conocimiento de sus indicadores cuantitativos. Resulta difícil de cuantificar y se caracteriza sólo como una actividad de apoyo en la economía de las familias campesinas, realizada principalmente por las amas de casa, niños y/o ancianos.<sup>(10,13)</sup> A pesar de ello, se ha estimado que este sistema de producción puede llegar a representar hasta el 10% de la producción avícola a nivel nacional y que, generalmente se emplean pollos de engorda y gallinas de doble propósito, es decir, para la producción de carne y huevo.<sup>(13)</sup> Es evidente que la avicultura de traspatio se caracteriza por sus instalaciones rústicas, alimentación basada principalmente en el pastoreo y bioseguridad escasa o nula.<sup>(14)</sup> Generalmente, estas aves no cuentan con un espacio propio, por lo que conviven juntas en un mismo gallinero por las noches, el cual es elaborado con varas, láminas, barros, tablas o con los materiales disponibles en la zona.<sup>(11,15)</sup> Durante el día, las parvadas se dedican a pastorear de manera relativamente libre en el traspatio, consumiendo larvas, insectos, hierbas y desperdicios de alimento que genera la misma familia.<sup>(16)</sup> La producción bajo este sistema es pequeña, pues carecen de insumos y de tecnología aplicada en cuanto a higiene, genética e instalaciones. Los productores seleccionan aves de estirpes rurales dado que son más resistentes a las enfermedades, se adaptan a diferentes climas y no requieren mucha inversión en cuanto a instalaciones para su explotación.<sup>(17)</sup> Las aves que se emplean provienen generalmente de

animales criollos de las mismas comunidades locales o también son utilizadas razas de doble propósito como son la Rhode Island roja y la Plymouth Rock Barrada, las cuales en muchas ocasiones son otorgadas por programas públicos a fin de procurar una mejor alimentación de la población marginada a través de la avicultura a pequeña escala.<sup>(18,19)</sup>

Las gallinas, están adaptadas para estar en el suelo, que es donde se encuentra su fuente de alimento (insectos, semillas, gusanos, plantas o vegetales). Sus patas están compuestas generalmente por cuatro dedos que les sirven para escarbar. Tienen un cuerpo pesado y sus alas cortas les permiten volar solo distancias cortas. Tanto los machos como las hembras en edad adulta cuentan con una carnosidad en ambos lados del pico, la cual se denomina barbilla. Asimismo, tienen una cresta desnuda y carnosa que es más prominente en los machos y varía dependiendo de la raza. Su cresta es sencilla, redondeada o picuda, caída o erecta. El color de su plumaje puede ser blanco, amarillo, rojo, azul, gris y negro, entre otros. Sus hábitos son estrictamente diurnos, es decir, son activas en el día, gregarias y polígamas.<sup>(11)</sup>

En el sistema de producción de traspatio la transmisión de enfermedades se ve favorecida por diferentes factores, como lo son el acceso al contacto con otras especies o con aves de vida libre y por contacto directo o a través del humano con aves enfermas.<sup>(19)</sup> Casi siempre hay un déficit importante en lo referente a apoyo técnico y por ello la productividad es baja, amén de que los animales enfermos son tratados sin la supervisión de un veterinario.<sup>(20)</sup> De hecho, es una práctica común el uso de fármacos y dosis aprobados para otras especies e incluso formulaciones de uso humano.<sup>(20-22)</sup> Los problemas digestivos y respiratorios son los problemas que se presentan con mayor frecuencia en las aves de corral y en conjunto, representan del 46 al 52% de la mortalidad.<sup>(23,24)</sup> Aproximadamente 62% de estas aves se ve afectada por la parasitosis intestinal.<sup>(21)</sup>

Los antibióticos son de los fármacos más utilizados en la avicultura familiar, especialmente los que se pueden administrar en el agua de bebida. Sin embargo, generalmente se prescriben y dosifican por los vendedores de las agrofarmacias o los distribuidores de las empresas farmacéuticas.<sup>(25)</sup> En el ámbito veterinario se cuenta con una opción antibacteriana exclusiva:

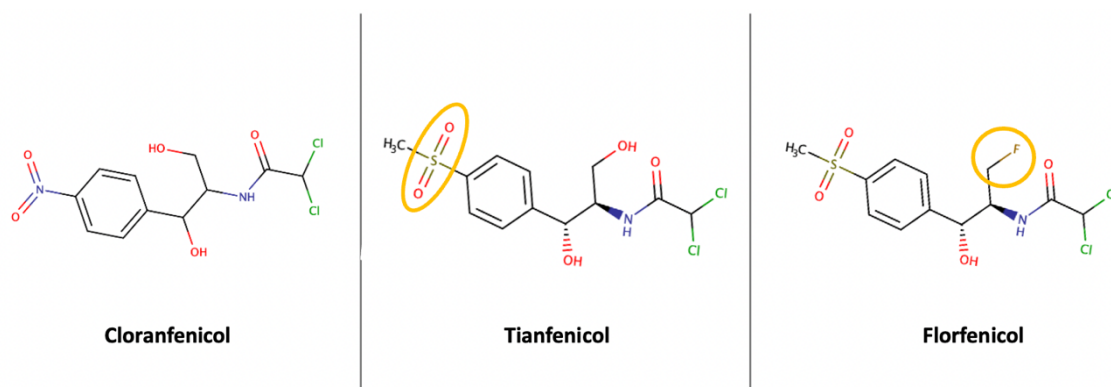


el florfenicol, que en avicultura es utilizado ampliamente para tratar enfermedades respiratorias.<sup>(26,27)</sup>

## 1.2 Fenicoles

Los fenicoles son antibacterianos derivados del ácido dicloroacético y el cloranfenicol es el antimicrobiano más representativo de esta familia. El grupo abarca tres fármacos: el cloranfenicol, el tianfenicol y el florfenicol.<sup>(28)</sup> El cloranfenicol contiene un grupo nitro en posición *para* del anillo bencénico, mientras que el tianfenicol sustituye este grupo por un grupo sulfometilo y el florfenicol es un análogo sintético del tianfenicol en el que se incorpora un grupo fluorado en su cadena alifática.<sup>(29)</sup> En la figura 1 se muestran sus diferencias estructurales. Hoy en día, estos tres antibióticos son obtenidos por síntesis química.<sup>(28)</sup>

Tienen acción bacteriostática mediante la inhibición de la síntesis proteica bacteriana. El antibiótico ingresa al interior del microorganismo por difusión simple o facilitada y se une a la subunidad ribosomal 50S. Con esto impide el ensamblaje de los grupos aminoacilo-ARNt, los cuales son los encargados de trasladar los aminoácidos al ribosoma<sup>(4,30)</sup> para generar las proteínas que requiere el microorganismo. La inhibición de este proceso lleva a la bacteria a un paro metabólico y se describe su efecto como bacteriostático. Son de amplio espectro contra bacterias aerobias y anaerobias Gram positivos y negativos y son eficaces contra *Haemophilus influenzae*, *Salmonella spp.* y en dosis elevadas tienen efecto contra micoplasmas, Rickettsias y Chlamydias.<sup>(4)</sup>



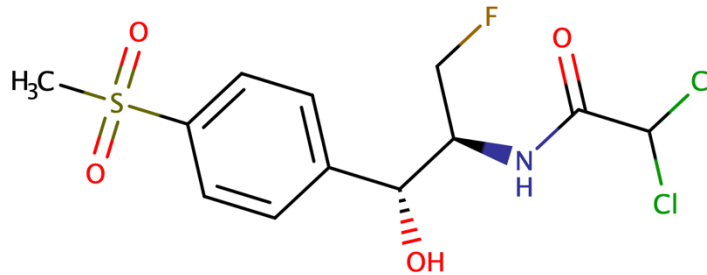
**Figura 1.** Estructura molecular de los fenicoles (se señalan sus diferencias).<sup>(31)</sup>

El cloranfenicol ha sido prohibido para su uso en veterinaria por el riesgo de generar residuos tóxicos que induzcan anemia aplásica en el humano.<sup>(6)</sup> Por ello su uso se limita en patologías severas como la fiebre tifoidea o la meningitis bacteriana.<sup>(33)</sup> En lo que respecta a florfenicol, este no posee el riesgo de generar anemia aplásica en los humanos.<sup>(6,34)</sup> En cuanto a su farmacocinética, los fenicoles pueden ser administrados por vía oral, dado que después de su absorción logran concentraciones plasmáticas adecuadas. Su distribución también es excelente, logrando alcanzar prácticamente todos los compartimientos corporales y órganos, tejido respiratorio, incluyendo sacos aéreos, articulaciones y epitelio gastrointestinal.<sup>(6)</sup>

## **1.3 Florfenicol**

### **1.3.1 Origen y características químicas**

El florfenicol es un antibacteriano de amplio espectro derivado del tianfenicol. Dentro de su estructura molecular se incluye un grupo flúor en la posición del carbono 3 de la cadena alifática, lo que lo hace menos susceptible a ser inactivado por bacterias a través de acetilación en el grupo hidroxilo, como sucede con el cloranfenicol y el tianfenicol.<sup>(32)</sup> Su nombre químico es (d-tre-2,2-N-c- $\alpha$ (fluormetilo)- $\beta$ -hidroxi-pp (fenetilo) acetamida) y su fórmula condensada es  $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$  (figura 2). Tiene un peso molecular de 358.21 D, su punto de fusión se da entre 153 y 154 °C y es una molécula neutra, con ausencia de grupos ionizables dentro de los rangos de pH de 3 a 9. Presenta solubilidad en solventes orgánicos polares (polietilenglicoles, N-metilpirrodilona) y poca o casi nula solubilidad en agua.<sup>(28,35)</sup> Por otro lado, posee una solubilidad relativamente elevada en lípidos, con un coeficiente de partición octanol/agua de 2.36.<sup>(35)</sup> Es un fármaco no hidratado ni higroscópico, estable ante la luz, el calor y la humedad.<sup>(28)</sup>



**Figura 2.** Estructura química del florfenicol <sup>(31)</sup>

### 1.3.2 Espectro de acción

Es cerca de 100 veces más amplio y potente que sus dos antecesores frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.<sup>(6,35)</sup> Es eficaz contra bacterias patógenas como *Enterobacter cloacae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Proteus vulgaris* y *Escherichia coli*,<sup>(36)</sup> por lo que resulta útil en el tratamiento de enfermedades provocadas por estas bacterias patógenas, principalmente problemas respiratorios, en las diferentes especies de producción.<sup>(27)</sup>

### 1.3.3 Indicaciones

En México se le usa para agregar al agua de bebida y en forma de premezcla. Para esta última forma de dosificación se administran dosis de 20-40 ppm en el alimento. Esta dosis es muy baja e inadecuada para lograr concentraciones terapéuticas. Para obtener concentraciones terapéuticas confiables, se recomiendan dosis de 80 ppm o más. De hecho, se sabe que para evitar la aparición temprana de cepas resistentes la dosis no debe ser inferior a 20 mg/kg. Este hecho hace aún más importante supervisar que se use una dosis adecuada y que se utilicen preparados bioequivalentes. Se propone una biodisponibilidad (F) del florfenicol del 73% a 40 mg/kg y de 80% a dosis de 20 mg/kg.<sup>(6,37)</sup>

En pollos enfermos hay una reducción de la vida media de eliminación ( $T_{1/2\beta}$ ) y también se reduce el volumen aparente de distribución área ( $V_{dAUC}$ ), las demás variables no cambian y

según Shen et al.<sup>(38)</sup> la F es de 70%. En patos enfermos, las concentraciones plasmáticas que se logran no son distintas a las observadas en pollos.<sup>(39)</sup> Es factible suponer que la F de 70% se puede mejorar con un diseño farmacéutico tipo FOLA (F = biodisponibilidad; O = óptima; L = larga ; A = acción)<sup>1</sup> que aumenta el tiempo de estancia del florfenicol en el tubo digestivo.

### 1.3.4 Tiempos de retiro

Para el florfenicol, la EMA sugiere buscar el metabolito florfenicol-amina, que es la forma en que se le encuentra principalmente en músculo. Los niveles máximos de residuos permitidos (MRL) en aves comerciales son de 100, 2500, 750 y 200 ppm en músculo, hígado, riñón y piel-grasa, respectivamente. Una de las casas comerciales que lo tiene en su línea recomienda un tiempo de retiro de 5 días, aunque se ha postulado que se puede tener un margen mayor de seguridad de estar dentro del tiempo de retiro adecuado si se aplican 7 días de retiro.<sup>(6,37)</sup>

### 1.3.5 Farmacocinética

El florfenicol no se administra en aves vía SC o IM porque las formulaciones pueden dejar residuos persistentes y porque el manejo no hace viables a estas vías de administración. Solo se administra en el agua de bebida o en el alimento. Una vez ingerido, se absorbe como ya se mencionó con relativa eficiencia (F = 70%) y es biotransformado vía hepática, mediante el sistema citocromo P450 (CYP450), de manera parcial en florfenicol-amina, florfenicol ácido oxámico, monocloroflorfenicol y florfenicol alcohol, siendo por mucho florfenicol-amina el metabolito más abundante<sup>(40)</sup> y como este tiene una  $T_{1/2\beta}$  más prolongada que el florfenicol, se le considera junto al florfenicol como residuos marcadores.<sup>(27)</sup>

Posterior a su absorción se logran altas concentraciones que funcionan en el tratamiento de diversas patologías, incluyendo algunas de patógenos intracelulares.<sup>(28,41)</sup> Se distribuye en la mayoría de los tejidos y líquidos corporales, generando las concentraciones más altas en

---

<sup>1</sup> Patente No.MX/a/2012/01,3222 y PCT/MX2013/000137; Universidad Nacional Autónoma de México.

hígado y riñón y como se mencionó, con buena difusión a tejidos respiratorios y TGI. Las concentraciones son relativamente mayores en bilis, riñón, intestino delgado y orina. Tiende a acumularse en los tejidos en concentraciones más altas y por tiempo más largo que en el suero. Este factor resulta benéfico para el tratamiento de algunas infecciones pues, aunque las concentraciones pueden disminuir en el plasma, en tejidos se mantienen concentraciones eficaces que pueden cubrir intervalos entre los tratamientos de 24 horas y penetrar en espacios poco perfundidos, como los sacos aéreos y la cloaca.<sup>(6)</sup>

Desde la perspectiva clínica y los modelos de PK/PD se ha comprobado que el índice más representativo de eficacia clínica es el de área bajo la curva de concentración plasmática vs. tiempo en 24 horas, dividido entre la CMI del patógeno ( $AUC_{0-24}/CMI$ ), pero aún no se cuenta con un valor exacto o referente.<sup>(42,43)</sup>

Se le puede considerar un fármaco con cinética de orden cero cuando se utiliza a dosis muy elevadas o con animales con insuficiencia hepática. Es de acumulación muy moderada y en aves comerciales la vida media es de 3.2 horas.<sup>(43)</sup> Cuando se administra por vía oral a dosis de 30 mg/kg de peso corporal y en forma forzada mediante sonda, se logra una concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) de 3.20  $\mu\text{g/mL}$  con una  $F$  de tan solo del 55.3%. Las concentraciones tisulares más altas del fármaco se encontraron en el riñón, bilis, pulmón, músculo, intestino, corazón, hígado, bazo y plasma. Se encontraron bajas concentraciones del fármaco en SNC. No se detectaron residuos de florfenicol en tejidos y plasma a las 72 h, excepto en la bilis de donde desapareció a las 96 h.<sup>(44)</sup>

En otro estudio de farmacocinética del florfenicol, en aves se describe una  $F$  ligeramente mayor (70%) y una vida media de eliminación muy rápida de 104 min.<sup>(38)</sup> Es factible asumir que esta rápida eliminación y baja  $F$  se deben, entre otras cosas, al rápido tránsito GI en aves (4-6 h) como se aprecia en el cuadro 1, particularmente a nivel del asa duodenal en donde tienden a absorberse los fármacos.<sup>(6)</sup>

**Cuadro 1.** Tiempos promedio de tránsito gastrointestinal en aves comerciales.  
Adaptado de <sup>(45)</sup>

Segmento	pH	Tiempo de tránsito (min)
Buche	5.5	10 -50
Molleja	2.5 – 3.5	30 -90
Duodeno	5 – 6	5 – 10
Yeyuno	6.5 – 7	20 -30
Íleon	7 – 7.5	50 -70
Ciego/colon	8	20 -30

### 1.3.6 Farmacodinamia

El florfenicol es un antibacteriano bacteriostático y como se mencionó, su mecanismo de acción consiste en unirse irreversiblemente a la subunidad ribosomal 50S e inhibir la formación del enlace peptídico, limitando o evitando la síntesis de proteínas bacterianas.<sup>(28,35)</sup> Sus receptores bacterianos son los mismos que los del cloranfenicol y tianfenicol.<sup>(35)</sup> Actúa contra microorganismos Gram+ y Gram-, e incluso muestra un espectro superior a sus análogos el tianfenicol y el cloranfenicol. Dentro de su espectro destaca una elevada eficacia vs. *Proteus mirabilis*, *Proteus indol*+, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Bacteroides* spp., *Actinobacter* spp., *Haemophilus* spp. y enterococos.<sup>(43,46)</sup> En el cuadro 2 se presentan algunos valores de CMI referidos en la literatura

**Cuadro 2.** Valores promedio de concentración mínima inhibitorias (CMI) de algunos patógenos en aves comerciales

Patógeno	CMI (µg/mL)	Referencia
<i>Pasteurella multocida</i> .	8	Kim, et al. 2019 <sup>(47)</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	Wei, et al. 2016 <sup>(48)</sup>
<i>Streptococcus spp.</i>	2.0	EMEA, 2014 <sup>(49)</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1024	
<i>Escherichia coli</i> *	32	Chacón, 2012 <sup>(50)</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	> 32	Dong, et al. 2020 <sup>(51)</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	< 32	Lu, et al. 2018 <sup>(52)</sup>
<i>Salmonella typhimurium</i>	≤ 8	Doublet, et al. 2004 <sup>(53)</sup>
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	≤ 0.5 - 4	Botinelli, et al. 2022 <sup>(54)</sup>
<i>Mycoplasma synoviae</i>	≤ 0.5 - 4	Catania, et al. 2019 <sup>(55)</sup>

\* Ya se han detectado cepas resistentes al florfenicol en otras especies<sup>(56)</sup>

### 1.3.7 Efectos adversos

La EMA ha declarado que el florfenicol no tiene riesgo de inducir anemia aplásica en el ser humano como el cloranfenicol. Sin embargo, a dosis muy elevadas y durante un tiempo, obviamente mayor al recomendado, se ha encontrado en aves una disminución reversible del número de eritrocitos. A la dosis recomendada e incluso al doble de ella, administrada en el agua de bebida por períodos de 1 semana, o administrado durante 3 semanas en el alimento de aves, no se pudieron detectar afectaciones ni en las cuentas hemáticas ni en las variables productivas como ganancia de peso, conversión alimenticia o consumo de alimento. Con dosis 3-4 veces mayores a las recomendadas, pueden causar tránsito rápido como efecto colateral, aun así, este efecto sólo se presenta esporádicamente en algunas parvadas que tenían historial de haber sido afectadas por este problema.<sup>(6)</sup>

### 1.4 Carbopol

La familia de los carbopoles son polímeros de ácido acrílico de elevado peso molecular reticulado, químicamente entrecruzados con los alcoholes polialquénlicos, los cuales cuentan con excelentes propiedades mucoadhesivas, misma que se postula se debe a la

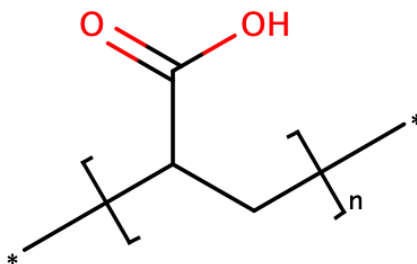
capacidad de sus grupos carboxílicos para la formación de fuertes enlaces de hidrógeno con las cadenas de oligosacáridos que se encuentran en la mucina. Son polvos blancos esponjosos e higroscópicos de partículas primarias que tienen un olor ligeramente ácido y cuentan con un diámetro de 0.2 micrones en promedio.<sup>(57-59)</sup> Su estructura está conformada por elevadas cantidades de grupos carboxílicos y esto da lugar a que poseen la característica de aumentar de tamaño en presencia de agua, se ha calculado que hasta 1000 veces su volumen original y 10 veces su diámetro natural. Esto da lugar a un gel cuando se neutralizan a un pH de 4 – 6 con un buffer básico apropiado. <sup>(57,59)</sup>

Los polímeros carbopol tienen la capacidad de modular la liberación de principios activos, así como dar consistencia a formulaciones líquidas y aglutinantes y aglomerar partículas sólidas. Por su versatilidad, han sido aplicados en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.<sup>(57,59)</sup> En la industria farmacéutica sus aplicaciones específicas son:

- Liberación controlada en cápsulas y tabletas
- Bioadhesión de preparados farmacéuticos para aplicaciones oftálmicas, nasales, bucales, intestinales, vaginales y rectales
- Espesantes para cremas, lociones, geles y parches transdérmicos
- Se le emplea como ingrediente en suspensiones insolubles para aplicaciones orales, suspensiones, productos tópicos y comprimidos
- Emulsificantes de uso tópico en sistemas aceite-agua.<sup>(58)</sup>

El gel de carbopol cumple la función de potencializar la absorción de dos formas; la primera es adhiriéndose a la superficie de la mucosa y literalmente presentando el principio activo ante el TGI a través de un incremento del tiempo de contacto del principio activo con la mucosa y, por otro lado, provoca la apertura transitoria de uniones estrechas de las células del epitelio gastrointestinal.<sup>(60)</sup> Los hidrogeles al ser sensibles al pH presentan un mayor incremento en su volumen en medios alcalinos y además pueden contener altas concentraciones del fármaco y liberarlo estratégicamente.<sup>(61)</sup> En la figura 3 se presenta la fórmula del monómero de carbopol.



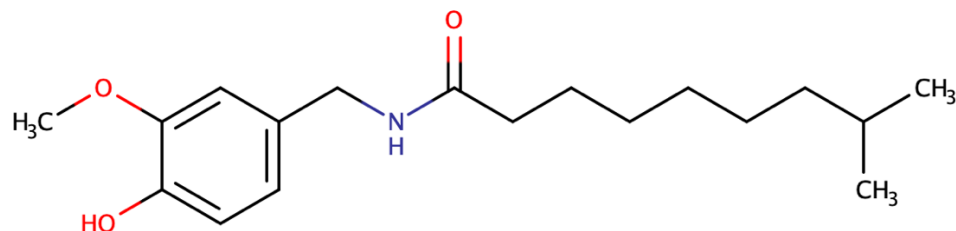


**Figura 3.** Estructura química del monómero del carbopol<sup>(31)</sup>

### 1.5 Capsaicina

Existen más de 20 diferentes capsaicinoides, cuyo origen proviene de plantas del género *Capsicum*. La estructura química de los capsaicinoides se conforma por un núcleo fenólico unido mediante un enlace amida a un ácido graso. En los vegetales se localizan en el tejido de la placenta y su principal función es la protección de las semillas. Es conocido su sabor pungente – picoso de diversa magnitud que se gradúa en unidades Scoville (se le clasifica desde 1000 a 2,000,000 de unidades). Sin embargo, las aves son insensibles a estos, lo cual ha permitido la dispersión de las semillas en el medio silvestre.<sup>(63)</sup>

De la oleoresina de cápsicum extraída de chiles se puede aislar la capsaicina y esta se sintetiza a partir de la combinación de dos precursores, la vanililamina (derivada de la fenilalanina) y el ácido isocáprico (derivado de la valina). Así que el cápsicum es análogo de la vanililamina (8-metil N-vanilil-6-nonenamida;  $C_{18}H_{27}NO_3$ ). Tiene un efecto irritante, pungente y vasoactivo en la pared intestinal, facilitando así la secreción de ácidos gástricos y se asocia a un aumento en la infiltración de las células polimorfonucleares y macrófagos en la mucosa intestinal.<sup>(6,64)</sup> Participa en la transmisión de impulsos nerviosos hacia el SNC, a partir de las fibras sensoriales periféricas aferentes que se localizan en el tracto gastrointestinal y estimula la liberación de una amplia variedad de péptidos contenidos en las terminaciones nerviosas.<sup>(64)</sup> En la figura 4 se presenta la estructura química de la forma estable: la dihidrocapsaicina.



**Figura 4.** Fórmula estructural de la dihidrocapsaicina<sup>(31)</sup>

Los capsaicinoides y la oleoresina de *capsicum* son insolubles en agua y solubles en alcohol, éter y otros solventes orgánicos. Se les atribuyen efectos farmacológicos y recientes investigaciones han determinado aplicaciones específicas, algunas en el tubo gastrointestinal; fomenta la pérdida de peso y se sabe que tiene propiedades analgésicas. Por su estructura fenólica, también tiene una fuerte actividad antioxidante.<sup>(65)</sup> También, se ha encontrado que la capsaicina posee la capacidad de aumentar la absorción de algunos fármacos<sup>(66)</sup> y en evaluaciones del efecto de la palatabilidad, se ha demostrado que puede ser incluida hasta en 20 ppm sin afectar el consumo de alimento y/o agua en las aves.<sup>(43)</sup>

## 1.6 Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia o rendimiento (HPLC) es una herramienta analítica que permite la separación de componentes químicos en una mezcla, los cuales pasan a través de un detector donde pueden identificarse y cuantificarse. Su principal ventaja es que se puede acoplar a diferentes detectores que se eligen dependiendo de la naturaleza del compuesto. Además, es posible detectar niveles de concentración muy bajos (ng/mL). Tiene aplicaciones importantes en diferentes áreas como la farmacéutica, la industria alimentaria, la bioquímica, la industria química, la química forense y la medicina clínica, en la identificación de fármacos, análisis de la composición de alimentos, pruebas enzimáticas en muestras de plasma, en el biomonitorio de elementos tóxicos, evaluación de sustancias de abuso en muestras sanguíneas, entre otras. Un equipo HPLC está constituido de diferentes módulos con funciones definidas, que se encuentran integrados generalmente de la misma forma: recipientes que contienen la fase móvil, una bomba que fuerza el paso de la fase móvil

hacia el sistema a alta presión, un sistema de inyección para introducir la muestra en la fase móvil, una columna, un detector y un dispositivo de recopilación de datos, como lo es un equipo de cómputo.<sup>(67)</sup>

La cromatografía de líquidos requiere de una fase estacionaria y una fase móvil, la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido retenido sobre un soporte sólido. La fase móvil es líquida y cumple la función de conducir la muestra a través de la fase estacionaria.<sup>(68,69)</sup>

El buen funcionamiento en la aplicación del HPLC para una mezcla dada, depende de la integración correcta de las condiciones de ejecución, es decir, la preparación de la muestra, el tipo de columna, la fase móvil y su velocidad de flujo, el diámetro y la longitud de la columna, el tipo de detección, etc.<sup>(70)</sup>

En la separación cromatográfica, la fase móvil avanza en íntimo contacto a través de la fase estacionaria. Al agregar una mezcla de elementos o analitos en la corriente de la fase móvil, cada elemento avanzará a lo largo de todo el sistema con una velocidad desigual que dependerá de su afinidad por las diferentes fases. Por ende, se considera que, al término del recorrido de la muestra por la columna, cada uno de los analitos introducidos en el sistema eluirá con un tiempo de retención distinto, es decir, estarán separados.<sup>(71)</sup>

El tiempo de retención de un analito, es el tiempo que transcurre desde el instante en el que se inyecta la muestra en el equipo hasta el tiempo que corresponde a la altura máxima del pico en el cromatograma del analito de interés. Se espera que los elementos tengan un tiempo de retención diferente, lo cual está sujeto al analito y a diferentes factores como: pH, temperatura, proporción de la fase móvil, velocidad de flujo, naturaleza de la fase estacionaria, diámetro y longitud de la columna, lo cual significa que estas condiciones deben ser controladas si se utiliza un tiempo de retención como método de identificación de un analito.<sup>(71)</sup>

## **2. HIPÓTESIS**

La inclusión de florfenicol en un sistema de liberación modificada tipo FOLA para administración oral en aves de producción en situación de traspatio, logra un mejor comportamiento farmacocinético que a su vez se traduce en mejores proporciones PK/PD en términos de: (1) área bajo la curva de concentración sérica vs tiempo/CMI ( $AUC_{0-24}/CMI$ ) mayor o igual a 50 – 70 y (2) estancia en el organismo más prolongada en concentraciones séricas que estén por arriba o a nivel del valor de la CMI del patógeno dado ( $\%T \geq CMI$  entre intervalos de dosificación).

## **3. OBJETIVOS**

Diseñar a escala de laboratorio un preparado de florfenicol en sistemas de liberación modificada (FOLA) para administración oral en el alimento de aves de producción en condiciones de traspatio

Evaluar la farmacocinética del preparado de florfenicol en FOLA y comparar sus relaciones PK/PD ( $AUC_{0-24}/CMI$  y  $\%T \geq CMI$ ) con el florfenicol estándar administrado en forma de premezcla.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Ubicación**

El muestreo de los animales se realizó en una granja de traspatio ubicada en Antonio Plaza #26, colonia Miguel Hidalgo, Texcoco, Estado de México. Los procedimientos analíticos se realizaron en el Laboratorio de Investigación 2317 en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.

## 4.2 Animales

Se utilizaron 90 aves criollas en condiciones de traspatio clínicamente sanas sin antibioterapia previa, con 60 semanas de producción y un peso corporal de 1.5 kg a 2 kg en promedio. Los animales se mantuvieron en jaulas de tipo piramidal, comederos de tipo canaleta, alimento comercial y bebederos tipo copa con agua *ad libitum* durante todo el experimento.

## 4.3 Diseño de los preparados

Para el grupo experimental 1 se realizó un preparado de florfenicol al 3.5%, 2% de carbopol cbp 100 g de una mezcla de harina de trigo-maíz. Para el grupo experimental 2 se añadió a esta mezcla 0.2% de oleorresina de cápsicum.

## 4.4 Tratamientos

Se administraron tres preparados a dosis única de 20 mg/kg de florfenicol mediante alimentación forzada, incluyendo la premezcla o los pequeños pellets de FOLA en una bolita de masa, constituyendo los siguientes grupos:

- **Grupo Original:** se administró florfenicol (Nuflor® Premix - MSD Salud Animal México)
- **Grupo Exp1 y Exp2:** Se pesó 1 gramo de cada preparado tipo FOLA y se introdujeron directamente en el pico de los animales

## 4.5 Procedimientos de muestreo

Se muestrearon 6 animales de cada grupo por tiempo de muestreo. Se utilizaron jeringas de 3 mL con aguja de color azul, calibre 23G x 25 mm. Las muestras sanguíneas se obtuvieron de la vena radial con un máximo de 2 mL en cada ocasión y ningún ave fue muestreada más de dos veces. Los tiempos de muestreo fueron de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18 y 24 horas. Las muestras obtenidas de cada animal se colectaron en tubos Vacutainer sin anticoagulante y se centrifugaron a 5,000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero sanguíneo, el cual se recolectó en pipetas Pasteur de plástico para poder ser traspasado a microtubos, los cuales se

mantuvieron en congelación (-20°C) hasta la realización del método de extracción del florfenicol y evaluación de HPLC+.

## **4.6 Procedimientos analíticos**

### **4.6.1 Preparación de disoluciones *stock***

Se elaboraron soluciones estándar de florfenicol de 2000 ppm en metanol. A partir de esta solución se preparó una disolución de trabajo de 100 ppm usando como disolvente agua desionizada.

### **4.6.2 Preparación de disoluciones estándar**

Se prepararon soluciones de florfenicol de concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 y 20 ppm que funcionaron como estándares para la calibración de la curva estándar en el equipo HPLC.

### **4.6.3 Preparación de muestras y extracción**

Se fortificaron sueros blancos a concentraciones de florfenicol de 2, 5 y 10 µg/mL, para evaluar la metodología a utilizar. Tanto los sueros fortificados como las muestras se trataron por duplicado. Se tomaron 0.5 mL de suero, se añadieron 100 µL de NH<sub>4</sub>OH 1M, se mezclaron completamente y se adicionó 1 mL de una mezcla de metanol/acetato de etilo 1:2 que funcionó como disolvente de extracción para la muestra. Posteriormente cada vial fue centrifugado a 12,000 rpm durante 15 minutos. Una vez centrifugados, se decantó el sobrenadante en tubos transparentes de vidrio con capacidad de 5 mL. La extracción con la mezcla de metanol/acetato de etilo 1:2 se repitió 2 veces y se colectó todo en el mismo tubo. Los extractos se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 días. Una vez secos, se agregó 1 ml de fase móvil que consistió en una mezcla de agua y acetonitrilo en una proporción de 60:40. Se mezclaron homogéneamente de forma manual procurando que las paredes de los tubos quedaran totalmente impregnadas de la fase móvil. Cada solución se

vertió en un vial Eppendorf y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante de cada vial se filtró con una membrana de nylon de 13 mm y 0.45  $\mu\text{m}$  para ser colocado en un vial ámbar de 2 mL para HPLC.

#### **4.7 Condiciones cromatográficas de análisis**

Los extractos de las muestras se analizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) marca JASCO, modelo XLC, con un detector de arreglo de diodos y se monitoreó a  $\lambda = 223 \text{ nm}$ . La columna empleada fue Nucleosil 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 150 mm, con una presión de 1200 psi y la fase móvil agua/acetonitrilo 65:35 con un flujo de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$ .

#### **4.8 Procesamiento de datos**

Una vez analizadas las muestras y los estándares mediante HPLC, se integraron los resultados mediante el software EZ Chrom Elite.

#### **4.9 Análisis estadístico**

Se realizó una ANOVA y Dunn test. Todas las diferencias significativas se basaron en  $P < 0.05$ . Los análisis se realizaron con el software de IBM SPSS® Statistics 20.

## 5. RESULTADOS

Durante la realización del experimento no se presentaron efectos adversos en ningún animal.

### 5.1 Evaluación del disolvente de extracción

Para evaluar la metodología a utilizar, se fortificaron sueros blancos a 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de florfenicol. La técnica consistió en colocar 0.5 mL de suero, 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  y 1 mL de disolvente de extracción en viales Eppendorf con capacidad de 2 mL. Los disolventes de extracción evaluados fueron acetato de etilo y una mezcla de metanol con acetato de etilo 1:2. El suero con el disolvente de extracción se homogeneizó en un Vortex y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos para asegurar que el sobrenadante no presentará ningún residuo sólido.

El sobrenadante se colocó en vasos de precipitado de 10 mL y se repitió dos veces el mismo procedimiento agregando 1 ml del disolvente de extracción y centrifugando entre cada una. Se permitió que la fase orgánica se evaporara a temperatura ambiente y una vez seca la muestra se añadió 1 ml de fase móvil que consistió en una mezcla de agua y acetonitrilo en una proporción 65:35. Se mezcló homogéneamente procurando que las paredes del tubo quedaran totalmente impregnadas de la fase móvil y después se procedió a filtrar el líquido con una membrana de nylon de 13 mm y 0.45  $\mu\text{m}$  para ser colocado en un vial ámbar de 2 mL para HPLC. Las condiciones cromatográficas fueron las descritas en el apartado de materiales y métodos. Utilizando acetato de etilo como disolvente de extracción en los sueros fortificados de 5 y 10 ppm, se observó que los recobros eran de 69 y 66% respectivamente (cuadro 3).

Por otra parte, utilizando la mezcla de metanol/acetato de etilo 1:2 como disolvente de extracción, se observó que los recobros eran mayores (cuadro 3).

**Cuadro 3.** Recuperación de florfenicol utilizando dos diferentes fases de extracción

Fortificados (ppm - $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Acetato de etilo (%)	Metanol / Acetato de etilo 1:2 (%)
5 ppm	69	102
10 ppm	66	84

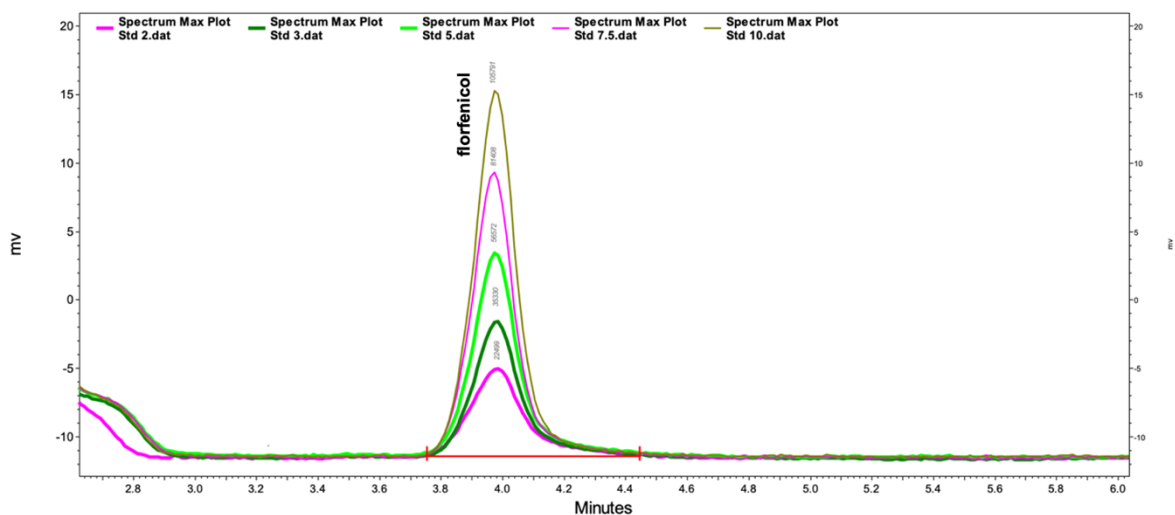


A partir de este momento, con los datos obtenidos en el cuadro 3, se utilizó la mezcla de metanol/acetato de etilo 1:2 como fase de extracción para continuar con el tratamiento de las muestras. Sin embargo, aunque el porcentaje de recuperación era mayor, se incrementó la dificultad para separar la fase orgánica de la fase acuosa, por lo que se decidió centrifugar todas las muestras a 12,000 rpm en cada paso de extracción con el disolvente durante 15 minutos para facilitar la separación de las fases.

## 5.2 Linealidad del sistema

En la figura 5 se muestran los cromatogramas de los estándares de florfenicol y su respuesta analítica en un intervalo de 2 a 10 ppm.

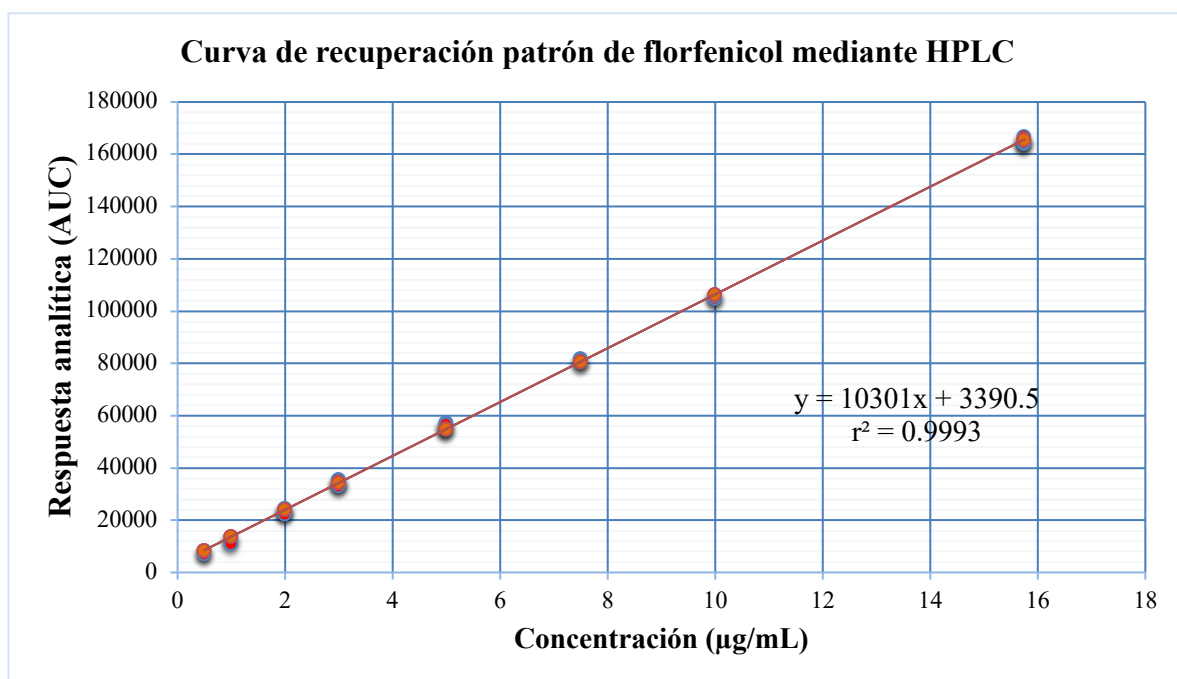
Las áreas obtenidas para los estándares de florfenicol analizados mediante HPLC en el intervalo de 0.5 a 15.75 ppm, se presentan en el cuadro 4 y se muestran en la gráfica de la figura 6.



**Figura 5.** Cromatogramas obtenidos para el intervalo de concentración de 0.5 a 15.75 ppm de florfenicol, adquiridos a 223 nm

**Cuadro 4.** Linealidad del sistema en la metodología analítica por HPLC

Preparaciones	Concentración (ppm)	Respuesta analítica (Área Bajo la Curva)		
		1	2	3
1	0.5	7305	8359	
2	1	13155	11081	
3	2	23724	22499	24640
4	3	35593	35330	33175
5	5	57422	56572	56618
6	7.5	81845	81408	
7	10	104935	105791	
8	15.75	166738	164278	164545



**Figura 6.** Curva de calibración/regresión del sistema para florfenicol (AUC = área bajo la curva del cromatograma)

Los resultados del cuadro 4 y figuras correspondientes muestran que existe una relación lineal entre la concentración de florfenicol y la respuesta del equipo HPLC en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 15.75 ppm. Los parámetros del análisis de esta regresión se presentan en el cuadro 5.

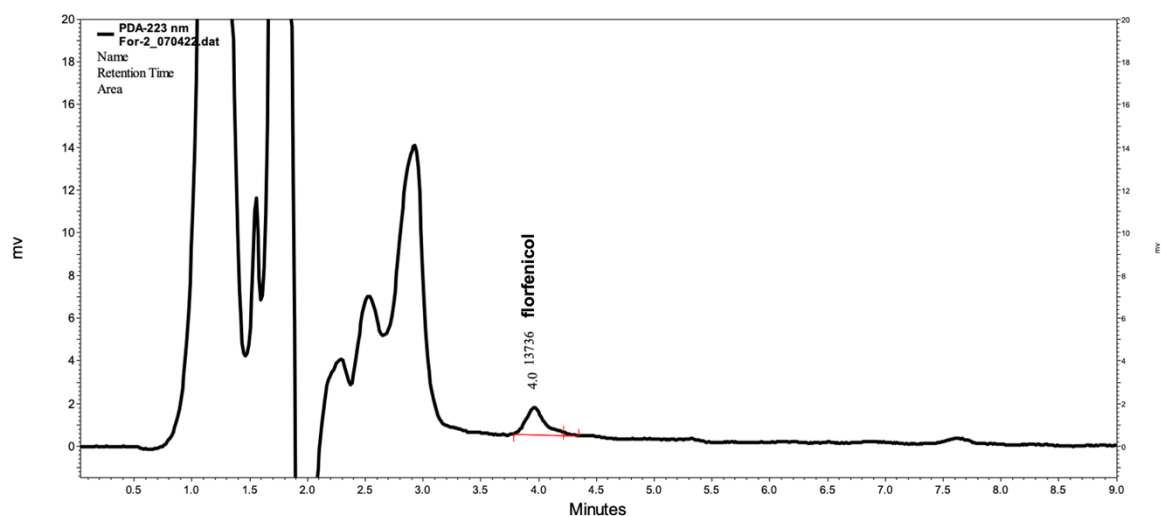
**Cuadro 5.** Resultados de la regresión lineal de los estándares de florfenicol

Ecuación de la recta	$y = 10301x + 3390.5$
$r^2$	0.999
$Sy/x$	1420.6001
$m = 10301.114$	$Sm1 = 62.96$
	$ICm = 10168.83 - 10433.39$
$b = 3390.4785$	$Sb0 = 482.23$
	$ICb = 2377.34 - 4403.61$

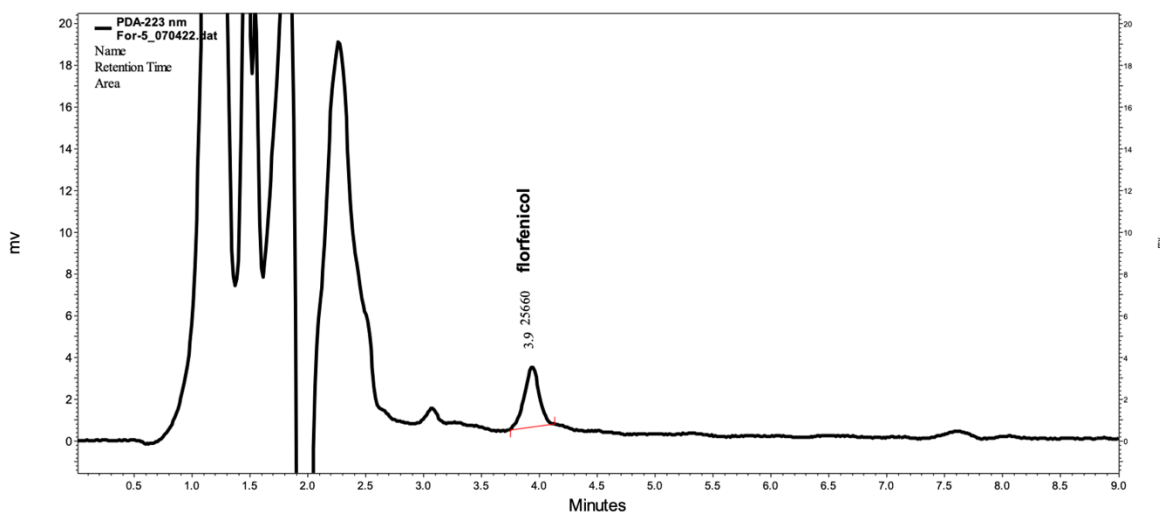
El análisis de regresión muestra un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.999, que indica una relación lineal entre la concentración y la respuesta del instrumento.

### 5.3 Linealidad del método

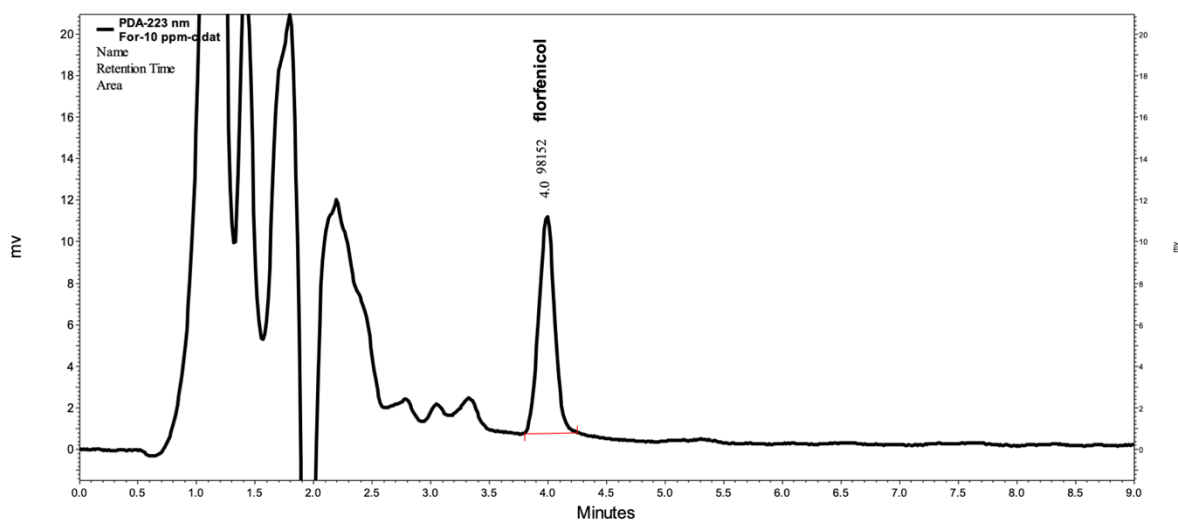
Para evaluar la linealidad del método, se prepararon sueros fortificados a 3 diferentes concentraciones (2, 5 y 10 ppm) y se obtuvo el porcentaje de recuperación. En las figuras 7, 8 y 9 se muestran los cromatogramas obtenidos. Los resultados se presentan en el cuadro 6 y la gráfica en la figura 10.



**Figura 7.** Cromatograma de suero de gallina de traspatio fortificado con florfenicol a 2 ppm.



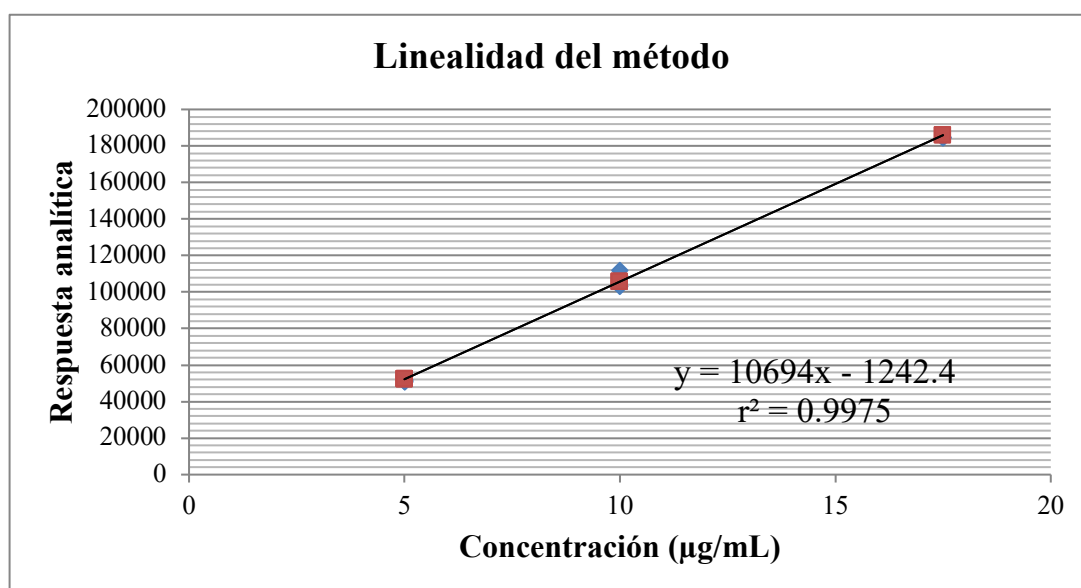
**Figura 8.** Cromatograma de suero de gallinas de traspatio fortificado con florfenicol a 5 ppm



**Figura 9.** Cromatograma de suero de gallinas de traspatio fortificado con florfenicol a 10 ppm

**Cuadro 6.** Resultados de la linealidad de la metodología analítica para cuantificación de sueros fortificados con florfenicol en HPLC

Suero fortificado	Respuesta analítica (Área)	Cantidad adicionada (x) µg/mL	Cantidad recuperada (y) µg/mL	% de recobro
2 ppm	17876	2	2.07	103.83
5 ppm	51060	5	5.19	103.86
10 ppm	99788	10	10.51	105.16



**Figura 10.** Curva de linealidad del método en sueros fortificados con florfenicol a 2, 5 y 10 ppm (µg/mL)

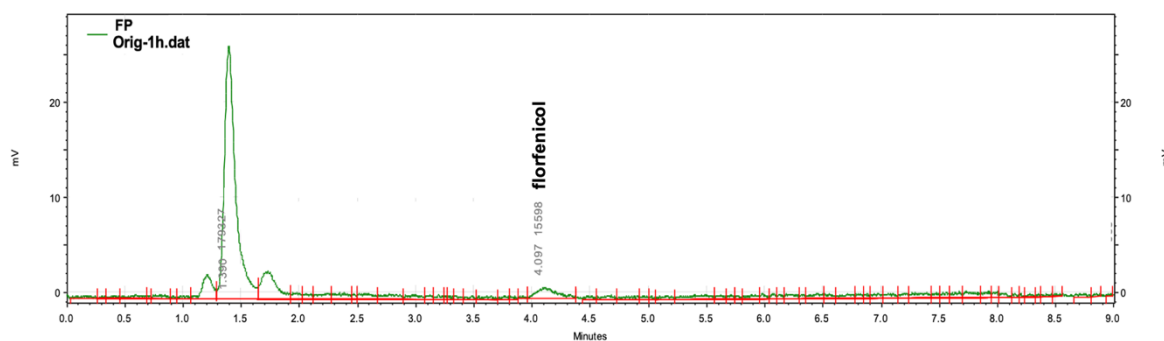
El análisis de regresión presentó un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9975, y un coeficiente de variación de 2.92, aceptables para un método lineal.<sup>(72)</sup> De tal suerte que, con el método ya establecido, se realizó el análisis y procesamiento de las muestras de suero obtenidas. Los resultados obtenidos de cada animal y el promedio se presentan en los cuadros 7, 8 y 9 y las figuras 11-20. En la figura 21 se presentan los tres grupos tratados con florfenicol y en el cuadro 10 se resumen los datos farmacocinéticos logrados con cada preparado. En el cuadro 11 se presentan 4 ejemplos de relaciones PK/PD ( $AUC_{0-24}/CMI$  y

%T  $\geq$  CMI) para cuatro tipos de bacterias patógenas tomadas de la bibliografía formal: dos sensibles, una medianamente sensible y una resistente.

## 5.4 Resultados experimentales

**Cuadro 7.** Valores obtenidos en el GO dosificado con el producto Nuflor® premix

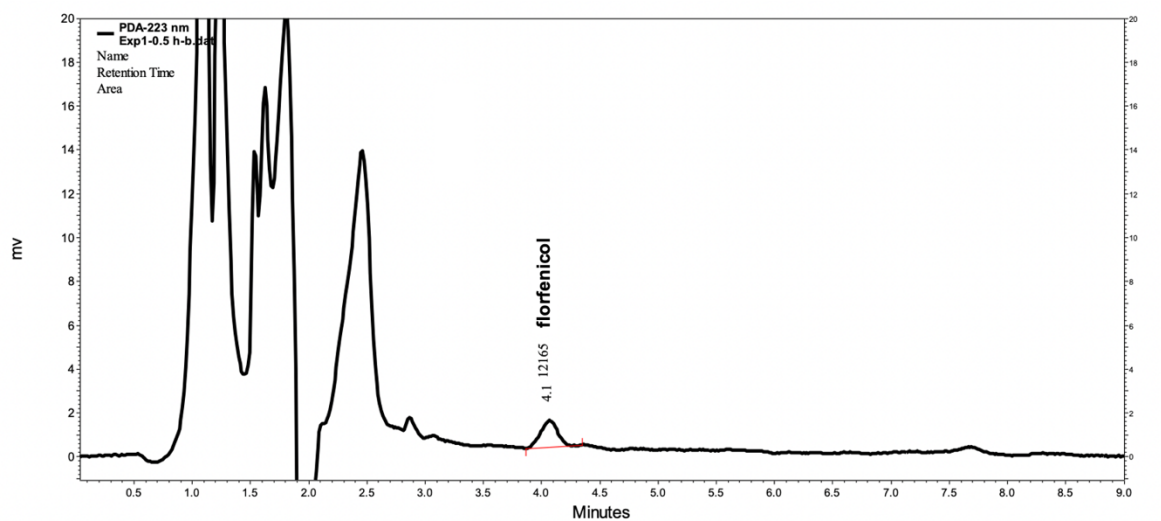
Grupo Nuflor® Hora	Gallina						Promedio	± 1DE
	1	2	3	4	5	6		
0.5	0.78	0.76	0.94	0.79	0.85	0.81	0.82	0.06
1	8.74	8.24	8.34	8.12	8.45	8.92	8.5	0.30
2	3.6	3.2	2.98	3.6	3.1	2.7	3.2	0.355
4	1.6	1.3	1.7	1.9	2.1	1.6	1.7	0.27
6	0.61	0.59	0.69	0.68	0.61	0.66	0.64	0.04
8	0.19	0.24	0.26	0.21	0.21	0.28	0.23	0.03
12	0.1	0.11	0.17	0.16	0.18	0.14	0.14	0.03
18	0.07	0.08	0.09	0.08	0.08	0.09	0.08	0.01
24	0	0	0	0	0	0	0	0



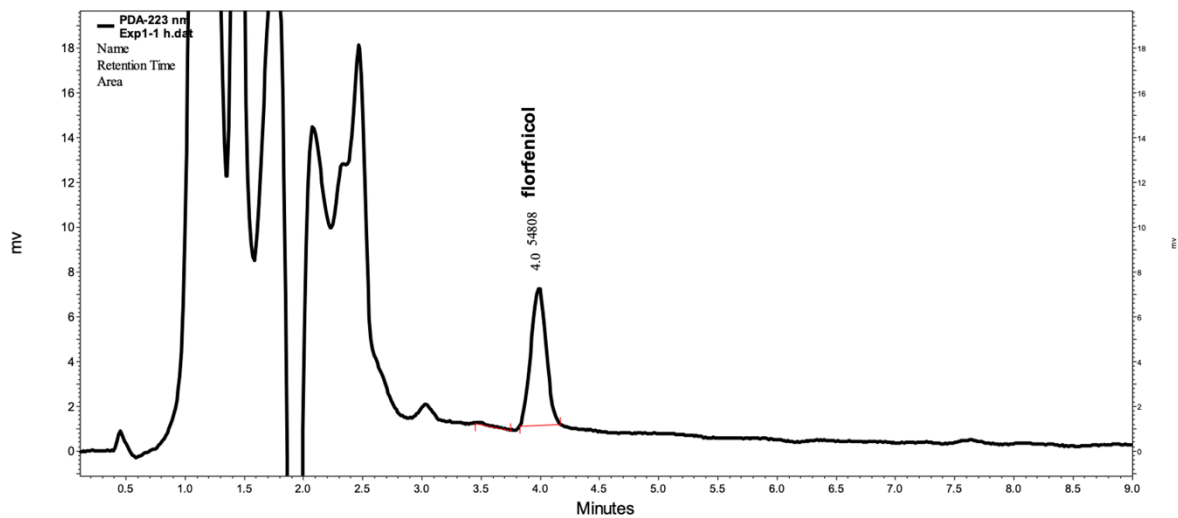
**Figura 11.** Cromatograma del GO con el producto Nuflor® premix a la hora.

**Cuadro 8.** Valores obtenidos en el grupo Exp 1 con el preparado de florfenicol en FOLA prototipo experimental 1

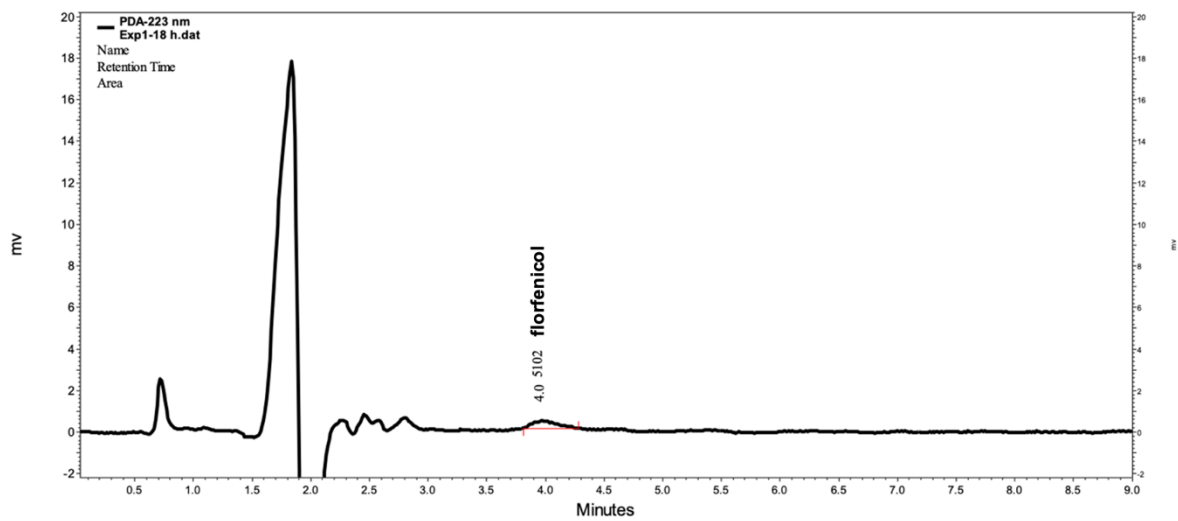
Grupo Exp 1	Gallina						Promedio	± 1 DE
	Hora	1	2	3	4	5		
0.5	3.74	3.5	3.21	3.36	3.8	3.7	3.55	0.23
1	8.16	8.05	8.41	8.23	8.12	8.11	8.18	0.13
2	6.21	6.13	6.21	6.19	6.08	6.03	6.14	0.07
4	2.31	2.32	2.18	2.28	2.18	2.27	2.26	0.06
6	2.08	2.2	1.98	1.99	1.98	2.14	2.06	0.09
8	1.95	1.91	1.72	1.81	1.85	1.92	1.86	0.08
12	1.43	1.49	1.57	1.61	1.7	1.59	1.57	0.09
18	1.1	1.16	1.13	1.11	1.21	0.98	1.12	0.07
24	1.03	1.02	0.98	1.05	1.1	0.85	1.01	0.08



**Figura 12.** Cromatograma del preparado experimental 1 a las 0.5 h.



**Figura 13.** Cromatograma del preparado experimental 1 a la hora.

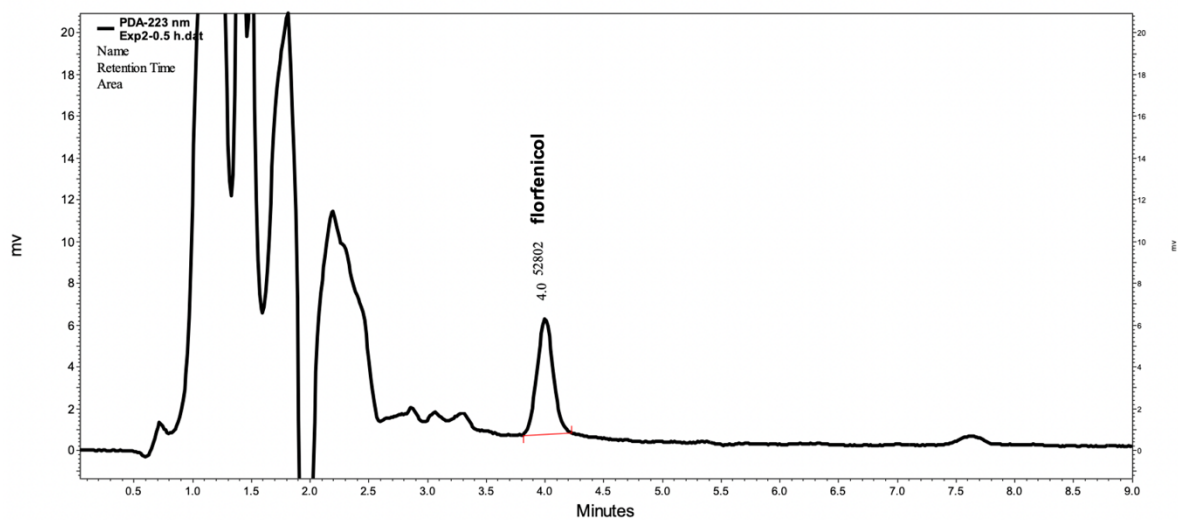


**Figura 14.** Cromatograma del preparado experimental 1 a las 18 h.

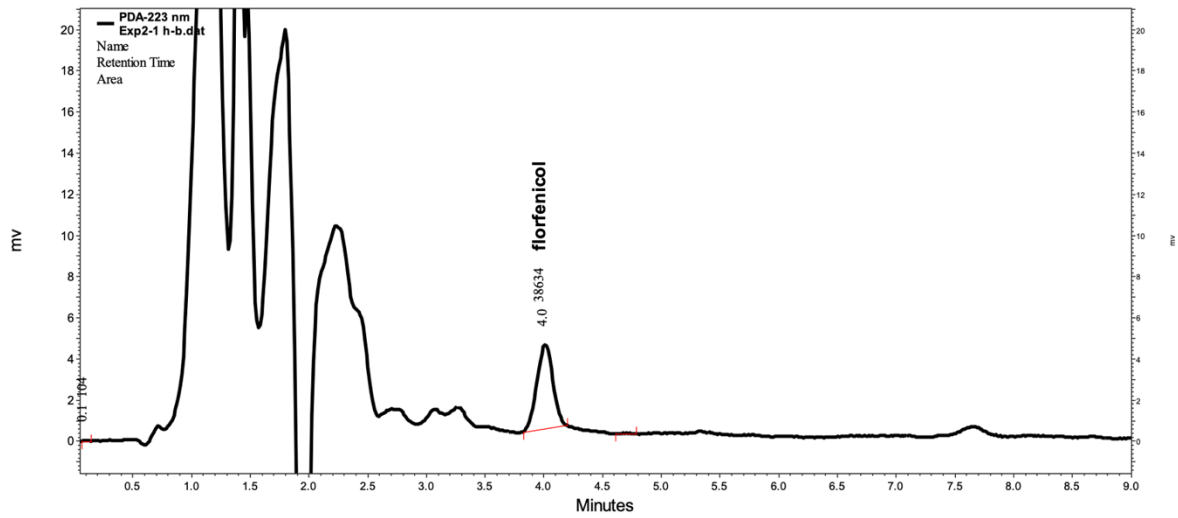


**Cuadro 9.** Valores obtenidos en el grupo Exp2 con el preparado prototipo FOLA experimental 2

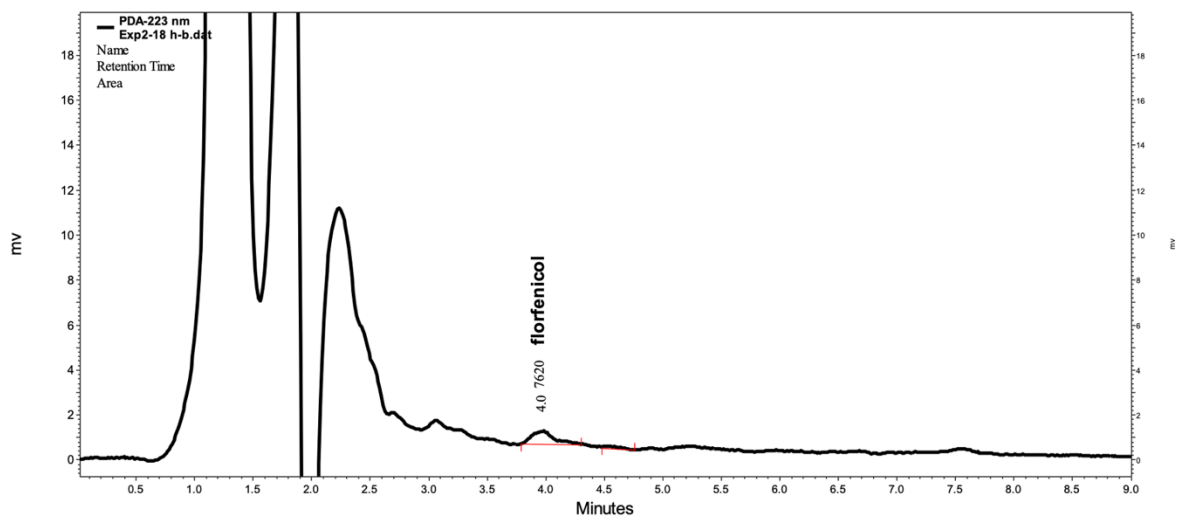
Grupo Exp 1	Gallina						Promedio	± 1 DE
	Hora	1	2	3	4	5		
0.5	9.31	8.92	9.56	9.14	9.12	9.21	9.21	0.21428952
1	10.31	10.54	10.12	10.28	10.42	10.54	10.37	0.16400203
2	5.6	4.2	4.4	4.1	4.8	4.8	4.65	0.55045436
4	1.89	2.2	1.9	2.25	2.8	2.5	2.26	0.35194697
6	1.9	2.12	2.11	1.89	2.3	2.2	2.09	0.16342174
8	1.71	1.68	1.8	1.91	1.6	1.9	1.77	0.12484657
12	1.59	1.62	1.46	1.58	1.43	1.52	1.53	0.07633261
18	1.57	1.59	1.41	1.55	1.41	1.5	1.51	0.07943551
24	1.36	1.41	1.36	1.43	1.34	1.4	1.38	0.0350238



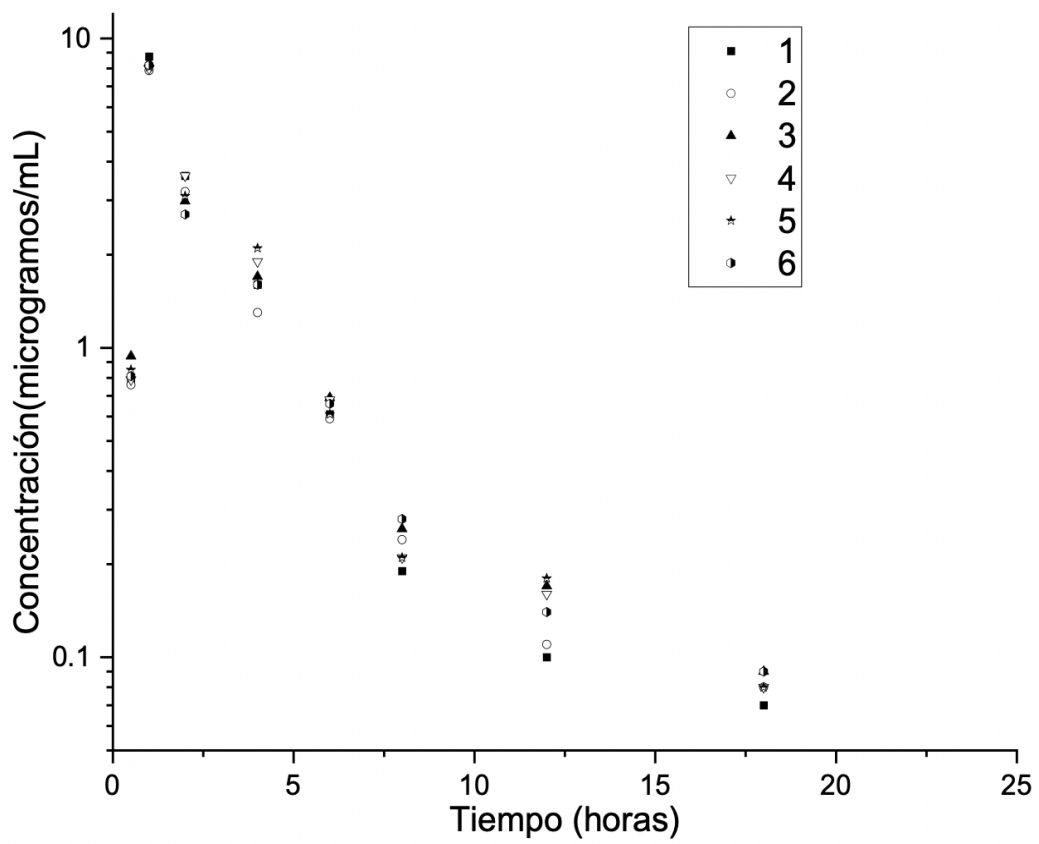
**Figura 15.** Cromatograma del preparado experimental 2 a las 0.5 h.



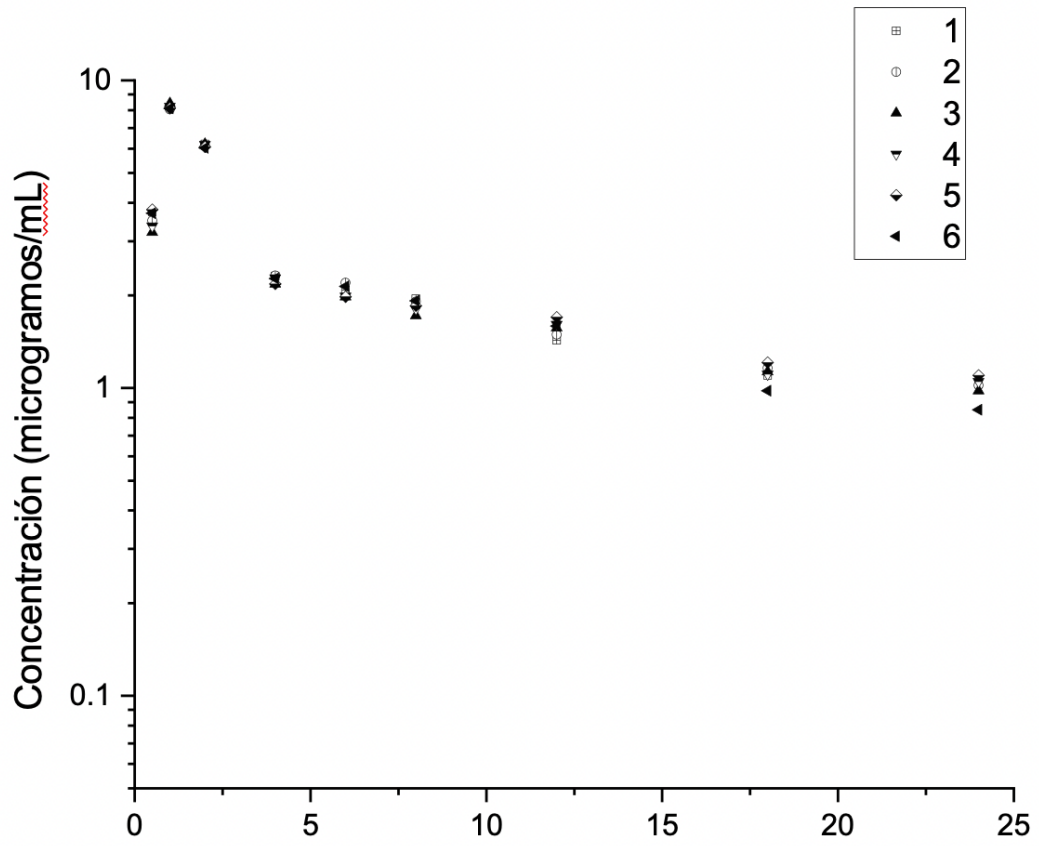
**Figura 16.** Cromatograma del preparado experimental 2 a la hora.



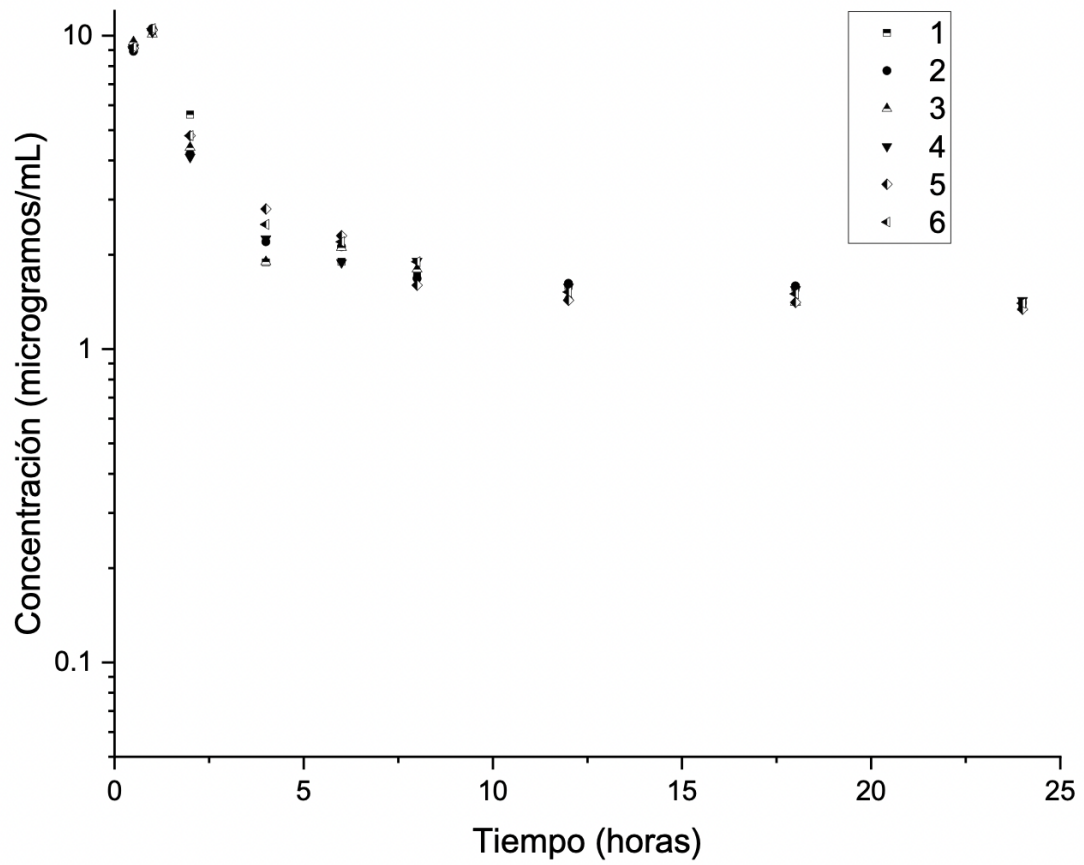
**Figura 17.** Cromatograma del preparado experimental 2 a las 18 h.



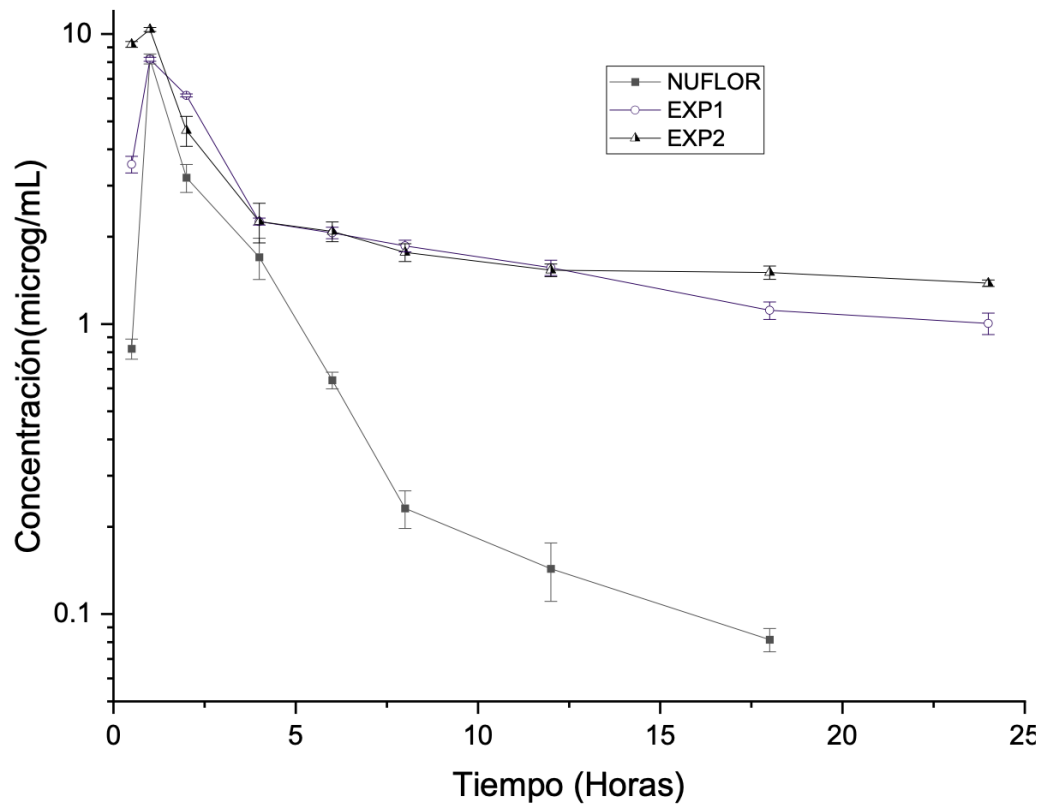
**Figura 18.** Curva de concentraciones vs tiempo de florfenicol en gallinas de traspatio en el grupo que recibió una dosis de 20 mg/kg del preparado Original (Nuflor® premezcla)



**Figura 19.** Curva de concentraciones vs tiempo de florfenicol en gallinas de traspatio en el grupo que recibió una dosis de 20 mg/kg del preparado Experimental 1



**Figura 20.** Curva de concentraciones vs tiempo de florfenicol en gallinas de traspatio en el grupo que recibió una dosis de 20 mg/kg del preparado Experimental 2



**Figura 21.** Curva de concentraciones vs tiempo de los tres grupos dosificados con diferentes preparados orales de florfenicol a dosis de 20 mg/kg

**Cuadro 10.** Promedios  $\pm$  1DE de las variables farmacocinéticas de florfenicol en aves dosificadas a razón de 20 mg/kg administrados por vía oral directamente en el pico y con tres diferentes preparados del antimicrobiano: el producto de referencia (GO) y dos prototipos elaborados con la forma farmacéutica FOLA.

VARIABLE FARMACOCINÉTICA	GO		Exp 1		Exp 2	
	PROM	$\pm$ 1 DE	PROM	$\pm$ 1 DE	PROM	$\pm$ 1 DE
$T_{1/2\beta}$ (h)	2.35	0.12	6.42	0.9	8.72	0.48
$K_{1/2ab}$ (h)	0.86	0.14	0.42	0.09	0.10	0.04
$T_{MAX}$ (h)	1.23	0.31	1.28	0.22	1.07	0.01
$C_{MAX}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	7.17	0.72	8.65	0.81	10.31	1.25
$AUC_{0-24}$ ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ )	17.25	2.42	33.50	2.93	41.18	5.1
$AUC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}^2$ )	42.32	5.74	137.22	11.28	162.01	13.68
MRT (h)	3.45	0.71	6.10	0.32	7.03	0.45
$AUC_T$ ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ )	18.14	2.32	52.38	8.89	59.62	6.61
F %	100%		288.75		328.7	

$T_{1/2\beta}$  = vida media de eliminación;  $K_{1/2ab}$  = Constante de absorción;  $T_{MAX}$  = Tiempo al que se logra la  $C_{MAX}$ ;  $C_{MAX}$  = Concentración plasmática máxima;  $AUC_{0-24}$  = Área bajo la curva de 0 a 24 hrs; MRT = tiempo medio de residencia;  $AUC_{0-\infty}$  = Área bajo la curva desde cero a infinito;  $AUC_T$  = Área bajo la curva trapezoidal.

**Cuadro 11.** Relaciones PK/PD de tres preparados a base de florfenicol oral en gallinas de traspatio (GO = premezcla de referencia de Nuflor® y dos formas experimentales elaboradas tipo FOLA [EXP 1 y EXP 2]). Se determinaron el área bajo la curva en 24 horas dividido entre uno de dos valores de CMI ( $AUC_{0-24}/CMI$ ) y por ciento del tiempo en el que el florfenicol se encuentra por arriba de la CMI para los mismos patógenos seleccionados conforme a la literatura formal y en un intervalo de dosificación de 24 horas ( $\%T \geq CMI$ )

<b>PK/PD</b>	<b>Patógeno CMI90 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)*</b>	<b>GO</b>	<b>Exp 1</b>	<b>Exp 2</b>
<b><i>Pasteurella multocida</i></b>				
AUC <sub>0-24</sub> /CMI	0.25	69	134	165
%T $\geq$ CMI	0.25	31%	> 100%	> 100%
<b><i>Escherichia coli</i></b>				
AUC <sub>0-24</sub> /CMI	2.0	8.6	17	20
%T $\geq$ CMI	2.0	16%	30%	30%
<b><i>Mycoplasma gallisepticum</i></b>				
AUC <sub>0-24</sub> /CMI	0.5	34.5	67	82.4
%T $\geq$ CMI	0.5	25%	>100%	>100%
<b><i>Mycoplasma synoviae</i></b>				
AUC <sub>0-24</sub> /CMI	4.0	4.3	8.4	10.3
%T $\geq$ CMI	4.0	10.4%	17%	17%

\* Valores tomados de (54,55,73,74)



## 6. DISCUSIÓN

Las enfermedades bacterianas del árbol respiratorio son el principal problema en la producción avícola mundial. Diversos factores contribuyen a ello y entre los que destacan se pueden incluir: el medio ambiente, la presencia de agentes infecto-contagiosos, el manejo, la ventilación de la caseta, la densidad poblacional, el estado de la cama y la susceptibilidad de la estirpe. En mayor o menor medida, hay que considerar estos puntos para abatir la aparición de enfermedades respiratorias en la granja o en las condiciones de traspatio.<sup>(75)</sup> A pesar de lo dicho, no es poco común que se presenten enfermedades bacterianas del árbol respiratorio en aves comerciales. Dentro de los agentes infecciosos, se pueden encontrar virus, bacterias, hongos y micoplasmas y estos pueden actuar solos o de manera asociada, provocando diferentes cuadros clínicos en las parvadas. Por ejemplo, la asociación de un agente infeccioso primario como el *Mycoplasma* spp con uno o varios agentes bacterianos oportunistas, da como resultado la presentación de un brote de una enfermedad respiratoria complicada y es imperativo que se le controle con el uso de antibióticos, tanto por el bienestar de la parvada como por la relación de costo:beneficio de la operación, pues a menudo el problema llega a causar mortalidad elevada y con esto, pérdidas económicas en la producción a nivel granja o traspatio.<sup>(76)</sup>

En particular y como es de deducirse, en el sistema de traspatio el manejo sanitario es escaso o nulo y las medidas de bioseguridad son limitadas o ausentes, lo cual favorece el ingreso y la transmisión de enfermedades infecciosas.<sup>(19)</sup> Con asistencia del médico veterinario se deben utilizar antimicrobianos de manera metafiláctica y de acuerdo con la NOM-064-ZOO-2000.<sup>(77)</sup> No obstante, dado el manejo que se tendrá de ellos en las condiciones de traspatio, es necesario que se haga uso óptimo de este recurso. Esto es, para un pequeño productor, la compra de sacos de premezclas de florfenicol que se utilicen para acondicionar alimento es muy difícil pues no se cuenta con equipo e instalaciones adecuadas como revolvedoras de pequeño volumen, sitios de almacén, alimento con granulometría específica que garantice eficiencia de mezclado, etc. En este sentido, el florfenicol en forma de FOLAs (pequeños *pellets* de color) ofrecen una ventaja importante pues su incorporación a las dietas de los pollos y gallinas de traspatio es considerablemente más sencilla v.g., un kg de FOLAs (*pellets*) en 100 kg de alimento.

El florfenicol, es un antibiótico que ha sido utilizado para el tratamiento de patologías digestivas y sobre todo respiratorias. Posee la característica de abatir la mortalidad con rapidez y se sabe que tiene una muy baja tasa de resistencia bacteriana, al menos comparado con los antimicrobianos utilizados habitualmente en avicultura como las fluoroquinolonas, las tetraciclinas y algunos macrólidos.<sup>(74)</sup> No obstante, es esencial que, cuando el veterinario haya decidido que es necesario su uso, se optimice la utilización del florfenicol y dado que esa fue la principal motivación de este trabajo, se puede puntualizar que se logró el objetivo planteado con los preparados descritos (Exp1 y Exp2). En otras palabras, cuando sea necesario utilizar florfenicol, se postula que se intente cumplir de la mejor manera con las variables PK/PD que se han identificado como necesarias para el uso de este antimicrobiano, que como se ha comentado es considerado dependiente del tiempo, esto es: que logre un  $AUC_{0-24}/CMI \geq 60$  y que el  $\%T \geq CMI$  se acerque al 100% del intervalo de dosificación. En ese sentido, las principales variables farmacocinéticas de las tres formas farmacéuticas de florfenicol reflejan que es posible modificar el comportamiento del principio activo. Las variables obtenidas para el preparado de referencia son congruentes con otros estudios en cuanto a los rangos logrados, aunque con las diferencias que se generan por factores biológicos como las diferentes estirpes, edades, cantidad de lípidos en el alimento<sup>(27,38,39,43)</sup>, alojamientos, etc. y por las técnicas analíticas.<sup>(44,78)</sup> De hecho, Abo El-Ela<sup>(78)</sup> buscando mejorar las variables PK/PD del florfenicol, como en este estudio, lo combinó con vitamina E, logrando mejoras notables en las variables clave ya mencionadas. En este estudio, con el preparado de Nuflor® premix (MSD Salud Animal México) tomado en este estudio como preparado de referencia, se obtuvo una  $C_{max}$  de 7.17  $\mu\text{g/mL}$  y una  $T_{max}$  de 1.23 h. Estos valores no son muy distintos de los logrados con los preparados experimentales (Exp1 =  $C_{max}$  = 8.65  $\mu\text{g/mL}$  y  $T_{max}$  = 1.28 h; Exp2 con una  $C_{max}$  = 10.31  $\mu\text{g/mL}$  y una  $T_{max}$  de 1.25 h). Sin embargo, la tasa de eliminación representada por la vida media de eliminación ( $T_{1/2\beta}$ ) fue notoriamente más rápida para el preparado referente con respecto a los dos preparados experimentales (2.35 h para Nuflor®; Exp1 = 6.42 h y Exp2 = 8.72 h) y esto genera notables diferencias en la biodisponibilidad de los preparados con ventaja notable para los prototipos experimentales evaluados. De tal suerte que los preparados como FOLAs presentaron valores de  $AUC_{0-24}$  94% y 138% mayores para Exp1 y Exp2, respectivamente (véase cuadro 10).

Evidentemente las relaciones PK/PD son favorables para estos prototipos con respecto al referente y la carga de antimicrobiano que recibe cada organismo ( $AUC_{0-24}$ ) será mayor (cuadro 11). También vale la pena resaltar que la fabricación de pellets tipo FOLAs no añade un costo oneroso a la dosificación del florfenicol y por ello, desde el punto de vista de cuidar el uso de antimicrobianos con diseños farmacéuticos que mejoren las variables PK/PD, es factible proponer el uso a mayor escala de ambos preparados, en particular el preparado Exp2.

Una variable que aún puede y debe buscarse la forma de mejorarse es la de la  $T_{1/2\beta}$  y el MRT (tiempo medio de residencia) pues la relativamente rápida eliminación del florfenicol en aves obligaría a una dosificación adicional en el día, lo cual es complicado dado el manejo en naves comerciales y quizá un poco más fácil como parte de un tratamiento en aves de traspatio a las cuales se les puede dar el alimento en dos ocasiones en el día, por ejemplo, junto con las FOLAs del prototipo Exp2. En este estudio se logró que las concentraciones de los preparados Exp1 y Exp2 alcanzaran un 100% del valor de  $\%T > CMI$  entre intervalos de dosificación de 24 h, pero solo cuando la CMI es de aproximadamente  $0.25 \mu\text{g/mL}$ . Si se considera un valor más elevado como  $2 \mu\text{g/mL}$  que ha sido propuesto como el punto de corte o “*breakpoint*”,<sup>(79-81)</sup> entonces sería necesario re-dosificar una vez adicional por día. Esto mismo sucedió en el estudio de florfenicol con vitamina E, en el que solo se logró aumentar el valor de MRT de 4.95 h a 5.57 h.<sup>(78)</sup> En este estudio el prototipo Exp2 mejoró el valor de MRT de 3.45 h a 7.03 h y con ello el valor de  $\%T \geq CMI$ , pero aún no al 100% para el valor de  $20 \mu\text{g/mL}$ , de tal suerte que aún existe margen para mejorar los prototipos tipo FOLA aquí evaluados. De hecho, la patente de FOLAs (No.MX/a/2012/01,3222 y PCT/MX2013/000137; Universidad Nacional Autónoma de México) propone muchos otros vehículos que pudieran mejorar la relación de  $\%T \geq CMI$  y quizá se puedan agregar promotores de la biodisponibilidad como la vitamina E, cantidades adicionales de capsaicina y algunas bases oleosas, pues se sabe que la F del florfenicol se mejora en presencia de grasas.<sup>(43)</sup>

## 7. CONCLUSIONES

En este estudio, los resultados demuestran que con esta presentación farmacéutica (FOLA), a dosis única de 20 mg/kg de peso vivo, utilizando vehículos como carbopol y capsaicina, se logra un incremento en la biodisponibilidad y el tiempo de acción del florfenicol, por lo que podría resultar útil en el tratamiento contra algunos de los principales patógenos que afectan a las aves de producción, como lo son *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae*.

Considerando las condiciones en las que se maneja el sistema de producción de traspatio, se recomienda colocar el producto en un comedero o recipiente limpio y seco, evitando que las FOLAS tengan contacto con materia orgánica, exposición al sol o cualquier otro factor que pudiera alterar la efectividad de las mismas.

Se recomienda realizar estudios para determinar la cinética *ad libitum*, estudios de dosis múltiples, estudios clínicos de eficacia y establecer un tiempo de retiro adecuado para este nuevo diseño farmacéutico.

## 8. REFERENCIAS

1. Alba de la Torre F. Análisis retrospectivo y prospectivo del desarrollo de la resistencia bacteriana. Tesis de licenciatura. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
2. OIE. Informe anual de la OIE sobre los agentes antimicrobianos destinados a ser utilizados en los animales. Organización Mundial de Sanidad Animal; 2021. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/09/e-fifth-annual-report-amr.pdf>
3. Cortés Silva J. Estudio de la resistencia bacteriana en animales de abasto. Tesis de licenciatura. España: Universidad de Extremadura; 2019.
4. Jacho Ortiz KE. Papel del farmacéutico en el uso racional de antibióticos. Tesis de maestría. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2019.
5. Torres Manrique C. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. 2012. <https://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento48.pdf>
6. Sumano H, Gutiérrez L. Farmacología Clínica en Aves Comerciales. 4a ed. México: Mc Graw Hill Interamericana; 2009.
7. Ruíz J, Albañil MR. Consumo de antibióticos y prevención de las resistencias bacterianas. Revista Pediatría Atención Primaria . 2018;20(27):13–21.
8. OMS. Resistencia a los antibióticos. Organización Mundial de la Salud; 2020. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
9. OMS. Resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud; 2020. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
10. Quezada IE. Prevalencia de ectoparásitos en gallinas (*Gallus-gallus domesticus*) de traspatio de una región del centro de Oaxaca. Tesis de licenciatura. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
11. Molina P. Comparación de dos sistemas de producción y de manejo sanitario de las aves criollas de traspatio en los municipios de Ignacio de la Llave y Teocelo, Veracruz. Tesis de licenciatura. México, Veracruz: Universidad Veracruzana; 2013.
12. Pereira C, Maycotte C, Restrepo E, Mauro F, Calle A, Velarde M. Sistemas de Producción Animal I. 1a ed. México, Hidalgo: Espacio Gráfico Comunicaciones S.A.; 2011.
13. Cuca-García JM. LA AVICULTURA DE TRASPATIO EN MÉXICO: Historia y caracterización. Agro Productividad. 2015;8(4):30-36.

14. Ruiz H, Ruiz B, Mendoza P. Caracterización del sistema de producción de aves de traspatio del municipio de Pantepec, Chiapas. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal* . 2014;4:41–43.
15. Itza-Ortiz MF, Carrera-Chavéz JM, Castillo-Castillo Y, Ruiz-Barrera O, Aguilar-Urquiso E, Sangines-García JR. Caracterización de la avicultura de traspatio en una zona urbana de la frontera norte de México. *Revista Científica* . 2016;XXVI(5):300–305.
16. Vargas S, García AR, Palma HR, Librado M. Integración de la lombricultura en la producción de aves de traspatio en Puebla, México. In *Cátedra Iberoamericana*; 2005. <https://fci.uib.es/Servicios/libros/conferencias/seae/Integracion-de-la-lombricultura-en-la-produccion.cid221661>
17. Alvarado LA. La avicultura mexicana 1975 - 2003: Estudio recapitulativo. Tesis de licenciatura. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2006.
18. Centeno SB. Evaluación de la producción avícola familiar del Ejido Almeya, Ixtacamaxtitlan, Puebla. Tesis de licenciatura. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2004.
19. Hortúa-López LC, Cerón-Muñoz MF, Zaragoza-Martínez M de L, Angulo-Arizala J. Avicultura de traspatio: aportes y oportunidades para la familia campesina. *Agronomía Mesoamericana*. 2021;32(3):1019–1033. doi:10.15517/am.v32i3.42903
20. Hamilton C, Rojas H, Pinto J, Orozco J, Hervé-Claude LP, Urcelay S. Characterization of backyard poultry production systems and disease risk in the central zone of Chile. *Research in Veterinary Science*. 2012;93(1):121–124. doi:10.1016/j.rvsc.2011.06.015
21. Marín SY, Benavides JA. Parásitos en aves domésticas (*Gallus domesticus*) en el Noroccidente de Colombia. *Veterinaria y Zootecnia*. 2007;1(2):43–51.
22. Greenlees KJ. Animal drug human food safety toxicology and antimicrobial resistance - The square peg. *International Journal of Toxicology*. 2003;22(2):131–134. doi:10.1080/10915810305091
23. Gutiérrez E, Aranda F, Rodríguez R, Bolio M, Ramírez S, Estrella J. Factores sociales de la crianza de animales de traspatio en Yucatán, México. *Bioagrociencias*. 2012;5(1):20–28.
24. Zaragoza L, Martínez B, Méndez A, Rodríguez V, Hernández J, Rodríguez G, et al. Avicultura familiar en comunidades indígenas de Chiapas, México. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 2011;1:411–415.
25. Martínez AK. Uso de antimicrobianos en la avicultura: sus implicaciones en la salud pública. Tesis de maestría. Colombia, Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2012.

26. Chang S, Davis J, Cheng C, Shien R, Hsieh M, Koh B, et al. Farmacocinética y agotamiento tisular de florfenicol en pollos nativos de Livorno y Taiwán. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2010;33:471–479.
27. Pokrant E. Evaluación de las concentraciones de florfenicol y su metabolito activo florfenicol amina en tejidos comestibles y plumas de pollo Broiler mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC MS/MS). Tesis de maestría. Chile, Santiago: Universidad de Chile; 2017.
28. Ríos A. Biodisponibilidad y metabolismo de un derivado fluorado del tianfenicol en pollos Broiler. Tesis doctoral. España, Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2004.
29. Siegel CD. Estudio cualitativo y cuantitativo de los fenicoles y tetraciclinas importadas y autorizadas para uso y disposición en medicina y en veterinaria en Chile, en el período 2013-2015 consideraciones sobre su impacto para la salud pública y el medio ambiente. Tesis de licenciatura. Chile, Valdivia: Universidad Austral de Chile; 2016.
30. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004;28(5):519–542. doi: 10.1016/j.femsre.2004.04.001
31. MarvinSketch. 1998-2022 ChemAxon Ltd.
32. Varela-Mejías A, Alfaro-Mora R. Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2018;29(1):1–14. doi: 10.15381/rivep.v29i1.14186
33. Riquelme SA. Desarrollo, validación e implementación de una metodología confirmatoria para la identificación y cuantificación simultánea de florfenicol, cloranfenicol y tianfenicol en productos farmacéuticos de uso veterinario por LC–MS/MS. Tesis de licenciatura. Santiago de Chile: Universidad de Chile; 2011.
34. Abdelmonaim A. Automatización y simplificación de las etapas de preparación de muestra para la determinación de sustancias farmacológicamente activas en matrices ambientales, alimentarias y biológicas. Tesis doctoral. Jaén: Universidad de Jaén; 2012.
35. Elías B. Evaluación de la influencia de la palatabilidad en el consumo de agua medicada con tres preparados de florfenicol en cerdos destetados y sus repercusiones terapéuticas. Tesis de maestría. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.
36. Li J, Chen H, Chen H, Ye Y. Selective determination of trace thiamphenicol in milk and honey by molecularly imprinted polymer monolith microextraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science* . 2012;35(1):137–144. doi: 10.1002/jssc.201100767

37. Aguilar J. Elaboración de un preparado inteligente de liberación controlada de florfenicol en caprinos. Tesis de maestría. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.
38. Shen J, Wu X, Hu D, Jiang H. Pharmacokinetics of florfenicol in healthy and *Escherichia coli*-infected broiler chickens. *Research in Veterinary Science*. 2002;73(2):137–140. doi: 10.1016/s0034-5288(02)00033-4
39. El-Banna H. Pharmacokinetics of florfenicol in normal and *Pasteurella* infected Muscovy ducks. *British Poultry Science*. 1998;39(4):492–496. doi: 10.1080/00071669888656
40. Cazanga R, Jeldres O, Palma I, Riquelme A, Cornejo D, Pérez F. Diferencias de especie en las concentraciones plasmáticas y tisulares de florfenicol entre ovinos y conejos. *Revista MVZ Córdoba*. 2020;25(1):1699. doi: 10.21897/rmvz.1699
41. OMS. Uso de antimicrobianos en animales de consumo: Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; 2004. <https://www.fao.org/3/y5468s/y5468s.pdf>
42. Ferrante M, Wosiacki S. Eficacia de florfenicol para el tratamiento de infecciones por *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* en alpacas (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2019;30(3):1292–1300. doi: 10.15381/rivep.v30i3.15207
43. Sumano H, Ocampo L, Gutierréz L. *Farmacología Veterinaria*. 4° ed. México: Oralia Hernández Argumedo; 2015.
44. Afifi NA, Abo El-Sooud K. Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *British Poultry Science*. 1997;38(4):425–428. doi: 10.1080/00071669708418013
45. Ravindran V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. *Journal of Applied Poultry Research*. 2013;22(3):628–636. doi: 10.3382/japr.2013-00739
46. FLORFENICOL (Veterinary-Systemic); 2007. <https://cdn.ymaws.com/www.aavpt.org/resource/resmgr/imported/florfenicol.pdf>
47. Kim J, Kim JW, Oh SI, So B, Kim WI, Kim HY. Characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from pigs with pneumonia in Korea. *BMC Veterinary Research*. 2019;15(1):119. doi: 10.1186/s12917-019-1861-5
48. Wei CF, Chang SK, Shien JH, Kuo HC, Chen WY, Chou CC. Synergism between two amphenicol of antibiotics, florfenicol and thiamphenicol, against *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Record*. 2016;178(13):319. doi: 10.1136/vr.103554



49. EMEA. CVMP assessment report for granting of marketing authorisation for OSURNIA (EMA/V/C/003753/0000) International non-proprietary name: terbinafine, florfenicol and betamethasone. European Medicines Agency; 2014. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/osurnia-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/osurnia-epar-public-assessment-report_en.pdf)
50. Chacón O. Efecto de florfenicol sobre la sensibilidad de *Escherichia coli* proveniente de la microbiota intestinal de gallinas de postura. Tesis de licenciatura. Chile: Universidad de Chile; 2012.
51. Dong J, Zhang L, Zhou S, Xu N, Yang Q, Liu Y, et al. Identification of a multi-resistant *Enterobacter cloacae* strain from diseased crayfish (*Procambarus clarkii*). *Aquaculture Reports*. 2020;17:100405. doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100405
52. Lu J, Zhang J, Xu L, Liu Y, Li P, Zhu T, et al. Spread of the florfenicol resistance floR gene among clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2018;7(1):127. doi: 10.1186/s13756-018-0415-0
53. Doublet B, Carattoli A, Whichard JM, White DG, Baucheron S, Chaslus-Dancla E, et al. Plasmid-mediated florfenicol and ceftriaxone resistance encoded by the floR and bla CMY-2 genes in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Newport isolated in the United States. *FEMS Microbiology Letters*. 2004;233(2):301–305. doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09496.x
54. Bottinelli M, Gastaldelli M, Picchi M, Dall’Ora A, Cristovao Borges L, Ramírez AS, et al. The Monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* Minimum Inhibitory Concentrations during the Last Decade (2010–2020) Seems to Reveal a Comeback of Susceptibility to Macrolides, Tiamulin, and Lincomycin. *Antibiotics*. 2022;11:1021. doi: 10.3390/antibiotics11081021.
55. Catania S, Bottinelli M, Fincato A, Gastaldelli M, Barberio A, Gobbo F, et al. Evaluation of Minimum Inhibitory Concentrations for 154 *Mycoplasma synoviae* isolates from Italy collected during 2012–2017. *PLoS One*. 2019;14(11):e0224903. doi: 10.1371/journal.pone.0224903.
56. White DG, Hudson C, Maurer JJ, Ayers S, Zhao S, Lee MD, et al. Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(12):4593–4598. doi: 10.1128/JCM.38.12.4593-4598.2000
57. Vázquez E. Reformulación de una suspensión de benzoil metronidazol utilizando carbopol como agente suspensor. Tesis de licenciatura. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2003.
58. Ramírez MM. Utilización de carbopol 971P NF y 974P NF como excipientes en tabletas por compresión directa de ácido acetil salicílico. Tesis de licenciatura. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2000.

59. Ruiz-Rubio L, Alonso M, Pérez-Álvarez L, Alonso R, Vilas J, Khutoryanskiy V. Formulation of Carbopol®/Poly(2-ethyl-2-oxazoline)s Mucoadhesive Tablets for Buccal Delivery of Hydrocortisone. *Polymers (Basel)*. 2018;10(2):175. doi: 10.3390/polym10020175
60. Rathnam G, Narayanan N, Ilavarasan R. Carbopol-Based Gels for Nasal Delivery of Progesterone. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(4):1078–1082. doi: 10.1208/s12249-008-9144-7
61. Suhail M, Wu PC, Minhas MU. Using carbomer-based hydrogels for control the release rate of diclofenac sodium: Preparation and in vitro evaluation. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020;13(11):399. doi: 10.3390/ph13110399
62. Sahoo S, Chakraborti C, Mishra S. Qualitative analysis of controlled release ciprofloxacin/carbopol 934 mucoadhesive suspension. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2011;2(3):195-204. doi: 10.4103/2231-4040.85541
63. Rodríguez AZ. Formación de derivados de capsaicina con posible actividad farmacológica, empleando estrategias verdes. Tesis de licenciatura. Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
64. Vicente JL. Efecto de la inclusión de capsaicina a partir de la semilla de paprika (*Capsicum annum*) en la dieta sobre la infección experimental de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella enteritidis* en gallinas de postura y pollos de engorda. Tesis de maestría. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1997.
65. Rosas MJ. Estudio comparativo de extracción y mecanismo de fragmentación de la capsaicina y la dihidrocapsaicina presentes en el chile (*Capsicum chinense*). Tesis de licenciatura. Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
66. Gutierrez L, Sumano H, Zamora M. Administration of enrofloxacin and capsaicin to chickens to achieve higher maximal serum concentrations. *Veterinary Record*. 2002;150(11):350–353. doi:10.1136/vr.150.11.350
67. Barajas I, Gutiérrez NL. Desarrollo y análisis estadístico de la disolución, valoración y pureza cromatográfica de itroconazol pellets por CLAR. Tesis de licenciatura. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
68. Suárez D, Morales Y. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *Semilleros: Formación Investigativa*. 2018;4(1):7-14.
69. Ibarra JL. Desarrollo de un método analítico por HPLC para la determinación de un nuevo análogo de anfotericina en plasma. Tesis de licenciatura. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2019.

70. Vera PIG. Propuesta de método analítico para la cuantificación de parabenos (metilparabeno y propilparabeno) en dos formas farmacéuticas líquidas, por HPLC. Tesis de licenciatura. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2019.
71. Serrano BA. Desarrollo de un método analítico por CLAR para cuantificar glibenclamida en plasma de ratón. Tesis de licenciatura. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
72. García MA, Soberón E, Cortés M, Rodríguez R, Herrera JL, Alcantara A. Guía de validación de métodos analíticos. 1a ed. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C.; 2002.
73. Shin SJ, Kang SG, Nabin R, Kang ML, Yoo HS. Evaluation of the antimicrobial activity of florfenicol against bacteria isolated from bovine and porcine respiratory disease. *Veterinary Microbiology*. 2005;106(1–2):73–77. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.11.015.
74. Li XS, Wang GQ, Du XD, Cui BA, Zhang SM, Shen JZ. Antimicrobial susceptibility and molecular detection of chloramphenicol and florfenicol resistance among *Escherichia coli* isolates from diseased chickens. *Journal of Veterinary Science*. 2007;8(3):243–247. doi: 10.4142/jvs.2007.8.3.243
75. Villegas-Narváez P. LII simposio científico de avicultura MÁLAGA del 28 al 30 de octubre de 2015. Complejo respiratorio de las aves. España, Málaga: Asociación Española de Ciencia Avícola; 2015. [https://www.wpsa-aece.es/aece\\_imgs\\_docs/6760\\_complejo%20respiratorio\\_villegas.pdf](https://www.wpsa-aece.es/aece_imgs_docs/6760_complejo%20respiratorio_villegas.pdf)
76. Jaimes JA, Gómez AP, Álvarez DCM, Soler D, Romero JR, Villamil LC. Las enfermedades infecciosas y su importancia en el sector avícola. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2010;(20):49–61. doi: 10.19052/mv.582
77. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). Norma Oficial Mexicana NOM-064-ZOO-2000, Lineamientos para la clasificación y prescripción de productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos. *Diario Oficial*; 2003. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/563491/NOM-064-ZOO-2000\\_270103.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/563491/NOM-064-ZOO-2000_270103.pdf)
78. Abo El-Ela FI. Influence of Vitamin E on the Disposition Kinetics of Florfenicol after single and multiple oral administrations in Broiler Chickens. *Insights in Veterinary Science*. 2017;1(1):047–057. doi: 10.29328/journal.hvsr.1001006
79. Bretzlaff K, Neff-Davis C, Ott R, Koritz G, Gustafsson B, Davis L. Florfenicol in non-lactating dairy cows: pharmacokinetics, binding to plasma proteins, and effects on phagocytosis by blood neutrophils. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1987;10(3):233–240. doi: 10.1111/j.1365-2885.1987.tb00534.x

80. Ueda Y, Suenaga I. In vitro Antibacterial Activity of Florfenicol against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1995;57(2):363–364. doi: 10.1292/jvms.57.363
81. Park B, Lim J, Kim M, Hwang Y, Yun H. Pharmacokinetics of florfenicol and its major metabolite, florfenicol amine, in rabbits. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2007;30(1):32–36. doi: 10.1111/j.1365-2885.2007.00809.x