

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Farmacocinética de un diseño farmacéutico de florfenicol encapsulado, de
dosificación oral para aves de traspatio**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

DALIA CONSUELO LÓPEZ CASTREJÓN

ASESORES:

LILIA GUTIERREZ OLVERA

HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ

MÉXICO.

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

	Página
PORTADA.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ÍNDICE CUADROS.....	V
ÍNDICE FIGURAS.....	VI
GLOSARIO DE TERMINOS.....	VII
1. RESUMEN.....	VIII
2. ABSTRACT.....	1
3. INTRODUCCIÓN.....	2
3.1 Aves de traspatio.....	2
3.2 Florfenicol.....	3
3.3 Desarrollo de preparados farmacológicos en aves de traspatio.....	5
3.4 Vehículos para logra liberación modificada de principios activos.....	5
3.5 Chitosan como sistema de liberación.....	6
3.6 Alginatos.....	7
4. HIPÓTESIS.....	7
5. OBJETIVOS.....	7
5.1 Objetivo Especifico.....	8
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
6.1 Lugar.....	8
6.1.1 Preparación de las partículas de alginato+chitosan+florfenicol.....	8
6.2 Selección de las aves.....	9
6.3 Evaluación por medio del método de HPLC (cromatografía líquida).....	11
6.3.1 Evaluación de actividad/concentración del florfenicol mediante la técnica de Bennet et al. ⁽⁶⁹⁾	12
6.3.2 Método de Bennet et al. ⁽⁶⁹⁾	12
6.3.3 Análisis estadístico procesamiento de los resultados.....	14

4. RESULTADOS..... 16

5. DISCUSIÓN..... 19

6. REFERENCIAS..... 20

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Concentraciones mínimas inhibitorias de florfenicol ante algunos patógenos en aves	4
2. Diluciones del estándar de florfenicol.	13
3. Concentraciones séricas promedio de las aves dosificadas con florfenicol a dosis de 20 mg/kg vía oral divididas en 3 grupos, el grupo 1 administrado en agua bebida, el grupo 2 recubierto de chitosán/alginate de sodio administrado en proventrículo y grupo 3 recubierto de citosán/alginate de sodio administrado en el alimento.	16
4. Valores medios (\bar{X}) \pm 1 desviación estándar (DE) de las variables farmacocinéticas de florfenicol en agua de bebida (grupo 1; referente); florfenicol recubierto de chitosán/alginate e incluido en masa de maíz (grupo 2) y administrado en bolo o incluido en pellets y administrado ad libitum, en todos los casos a 20 mg/kg (grupo 3). Los tres grupos fueron dosificados a razón de 20 mg/kg de peso corporal.	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química del florfenicol	3
2. Preparado de florfenicol recubierto con alginate.	8
3. Flujograma de trabajo	10
4. Técnica microbiológica de Bennet et al. ⁽⁶⁹⁾ mediante un estándar fortificado.	14
5. Técnica microbiológica de Bennet et al. ⁽⁶⁹⁾ medición de actividad/concentración de florfenicol de las muestras tomadas de las aves que se utilizaron para el estudio	15
6. Curva de concentraciones vs tiempo de los tres grupos dosificados con florfenicol a 20 mg/kg	16

GLOSARIO DE TÉRMINOS

°C	Grados Celsius	kg	Kilogramos
AUC	Área bajo la curva	nm	Nanómetro
AUC_T	Área bajo la curva tiempo-concentración	mg	Miligramos
cbp	Cantidad bastante para	mL	Mililitros
C_{max}	Concentración máxima	mm	Milímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria	ppm	Partes por millón
F	Biodisponibilidad	rpm	Revoluciones por minuto
G_{po}	Grupo	TG	Tracto gastrointestinal
h	Horas	T_{max}	Tiempo máximo
HPLC	High performance liquid chromatography	µg	Microgramos
		µL	Microlitros
		µm	Micrómetro

1. RESUMEN

LÓPEZ CASTREJÓN DALIA CONSUELO. Farmacocinética de un diseño farmacéutico de florfenicol encapsulado de dosificación oral para aves de traspatio. (Bajo la dirección de: Dra. Lilia Gutiérrez Olvera, Dr. Héctor Salvador Sumano López. Dra Minerva Monroy Barreto)

La resistencia bacteriana orienta la investigación a diseñar farmacéuticamente los antibióticos y con ello optimizar su uso en la industria avícola y las producciones de traspatio, para las cuales existen pocas opciones terapéuticas diseñadas. El florfenicol es ampliamente utilizado en avicultura y desde la perspectiva de farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD), este fármaco ofrece sus máximos beneficios clínicos si se le maneja como tiempo-dependiente. Esto es difícil de lograr dado un tránsito gastro-intestinal relativamente rápido y su rápida eliminación. En este estudio se postula que el florfenicol encapsulado con quitosán-alginato puede mejorar su biodisponibilidad y extender su acción por absorción y liberación modificadas. En este ensayo se probaron dos prototipos de florfenicol recubierto y se definió su farmacocinética comparativa vs. florfenicol en el agua de bebida. Se incluyeron un total de 36 aves Bovans-White divididas tres grupos de 12 en cada grupo. El grupo 1 recibió una dosis de 20 mg/kg de florfenicol oral en agua de bebida, el grupo 2 se administró un preparado de florfenicol recubierto con quitosán-alginato e incluido en una masa de harina de maíz a la misma dosis en un animal en ayuno de 10 horas. Por último, el grupo 3 recibió un preparado de florfenicol recubierto de quitosán-alginato a la misma dosis, incluido en pellets hechos con harina de maíz y mezclados con el alimento en animales sin ayuno. Se logró una mayor biodisponibilidad con respecto al preparado en agua (> 600%, $P < 0.5$) con ambos preparados orales en florfenicol recubiertos con alginato.

Palabras clave: Florfenicol, florfenicol-alginato, farmacocinética, gallinas, traspatio.

2. ABSTRACT

Bacterial resistance is shifting the trends of research towards the pharmaceutical design of antibiotics to optimize their use both, in the poultry industry and backyard productions for which, there are few designed therapeutic options. Florfenicol is widely used in poultry farming and from a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) perspective, this drug offers its maximum clinical benefits if handled as a time-dependent antibacterial drug. This is difficult to achieve given a relatively fast gastrointestinal transit time and rapid clearance. In this study, it is postulated that alginate-encapsulated florfenicol can improve its bioavailability and extend its action by modified absorption and release. In this trial, two prototypes of chitosan/alginate-coated florfenicol were tested, and their comparative pharmacokinetics vs. florfenicol in drinking water was carried out. A total of 36 Bovans-White birds divided into three groups of 12 each were included. Group 1 received a dose of 20 mg/kg of oral florfenicol in drinking water, group 2 was administered a preparation of chitosan/alginate-coated florfenicol and included in a maize flour dough at the same of 20mg/kg having had a 10 hour fast. Finally, group 3 received a preparation of chitosan/alginate-coated florfenicol at the referred dose but included in pellets made with cornmeal and mixed with the food in non-fasting animals. A greater bioavailability was achieved with both oral preparations in florfenicol coated with alginate as compared to the preparation intended for drinking water (> 600%, $P < 0.5$).

3. INTRODUCCIÓN

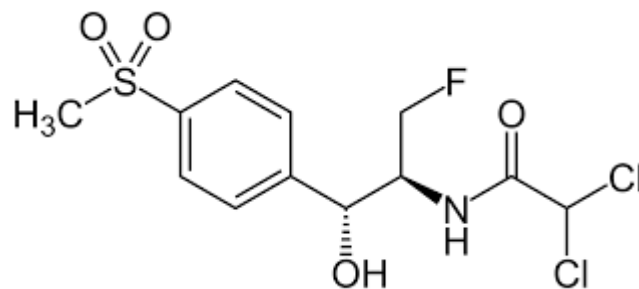
Es común el uso de antibacterianos para combatir diversos patógenos que afectan a las aves en la industria avícola e en las aves de traspatio. Se busca mantener a las parvadas sanas y evitar la diseminación de las enfermedades. Sin embargo, su uso se ve cada vez más restringido, dadas las nuevas normativas impulsadas por la OMS y la FAO, ⁽¹⁾. El sobreuso, la mala calidad de principios activos y bajas dosificaciones han provocado un aumento en la resistencia bacteriana en ésta y otras industrias pecuarias ⁽²⁾. Esta situación quizá se vea más acentuada en las aves de traspatio, debido a que hay pocos preparados diseñados para dosificar pequeñas poblaciones de aves. En este ensayo se hace una propuesta para desarrollar productos antibacterianos con propiedades farmacocinéticas /farmacodinámicas (PK/PD) óptimas para el tratamiento de la especie y en su entorno de traspatio.

3.1 Aves de traspatio

El sistema de producción denominado “de traspatio” se define como un sistema agroforestal en pequeña escala, en el que, además de especies arbóreas, arbustivas y herbáceas, se incluyen la cría y engorda de parvadas ^(3,4,5). En este sistema, las gallinas son la especie animal más importante debido a su corto ciclo de producción y bajo costo de adquisición de pie de cría ^(6,7). Incluso se menciona que este tipo de producciones juegan un papel muy importante en la economía rural, dado que llega a representar alrededor del 80% de la producción avícola mundial ^(8,9). La producción de traspatio, en la mayoría de los casos, de tecnologías específicas para mejorar e incrementar su productividad. Por ejemplo, el reemplazo de gallinas y la aparición de enfermedades es una amenaza para este sistema de producción ⁽⁶⁾. Por ejemplo, los problemas digestivos y respiratorios representan del 46 al 52% de la mortalidad de estos animales ^(4,9,10). Al respecto, es reconocido que la asistencia técnica de profesionales de la salud animal es escasa en los sistemas de traspatio y por esta razón, es una práctica común el uso de fármacos y dosis no convencionales y generalmente aprobadas para otras especies e incluso para el humano ⁽¹¹⁾. Por ejemplo se ha documentado que de entre los fármacos usado en avicultura de traspatio y, obviamente sin asistencia Veterinaria, destacan el naproxeno, las tetraciclinas, los macrólidos y como es de inferirse, sin sustento farmacológico ⁽¹²⁾. Se postula en este ensayo como conducente que se generen composiciones farmacéuticas que faciliten el uso de antimicrobianos específicos para pequeñas poblaciones de aves. Esto conlleva la optimación de las variables farmacocinéticas/farmacodinámicas (PK/PD) de cada fármaco y que sean de manejo fácil considerando, las aves de traspatio. Esto es, aunque el antimicrobiano sea prescrito por un veterinario, el manejo del preparado seguramente lo realizará el o la dueña de las aves.

3.2 Florfenicol

El florfenicol es derivado del tianfenicol, el cual pertenece al grupo de los fenicoles y que a su vez provienen del cloranfenicol. Se considera que el receptor bacteriano a nivel de la unidad ribosomal 50S parece ser el mismo. Es un antibacteriano de amplio espectro bacteriostático, que impide la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a la subunidad ribosomal 50S y con ello se impide la actividad de la peptidiltransferasa y se evita la transferencia de aminoácidos a partir del ARNt y se trunca la formación de cadenas peptídicas ^(6,13). Es un antibacteriano que desde la perspectiva PK/PD se le considera dependiente del tiempo (t-d). Esto quiere decir que para lograr un efecto clínico óptimo se requiere lograr inicialmente concentraciones de 2 a 4 veces la CMI y después ligeramente arriba del valor de CMI, al menos el 70% del intervalo de dosificación (ID) ($T \geq 70\%$ ID). También se ha relacionado que, a mayor carga del antibacteriano, mejor respuesta clínica, en términos de área bajo la curva de concentración vs. tiempo dividido por el valor de la CMI. No obstante, no se tiene una cifra precisa a la fecha ($AUC_{0-24}/CMI \geq x$). Su fórmula es $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$, su peso molecular es de 358.2 D y su punto de fusión se encuentra entre 153 y 154° C (véase Figura 1). No es soluble en agua, pero se le ha asignado un pH de 3 a 9, dependiendo de la ionización de los grupos reactivos. Es soluble escasamente en solventes orgánicos, principalmente los polietilenglicoles y habitualmente se le solubiliza en N-metilpirrolidona (*Pharmasolve*[®]¹). Presenta una solubilidad relativamente elevada en lípidos orgánicos lo cual le da un alto volumen de distribución. Logra concentraciones terapéuticas en la mayoría de los tejidos diana como pulmones, corazón, páncreas, músculo esquelético, bazo y líquido sinovial incluso en fluido cerebroespinal ⁽¹⁴⁾. No presenta la toxicidad de su análogo el cloranfenicol y no se ha relacionado en ninguna especie con problemas de anemia aplásica a dosis terapéuticas. En México y algunos países latinoamericanos se le ha usado como premezcla antimicrobiana para aves. La dosis recomendada comercialmente es de 20-40 mg/kg (aproximadamente 200 ppm en el alimento). Para obtener concentraciones terapéuticas confiables, se recomiendan no reducir esta dosis ⁽¹⁵⁾.



¹ <https://www.pharmaexcipients.com/product/pharmasolve-nmp/>

Figura 1. Fórmula estructural del florfenicol.

Actúa contra microorganismos Gram⁺ y Gram⁻, incluso muestra un espectro superior a sus análogos el tianfenicol y el cloranfenicol. Dentro de su espectro destaca la eficacia sobre *Proteus mirabilis*, *Proteus indol+*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Citrobacter sp.*, *Bacteroides sp.*, *Actinobacter sp.*, *Haemophilus sp.* y enterococos ^(16,17). En el cuadro 1 se presentan algunos valores comúnmente reportados de CMI para florfenicol.

En cuanto a sus tiempos de retiro, se ha de establecer para cada preparado dado que los vehículos pueden hacer variar las tasas de absorción y depuración. No obstante, para bovinos la EMEA permite 200 ppb (µg/kg) de florfenicol y su metabolito florfenicol amina en músculo; 300 ppb en riñón y hasta 3000 ppb en hígado ⁽¹⁸⁾.

Cuadro 1.
Concentraciones mínimas inhibitorias de florfenicol ante algunos patógenos en aves

Patógeno	CMI	Referencia
<i>Pasteurella multocida</i>	0.25-0.5 µg/ml	Sung y Sang 2004
<i>Mannheimia haemolytica</i>	0.5 µg/ml	
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0 µg/ml	Henk y Kees 2005
<i>Streptococcus sp.</i>	2.0 µg/ml	Voorspoels y Haese
<i>Escherichia coli</i>	4.0 µg/ml	1999
<i>Haemophilus somnus</i>	0.25 µg/ml	Salmon y Watts 2000
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	0.2 µg/ml	
<i>Fusobacterium necrosporum</i>	0.25 µg/ml	Prescott, 2000
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	0.25 µg/ml	

3.3 Desarrollo de preparados farmacológicos en aves de traspatio

El desarrollo de un nuevo preparado antibacteriano destinado a veterinaria, incluyendo pruebas de seguridad para la o las especies diana y para el ambiente, así como eficacia clínica es un proceso lento y sumamente costoso. En términos generales el tiempo que tarda un producto desde la búsqueda del principio activo, hasta que sale al mercado fluctúa en promedio entre 10 y 12 años y con un costo aproximado de 100 millones de dólares, o más ^(19, 20,21). Más aún, son contados los antibacterianos novedosos que se han destinado a la avicultura ⁽²²⁾ y por ello, una de las resultantes de esta situación es la investigación destinada a lograr un uso óptimo de los recursos antibacterianos hasta ahora disponibles. Esto es, los retos actuales en farmacología no son solamente la búsqueda de nuevas moléculas, sino la reformulación y mejora de las ya existentes conforme a las variables PK/PD, que en este caso para el florfenicol como antibacteriano t-d son: $T \geq CMI 70\% ID$ y $AUC/CMI \geq x$. Para ello, es necesario recurrir a los vehículos que inducen liberación modificada del principio activo. Se postula que de esta manera se logrará una estancia más prolongada y quizá con mejores relaciones PK/PD como ya se mencionó. Hay que considerar dentro del diseño de un preparado novedoso el riesgo de disminución de la biodisponibilidad de los principios activos por las interacciones que estos pueden tener durante el paso en el tracto digestivo de las aves, que, dicho sea de paso, es de tipo rápido (4-6 h) ⁽²³⁾.

3.4 Vehículos para logra liberación modificada de principios activos

Los polímeros biodegradables han probado su potencial en el desarrollo de nuevos, avanzados y eficientes sistemas de liberación modificada ^(24,25). Son capaces de liberar una gran cantidad de materiales bioactivos para diversas aplicaciones terapéuticas. La distribución de fármacos juega un papel muy importante en el desarrollo de la forma de dosificar en la industria de la salud animal. Evidentemente se tendrá que contemplar la vía de dosificación para optimizar los resultados. Más aún para veterinaria y en particular para aves de traspatio se deberá tomar en cuenta el costo de fabricación de la nueva presentación farmacéutica. Es de destacarse que más del 60% de los productos nuevos en el mercado farmacéutico veterinario y humano son productos de liberación sostenida o ^(24,25,26). En años recientes, el interés por los polímeros biodegradables como sistemas de distribución de fármacos en veterinaria para controlan y prolongan el efecto de los fármacos como agentes terapéuticos, ha incrementado por no presentar efectos secundarios que comprometan la vida y la salud de los animales, ni para el consumidor final. Esto proporciona grandes beneficios tales como la reducción del estrés animal al reducir su manejo y ajustarse a tiempos de dosificación adecuados ⁽²⁷⁾.

En la industria de producción animal, en este caso la producción de huevo y aves para consumo, es importante valorar el costo de los tratamientos y el beneficio, que éste tenga un resultado favorable y de fácil acceso para los productores. Por otro lado, cada visita del veterinario es relacionada por el productor con gastos, por lo que un sistema de

liberación biodegradable, que solo requiere una aplicación asociado con un incremento en el efecto terapéutico será un beneficio económico, aunque el costo del sistema de liberación pueda ser más alto que el tratamiento convencional.

3.5 Chitosan como sistema de liberación

Los sinónimos: 2-Amino-2deoxy-(1,4)- β -D-glucopiranan; chitina deacetilada; deacetilchitina; β -1,4-poly-D-lucosamina; Poly-D-glucosamina; Poly-(1,4- β -D-glucopyranosamina. C Categoría funcional: Agente de revestimiento, desintegrante, agente formador de películas, mucoadhesiva, cubierta de tabletas, agente que incrementa la viscosidad ⁽²⁸⁾. El chitosan se conoce desde el año 1859, pero en los últimos 20 años se ha investigado sobre este polímero como un sistema de liberación. Es un aminopolisacárido natural, derivado como una forma desacetilada de quitina, su grado de acetilación se caracteriza por la fracción molar de unidades N- acetiladas (DA) o como porcentaje de acetilación (DA%) y uno de los polisacáridos naturales más abundantes, se ha visto que no es tóxica, posee baja alergenicidad, tiene características biocompatibles, antibacterianas y se absorben con mayor eficacia en la administración de fármacos. Recientemente las microesferas o nanoesferas de chitosan se han considerado como un gran potencial en la aplicación farmacéutica para la liberación controlada de fármacos, se ha demostrado que mejora la disolución de fármacos poco solubles en agua y sus propiedades bioadhesivas. ^(29, 30,31).

El chitosan cuenta con dos grupos funcionales químicos los cuales podemos modificar para lograr objetivos específicos, lo que lo convierte en un polímero con una enorme variedad de aplicaciones potenciales, también se ha creado y probado para tratar el cáncer, enfermedades gastrointestinales, enfermedades pulmonares, la administración de fármacos que lleguen cerebro ya que mejorar la permeabilidad del fármaco a través de la barrera hematoencefálica, vendajes para heridas, biopelículas y en el tratamiento de infecciones oculares, tiene un efecto prolongado de absorción, también estudios han demostrado que una solución almacenada durante 15 semanas a 4 ° C mostró el mayor efecto antimicrobiano contra *Listeria monocitogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. Como se ha mencionado antes este tiene capacidades de mucoadhesión, la degradación depende del grado de desacetilación y la disponibilidad de los grupos amino, se puede procesar fácilmente como fibra, película, esponja, perla, gel o solución ^(32,33).

En la avicultura se ha utilizado para tratar diferentes afecciones como adyuvante en algunas vacunas ya que puede estimular la inmunidad local a través de la inmunización de la mucosa o como parte de tratamientos, observando resaltados positivos, sobre todo es segura y no tóxica para las aves, tomando en cuenta esto ayuda en la administración tanto de fármacos como de vacunas en las aves disminuyendo el tiempo, así mismo obteniendo una respuesta inmunitaria positiva ^(34,35).

3.6 Alginatos

En la década de 1950 surgió un ímpetu para aprender más sobre los organismos marinos, las algas son la fuente más abundante de polisacáridos como los alginatos. Se ha visto que se pueden utilizar en campos como los sistemas de administración de fármacos y la ingeniería de tejidos. Los polisacáridos naturales pueden desempeñar un papel relevante en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Los alginatos son sales del ácido algínico que forman parte de la pared celular y de las regiones intercelulares de las feofitas. En su estado natural, se encuentran formando geles con iones Ca^{+2} , Na^{+} , Mg^{+2} , Sr^{+2} y Ba^{+} .⁽²⁸⁾ Otra forma en que se utiliza es para la elaboración de material de impresión dental y la inmovilización de organismos benéficos para el tratamiento de aguas residuales que también al combinarlo con otros componente se han obtenido resultados favorables y en conjunto con otros compuestos o microorganismo se han diseñado fertilizantes los cuales han tenido buenos resultados y uno de los puntos positivos de este compuesto es que tiene buen tiempo de anaquel y no es tóxico para las plantas, algunos estudios se ha observado un crecimiento de las algas hasta de un 35%^(36,37,38,39). Los estudios recientes sobre el tema de los alginatos se ha concentrado en nuevas aplicaciones como acarreadores de proteínas; intercambiadores de metales; incorporación en textiles; inmovilización de levaduras; micro encapsulados; absorción de radiación ultravioleta; control de la colitis ulcerativa, promotor del crecimiento de las raíces de las plantas terrestres^(40, 32, 41,42).

4. HIPÓTESIS

El recubrimiento del florfenicol con chitosán-alginato de Ca^{++} mediante una reacción de inclusión en CaCl_2 genera un preparado que puede brindar una farmacocinética de liberación sostenida y brindar variables PK/PD más adecuadas a un antibacteriano dependiente del tiempo ($\%T \geq \text{CMI ID} = 70\%$ o más y $\text{AUC}_{0-24}/\text{CMI} >$ a lo logrado con florfenicol en el agua.

5. OBJETIVO

Evaluar si el recubrimiento del florfenicol con chitosán/alginato de Ca^{++} mediante una reacción de inclusión en CaCl_2 , puede generar un preparado que brinde una farmacocinética de liberación sostenida y lograr variables PK/PD más adecuadas a un antibacteriano dependiente del tiempo ($\%T \geq \text{CMI ID} = 70\%$ o más y $\text{AUC}_{0-24}/\text{CMI} >$ a lo logrado con florfenicol en el agua.

5.1 Objetivo específico

Diseñar y evaluar un preparado de florfenicol recubierto por quitosán/alginato de calcio para lograr un sistema de liberación modificada y que al administrarlo oralmente vía alimento a aves de producción/traspatio, logren una relación PK/PD más acorde con su PK/PD, dependiente del tiempo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Lugar

Las aves de traspatio se encontraban en la calle Antonio Plaza, número 26, colonia Miguel Hidalgo, Texcoco en el Estado de México, colinda al norte con Tepetlaoxtoc, Papalotla, Chiautla, Chiconcuac; al sur con Chimalhuacán, Chicoloapan e Ixtapaluca; al oeste con Atenco y al este con los estados de Tlaxcala y Puebla ⁽⁴³⁾. Las aves se encontraban en jaulas en la parte trasera de la vivienda de los propietarios, contaban con un sistema de agua la cual proporcionaba agua *ad libitum* y alimento para gallina de postura se les proporcionaba 150 gramos al día, las instalaciones contaban con lonas que cubrían a las aves del frío y las protegía del sol, además, contaban con una pequeña fosa en la cual quedaban las heces.

6.1.1 Preparación de las partículas de alginato+chitosan+florfenicol.

Se prepara una solución con agua destilada desionizada al 20% de florfenicol + 0.1% quitosán + 0.5% alginato de calcio c.b.p. 100 mL, se forman las partículas por goteo en una solución de Cloruro de Calcio al 20% y se dejan secar a temperatura ambiente durante 72 horas.



Figura 2. Preparado de florfenicol/chitosán/alginato.

6.2 Selección de las aves

Se utilizaron 36 gallinas Bovans White, de 3 años de edad aproximadamente con un peso entre 1.500 kg a 2 kg, las cuales se dividieron en tres grupos de 12 gallinas. El grupo 1: recibió una dosis de 20 mg/kg de florfenicol vía agua de bebida directo en el pico usando una cánula rígida con punta de goma direccionada hacia esófago, asegurando la ingesta y simular una dosis bolo, se les dio 12 esferas aproximadamente del preparado. El grupo 2: recibió un preparado de florfenicol recubierto de alginato de sodio a la misma dosis, directo en el pico direccionando la cánula hacia el esófago, se les dio 12 esferas aproximadamente del preparado. El grupo 3: recibió un preparado de florfenicol recubierto de alginato de sodio a la misma dosis, pero en este caso se agregó a una pequeña bola de masa de color rojo la cual de preparo con harina de maíz, esperando no afectar las características farmacocinéticas del fármaco agregando un poco de agua y colorante vegetal color rojo el cual no es toxico para las aves, ni llega a provocar algún tipo de problema o que afecte los resultados de la investigación el cual se administró al animal para que lo ingiriera directamente, simulando presencia de alimento, ofreciéndola directamente al animal.

El tiempo de retiro establecido fue de 7 días, ya que las aves se encontraban en producción, se mantuvieron en las mismas condiciones en las que encontraban y se les comunicó a los propietarios que no se podían consumir los huevos producidos durante esos mismos 7 días pero que se podría prolongar a 14 días por cuestiones de seguridad se les recomendó no venderlos y consumirlos dentro de los días establecidos.

Las 36 aves fueron divididas en tres grupos para tomar muestras de sangre de la vena radial y vena yugular, en los horarios establecidos, seleccionando y marcando a las aves, para evitar tomar muestras de la misma. Las horas que se establecieron fueron a las 0.5 h, 1h, 2 h, 4h, 6 h, 8 h, 12 h, 18 h y 24 h, la sangre fue colectada con jeringas de 3 mL con una aguja de calibre 23G x 25 mm, se tomó no más de 1 mL de sangre por ave, después se colocó en tubos Vacutainer de tapa roja sin aditivos para poder centrifugarlos en un tiempo de 15 minutos a 5000 g y obtener el suero, el cual fue recolectado con pipetas Pasteur de plástico, este se colocó en microtubos, una vez ya recolectados fueron separados en bolsas con cerrado hermético, marcando las muestras tomadas de las gallinas a las que se les dio el antibiótico con masa, las que se les dio sin masa y de agua de bebida, se mantuvieron en el congelador hasta que se llevaron las muestras al laboratorio para procesarlas. Dado que la técnica de cromatografía es cara, solo se utilizó para confirmación de algunas concentraciones (10% de las muestras), todas las muestras fueron evaluadas mediante un método microbiológico de actividad/concentración⁶⁹ y se encontró una elevada correlación con respecto al método cromatográfico de determinación del florfenicol.

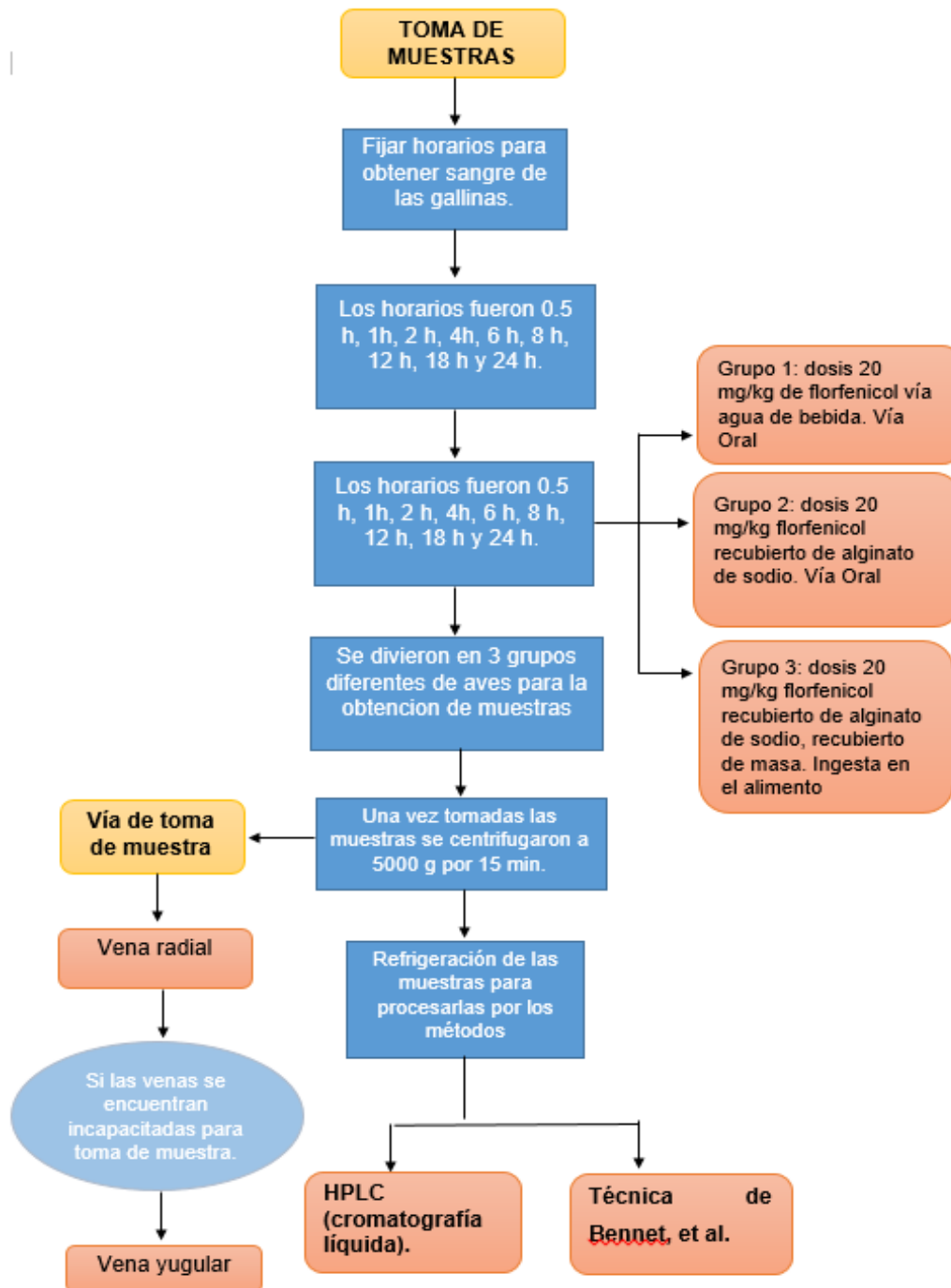


Figura 2. Flujograma de trabajo para obtener los florfenicoles prototipo y evaluar sus concentraciones plasmáticas mediante dos técnicas: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) y mediante técnica microbiológica.

6.3 Evaluación por medio del método de HPLC (cromatografía líquida).

Primero se realizaron 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.

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.

Preparación de muestras y extracción: Se añadió florfenicol en cantidades conocidas al suero para lograr las siguientes concentraciones: 2, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Con esto se evaluó la capacidad de detección y linealidad de la metodología a utilizar. Tanto el suero fortificado como las muestras se trataron por duplicado. Se tomaron 0.5 mL de suero, se añadieron 100 μL de NH_4OH 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 de la muestra. Posteriormente cada vial fue centrifugado a 12,000 rpm durante 15 minutos (Centrífuga CENCOM II). 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 μm para ser colocado en un vial ámbar de 2 mL para HPLC. Una parte del proceso se realizó en la Facultad de química que se encuentra en Ciudad Universitaria, con la ayuda de la doctora Minerva Monroy Barreto.

Condiciones cromatográficas de análisis: El producto final se analizó 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 μm , 150 mm y la fase móvil (agua/acetonitrilo 65:35) con un flujo de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 μL : Procesamiento de datos. Una vez analizadas las muestras y los estándares mediante HPLC (Ewelina P, Krzysztof K, 2019), se integraron los resultados mediante el software EZ Chrom Elite.

6.3.1 Evaluación de actividad/concentración del florfenicol mediante la técnica de Bennet *et al.* ⁽⁶⁹⁾

El estudio cuantitativo de florfenicol se desarrolló usando el método microbiológico de difusión en agar, se utilizó el microorganismo *Bacillus subtilis* 6633 ATCC, ya que ha demostrado alta sensibilidad al florfenicol ^(14,44). La solución estándar se preparó utilizando una serie de diluciones del fármaco control y suero de las aves, que. Las concentraciones de florfenicol se calcularon por interpolación, comparando el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento de la bacteria con una curva realizada con el estándar. Se tomaron 5 mL de sangre de las aves muestreadas, se centrifugaron y refrigeraron (-4°C) hasta el momento de su análisis. El procesamiento para procesar el suero se llevó a cabo mediante el método microbiológico de Bennet *et. al* (2021). Esta técnica se realizó en el laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia bajo la dirección de la Dra. Lilia Gutiérrez Olvera.

6.3.2 Método de Bennet *et al.* ⁽⁶⁹⁾

El agar que se utilizó es Mueller Hinton (Bixon) preparado siguiendo las indicaciones que marca el producto.

- Cultivo bacteriano:

Se utilizará una cepa bacteriana ATCC (*American Type Culture Collection*) *Bacillus Subtilis* 6633.

Estándar bacteriano - Obtención de spora de *Bacillus Subtilis* 6633

Se sembró en una caja Petri (24 horas antes a temperatura 32-37°C). Con 5 mL de caldo de cultivo a temperatura ambiente, se lavó el crecimiento de la cajita y colectó con una espátula, se centrifugó (20 minutos a 3500 rpm), se decantó el sobrenadante obtenido y se re-suspendió el sedimento con 50-70 mL de caldo de cultivo estéril y se colocó para calentar la suspensión por 30 min. A temperatura de 70°C, pasado este tiempo refrigeró por 2 horas. Se sacó del refrigerador e impregnó la placa de agar.

- Preparación de las placas

En un refractario tipo Pyrex® de 21 X 20 cm, estéril, se colocaron 300 mL de agar y se dejaron enfriar durante 10 minutos. Sobre el agar ya frío se colocaron 400 µL de la suspensión de la spora bacteriana y por medio de un hisopo estéril se distribuyó homogéneamente sobre todo el agar, se dejó reposar la placa de agar a temperatura ambiente por 2 horas.

- Preparación de las diluciones

Se pesaron 20 g del estándar de florfenicol (98% de pureza), se colocó en un matraz y se aforó colocando 100 mL de agua desionizada. Se marcaron 10 tubos de 5 mL del 1 al 10 y uno de 15 mL con el número 0, en el matraz numerado con el 0, se colocó 9 mL de agua desionizada y en los demás tubos, se colocó 1 mL en cada uno de ellos. Del matraz se toma 1 mL y se agrega en el tubo 0 se homogeniza y de este se toma 1 mL y se agrega al tubo 1, se procedió a homogenizar, se tomó 1 mL y se agrega al tubo 2 y así se continúa hasta completar los 10 tubos, teniendo finalmente las siguientes diluciones:

Cuadro 2.

Diluciones del estándar de florfenicol.

No	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Matraz</i>	200
<i>Tubo 0</i>	20
<i>Tubo 1</i>	10
<i>Tubo 2</i>	5
<i>Tubo 3</i>	2.5
<i>Tubo 4</i>	1.25
<i>Tubo 5</i>	0.625
<i>Tubo 6</i>	0.3125
<i>Tubo 7</i>	0.15625
<i>Tubo 8</i>	0.078125
<i>Tubo 9</i>	0.0390625
<i>Tubo 10</i>	0.01953125

- Lectura de las placas.

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

- Procesamiento de las lecturas de los halos de inhibición.

Se obtuvieron medias y desviaciones estándar del diámetro de halo de inhibición de cada una de las diluciones. A partir de los cuales y con ayuda de los programas Microcal Origin y Excel, se obtuvieron las gráficas de milímetros de halo de inhibición vs concentración.

- Procesamiento del suero.

Se prepararon las placas con la misma concentración de bacteria del mismo modo que se prepararon las placas para obtener en estándar mediante las pruebas de Bennet *et. al.*, se realizaron los pozos de la misma manera que los anteriores y en la misma placa se sembraron, se colocaron 100 μL de suero, se incubaron durante 24 horas y se realizaron las lecturas de los milímetros de halos de inhibición, repitiendo este procedimiento para cada uno de los tiempos de cada uno de los grupos.

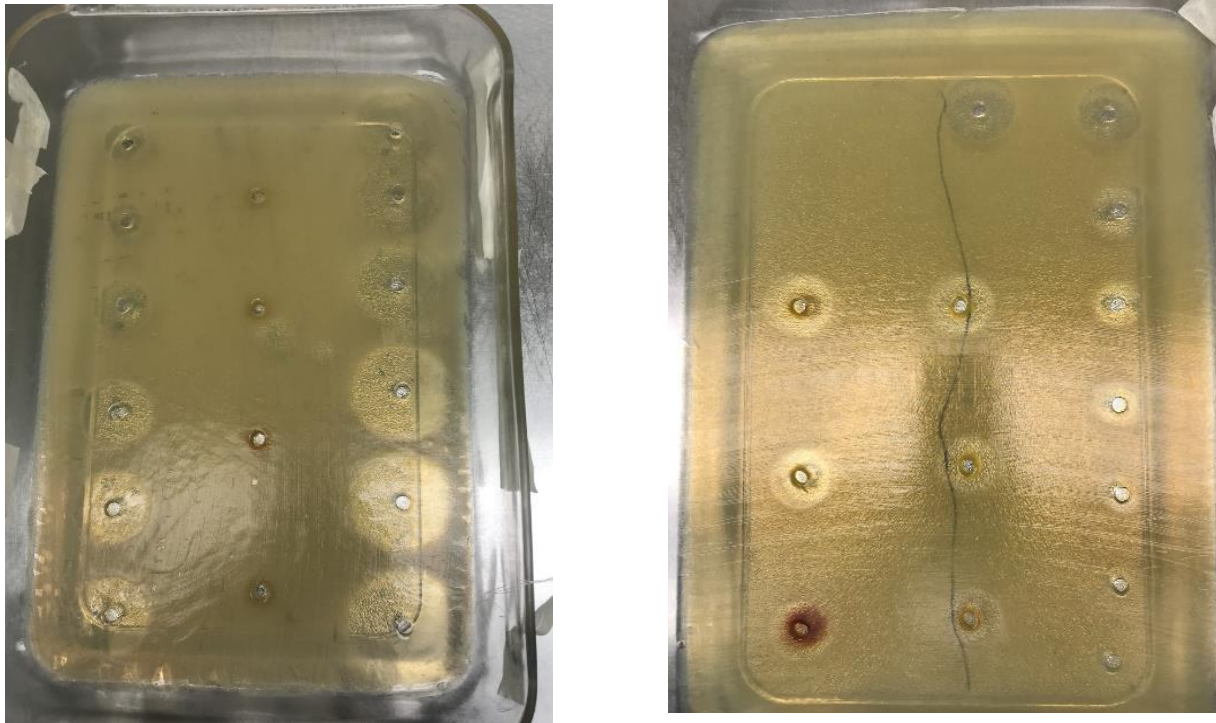


Figura 3. Técnica microbiológica de Bennet *et al.*⁶⁹ Medición de actividad/concentración de florfenicol mediante un estándar fortificado (con concentraciones conocidas añadidas) y las muestras tomadas en las aves que se utilizaron para este estudio.

6.3.3 Análisis estadístico procesamiento de los resultados.

Los resultados obtenidos por grupo y por tiempo de sangrado se extrapolaron en la gráfica de concentración contra halos de inhibición obteniendo así los $\mu\text{g/mL}$ de cada una de las muestras de suero. Los análisis farmacocinéticos se procesaron por medio de los programas Microcal-Origin versión OriginPro 8, con el cual se realizó la regresión lineal y Micromath PKAnalyst Scientific Software, con el que se obtuvo el modelo farmacocinético. Los parámetros farmacocinéticos que se compararon estadísticamente, son aquellos que reflejaron directamente la potencia clínica y significancia de las formulaciones de liberación prolongada (florfenicol-chitosan/alginate) se estimó: $K_{1/2el}$ = vida media de eliminación; α = constante de absorción; β = constante de eliminación; AUC = área bajo la curva de concentración vs. tiempo; AUMC = área bajo la curva de concentración vs. tiempo en un momento; RT = tiempo medio de residencia; C_{max} = concentración máxima lograda; T_{max} = tiempo para lograr C_{max} ; Fr = biodisponibilidad relativa que se calculó con: $AUC_{grupo\ 1}/AUC_{grupo\ 2\ o\ 3} \times 100$. A los datos obtenidos por grupo y tiempo de sangrado se realizó diferencias entre medias y análisis de varianza, con los cuales se realizaron las gráficas de concentración contra tiempo a partir de las cuales se obtuvieron las farmacocinéticas de cada uno de los grupos.

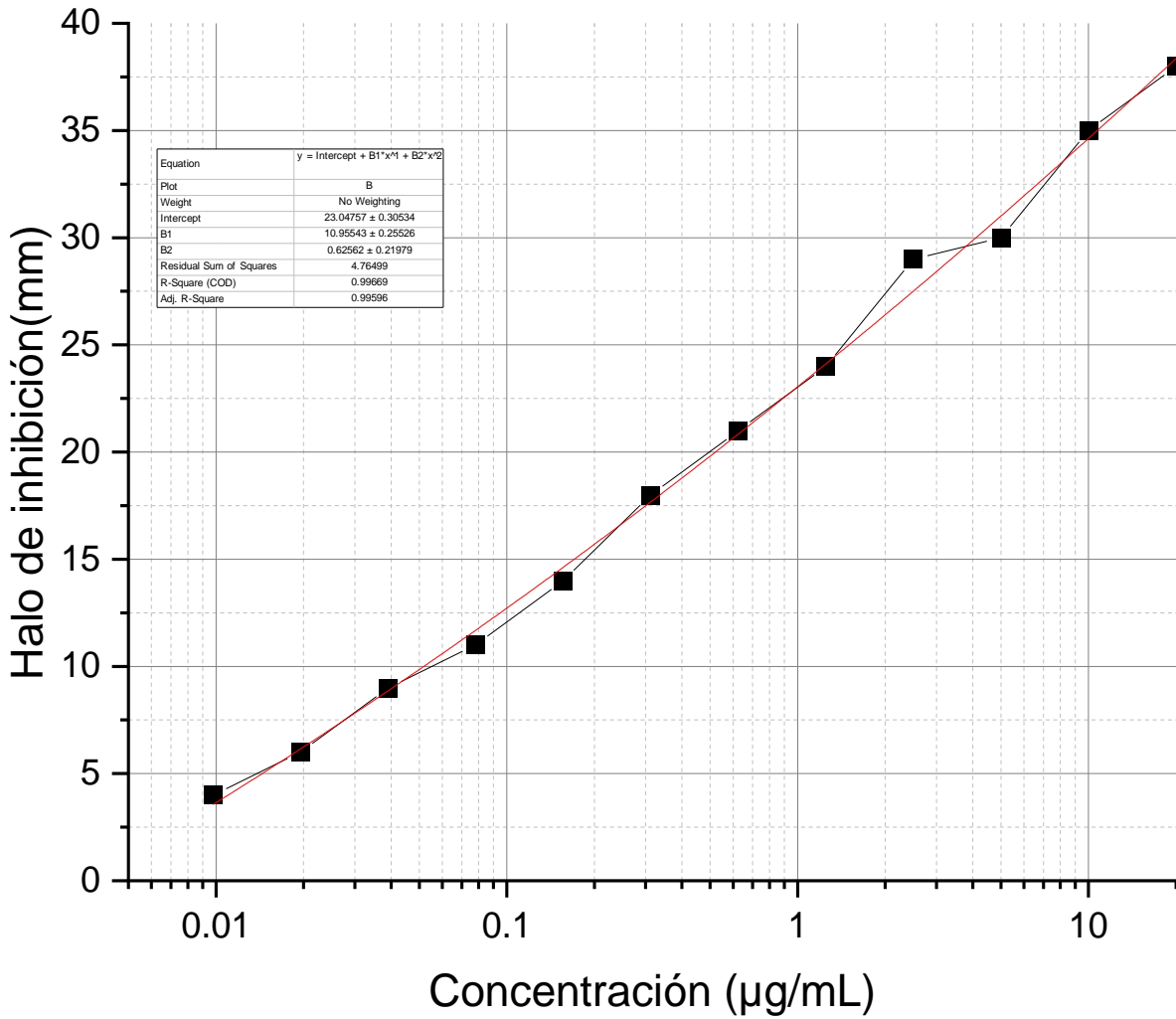


Figura 4. Regresión de la capacidad analítica (concentración/actividad) de florfenicol mediante la técnica de Bennet *et al.*⁶⁹, utilizando suero de pollo con florfenicol añadido.

7. RESULTADOS

El método produjo un resultado lineal de 0,01 a 20,47 µg/mL ($r^2 = 0,91$; $y = 500030x - 107045$). La recuperación de florfenicol se calculó aplicando un análisis de regresión lineal. Las muestras tuvieron un $r^2 = 0,977$ ($y = 0,072322308x + 0,1233375$). La precisión se demostró mediante el coeficiente de varianza entre días (3.1) y el valor de error entre ensayos (< 3,8). El límite inferior de cuantificación para florfenicol en suero fue de 0,01 µg/mL con un límite de detección de 0,008 µg/mL y se estableció linealidad hasta 20 µg/mL. Para robustez y tolerancia se obtuvo una diferencia absoluta de 1,77 y un coeficiente de varianza de 2,2% (< 3,0%). Se obtuvo una igualdad de concentraciones del método cromatográfico con el microbiológico del 99 % de los resultados.

Las concentraciones séricas obtenidas en las aves se presentan en el cuadro 3, mientras que los resultados de las evaluaciones farmacocinéticas obtenidas mediante PKAnalist se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 3.

Concentraciones séricas promedio de las aves dosificadas con florfenicol a dosis de 20 mg/kg vía oral divididas en 3 grupos, el grupo 1 administrado en agua bebida, el grupo 2 recubierto de chitosán/alginato de sodio administrado en proventrículo y grupo 3 recubierto de citosán/alginato de sodio administrado en el alimento.

Tiempo de muestreo (horas)	GRUPOS DE AVES					
	Gpo 1		Gpo 2		Gpo 3	
	Promedio ± 1DE		Promedio ± 1DE		Promedio ± 1DE	
0.5	0.83	0.11	0.96	0.9	1.01	0.8
1	8.26	1.07	7.14	1.4	8.16	1.5
2	3.42	0.86	10.2	1.3	10.3	1.6
4	1.76	0.23	8.23	1.4	8.06	1.2
6	0.65	0.18	6.14	1.2	6.23	1.1
8	0.24	0.09	5.21	0.9	5.17	1.2
12	0.14	0.08	4.43	0.9	4.61	0.9
24	0.08	0.01	1.24	0.4	1.12	0.8

Cuadro 4.

Valores medios (\bar{X}) \pm 1 desviación estándar (DE) de las variables farmacocinéticas de florfenicol en agua de bebida (grupo 1; referente); florfenicol recubierto de quitosán/alginate e incluido en masa de maíz (grupo 2) y administrado en bolo o incluido en *pellets* y administrado *ad libitum*, en todos los casos a 20 mg/kg (grupo 3). Los tres grupos fueron dosificados a razón de 20 mg/kg de peso corporal.

Variable FC	Grupo 1 $\bar{X} \pm 1$ DE	Grupo 2 $\bar{X} \pm 1$ DE	Grupo 3 $\bar{X} \pm 1$ DE
$K_{1/2el}$ (h)	1.04 \pm 0.12	4.33 \pm 0.27	4.38 \pm 0.13
α	0.80 \pm 0.03	0.46 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02
β	0.014 \pm 0.002	0.06 \pm 0.001	0.07 \pm 0.002
AUC (ml/kg/h)	20.97 \pm 1.2	128.7 \pm 9.36	128.3 \pm 8.97
AUMC (mL/kg/h ²)	303.42 \pm 19.25	1924.7 \pm 24.3	1822.8 \pm 18.6
RT (h)	14.5 \pm 0.87	14.96 \pm 0.74	14.21 \pm 0.67
C_{max} (μ g/mL)	8.26 \pm 1.0	10.2 \pm 1.3	10.3 \pm 1.6
T_{max} (h)	1	2	2
Fr (%)	-	613.73	611.82

$K_{1/2el}$ = vida media de eliminación; α = constante de absorción; β = constante de eliminación; AUC = área bajo la curva de concentración vs. tiempo; AUMC = área bajo la curva de concentración vs. tiempo en un momento; RT = tiempo medio de residencia; C_{max} = concentración máxima lograda; T_{max} = tiempo para lograr C_{max} ; Fr = biodisponibilidad relativa [$AUC_{grupo\ 1}/AUC_{grupo\ 2\ o\ 3} \times 100$].

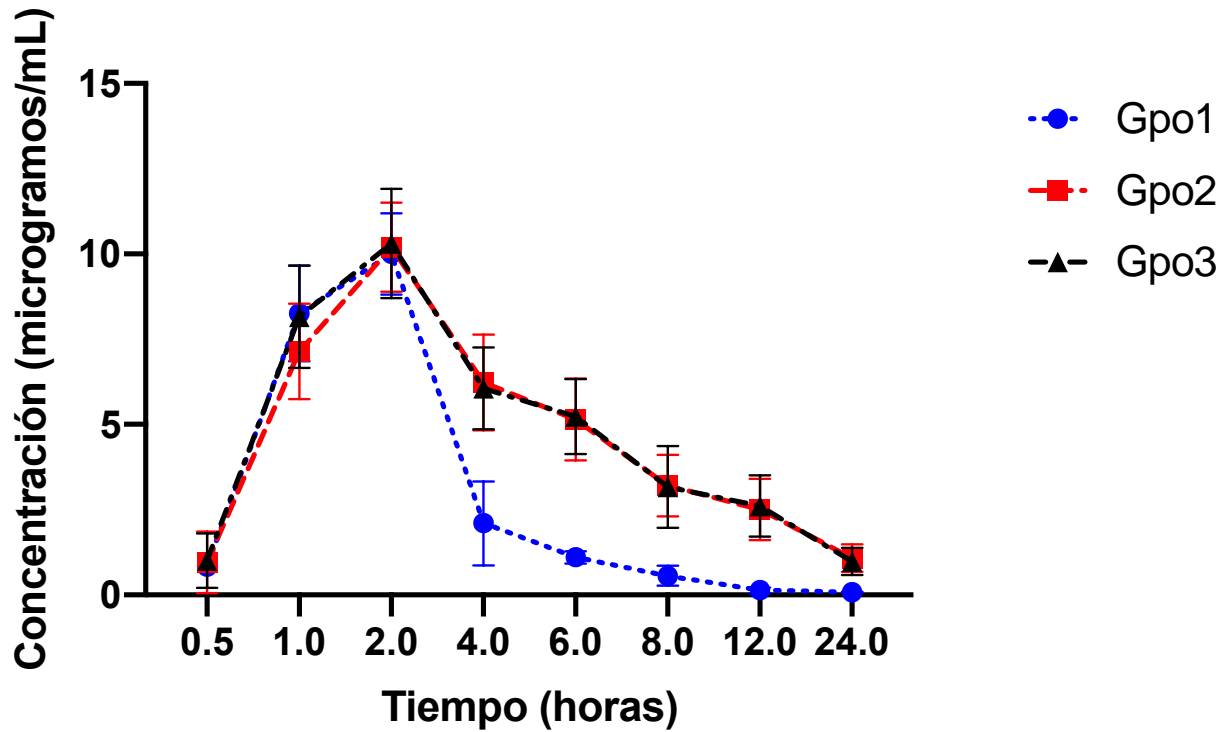


Figura 5. Concentraciones/actividades antimicrobianas plasmáticas en el tiempo de florfenicol en aves Bovans-White, posterior a la administración de florfenicol en agua de bebida (grupo 1; referente); florfenicol recubierto de quitosán/alginato e incluido en masa de maíz (grupo 2) y administrado en bolo o incluido en *pellets* y administrado *ad libitum*, en todos los casos a 20 mg/kg (grupo 3). Los tres grupos fueron dosificados a razón de 20 mg/kg de peso corporal.

8. DISCUSIÓN

El surgimiento de resistencias bacterianas y las medidas restrictivas que están tomando organismos internacionales como la OMS y la FAO, así como nacionales (SADER), están restringiendo cada vez más el uso de los antibacterianos en el área veterinaria, particularmente en las áreas productivas. Para la investigación en farmacología esto significa la reorientación de la investigación y docencia hacia optimizar el uso de los antibacterianos con los que se cuenta ^(1,45, 46, 47). De tal suerte, se considera que es de suma importancia buscar nuevas formas farmacéuticas para dar un uso más racional a estos medicamentos en la industria avícola. Si se considera al florfenicol como uno de los antibacterianos de mayor uso para enfermedades respiratorias complicadas en las aves, en virtud de su amplio espectro y potencia, resulta procedente buscar una adecuada relación PK/PD en esta especie, lo que se puede lograr mediante diseño farmacéutico adaptado al tracto digestivo de las aves y cumpliendo las necesidades de un antibacteriano tiempo dependiente.

El uso de vehículos que proporcionen una liberación sostenida en una especie en la cual el tránsito gastrointestinal no es superior a 6 – 8 horas favorecerá una mayor estancia y dada la liposolubilidad del florfenicol, una mejor absorción a lo largo del tubo digestivo. Adicionalmente se ha postulado que para que su eficacia clínica sea óptima se requiere inicialmente una elevación de la C_{max} a concentraciones de aproximadamente 2-4 veces la CMI para los patógenos diana y que su estancia se prolongue lo más posible entre intervalos de dosificación (ID) ^(48, 49, 50, 51), al menos un 70% de dicho ID. De tal suerte, se pueden postular a los preparados de florfenicol quitosán/alginato como adecuados toda vez que logran las metas formuladas de PK/PD y superan los valores de referencia del florfenicol en el agua de bebida ^(52, 53, 54, 55, 56). La mayor congruencia PK/PD de los grupos experimentales se puede apreciar en la figura 5 dado que supera valores de 2 µg/mL casi por 24 horas con lo que se cubre en plasma lo necesario para el control de patógenos sensibles y aún bacterias medianamente sensibles (rangos de 0.1 – 2.0 µg/mL y 1 - 4 µg/mL respectivamente), Por ejemplo, se ha documentado para *Escherichia coli* y *Salmonella* sp. Que la administración de florfenicol es útil toda vez que se logren concentraciones plasmáticas y tisulares en rangos de 0.5 a 6 µg/mL y 0.05 – 1 µg/mL ^(56,57, 58, 59).

Es importante destacar que, a pesar de utilizar una misma dosis (20 mg/kg de peso), se logran mejores valores de biodisponibilidad relativa en los grupos experimentales (obviamente por comparación al florfenicol de referencia administrado en el agua de bebida). Este tipo de comportamientos es común cuando se generan formulaciones de liberación modificada. No obstante, en este caso fueron hasta 600 veces mayores a los valores del florfenicol de referencia. Esto reafirma que el uso de vehículos promotores de la biodisponibilidad y con carácter gastroretentivos, favorecen los procesos de absorción del florfenicol durante el tránsito gastrointestinal de las aves. En este ensayo

no se buscó una explicación a lo sucedido, solo se caracterizó, pero quizá se justifique que, al aumentar los tiempos de residencia en el tubo gastrointestinal, se favorezcan y prolonguen los procesos de absorción y con ello se mejore la biodisponibilidad. Hay que tomar en cuenta que uno de sus principales problemas en la absorción de principios activos en las aves es la corta estancia de los medicamentos en los sitios de absorción a nivel del digestivo, particularmente del asa duodenal (60, 61, 62, 63).

En aves comerciales se ha definido que el florfenicol presenta una menor biodisponibilidad cuando se administra en el alimento y que la biodisponibilidad oral parece ser menor en animales alimentados (55 %) que en animales en ayunas (87–96 %) (6,70). No obstante, este estudio permite deducir que si se realiza un diseño farmacéutico que se ajuste a la fisiología y anatomía de la especie diana (en este caso aves domésticas), los preparados de liberación modificada pueden llegar a ser superiores a los utilizados convencionalmente en el agua de bebida (63, 64, 65).

Finalmente, se puede deducir de este ensayo que con una dosis convencional de florfenicol se alcanzan concentraciones terapéuticas y adecuadas desde el punto de vista de las proporciones PK/PD, con lo que este antimicrobiano podrá lograr, al menos en teoría, mejores resultados clínicos, postulado que deberá comprobarse en ensayos clínicos. De cualquier manera, es de resaltar que el florfenicol tiene buena penetración a diferentes órganos y logra elevadas concentraciones en riñones, bilis, pulmones, músculo, intestino, corazón, hígado, bazo y suero (63). En particular se destaca aquí su uso actual y potencial de éste antimicrobiano en enfermedades pulmonares y de sacos aéreos y cuando se juzgue necesario de manera metafiláctica (es decir, tratar a un grupo de animales cuando uno muestra signos de infección), sin que la forma de administrarse por medio del alimento afecte la eficacia y en todo caso la mejore y sin afectar el nivel de dosificación de 20 mg/kg. Se añade que, dado el carácter de antimicrobiano dependiente del tiempo, los días de tratamiento se postulan entre 5 y 7 (6,70), pero los costos de medicación no serán superiores a los que ya se han contabilizado para la administración en el agua de bebida. También es necesario destacar que aún se requieren ensayos formales para determinar si el aumento en el valor de RT (tiempo medio de residencia en el organismo) observado para el florfenicol en chitosán/alginato no aumenta el tiempo de retiro y se anticipa, dada la liposolubilidad del florfenicol que no servirá para gallina productora de huevo para plato a menos que se respeten los tiempos de retiro a determinar (15, 65, 66, 67, 68).

9. REFERENCIAS

1. McEwen, SA y Fedorka-Cray, PJ (2002) “Uso y resistencia a antimicrobianos en animales”, *Enfermedades infecciosas clínicas: una publicación oficial de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América*, 34 Suppl 3(s3), pp. S93–S106. doi: 10.1086/340246.

2. La Resistencia Bacteriana a Antibióticos: Un Problema Ambiental y Multisectorial (sin fecha) Uadec.mx. Disponible en: <http://www.biochemtech.uadec.mx/2020/07/15/la-resistencia-bacteriana-a-antibioticos-un-problema-ambiental-y-multisectorial/> (Consultado: 12 abril 2022).
3. Torquebiau, E. (1992) “¿Son sostenibles los huertos familiares agroforestales tropicales?”, *Agricultura, ecosistemas y medio ambiente*, 41(2), págs. 189–207. doi: 10.1016/0167-8809(92)90109-o.
4. Martínez, Y. et al. (2012) “Utilización del *Anacardium occidentale* como nutracéutico en dietas hipoproteicas para gallinas ponedoras”, *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46(4), pp. 395–401.
5. Rodríguez, B. et al. (2018) “Evaluación de la harina de forraje de *Tithonia diversifolia* para la alimentación de gallinas ponedoras”, *Livestock Research for Rural Development*, 30(3).
6. Anadón A, Aranzazu M, Martínez M, Ríos A, Caballero V, Ares I, Martínez Larrañaga MR. Plasma and tissue depletion of florfenicol and florfenicol amine in chickens. *J Agric Food Chem.* (2008) 56:11049–56. doi: 10.1021/jf802138y
7. Pym, R., Bleich, G. y Hoffmann, E. (2006) “La contribución relativa de las razas autóctonas de pollos a la producción y el consumo de carne de ave y huevos en los países en desarrollo de África y Asia”, En *Actas de la XII Conferencia Avícola Europea*, 1014.
8. Shardul, V. et al. (2021) “Producción avícola de traspatio y su importancia”, *Ciencias Veterinarias Científicas*, 3(1), págs. 23–28.
9. L., Z. et al. (2011) *Avicultura familiar en comunidades indígenas de Chiapas, México*, Uco.es. Disponible en: http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2011/Zaragoza2011_1_411_415.pdf (Consultado: el 1 de junio de 2023).
10. Juárez, CA y Pérez, TJ (2003) “Comportamiento de la parvada de gallinas criollas en condiciones naturales del medio rural”, *Ciencia Nicolaita*, 35, pp. 73–80.
11. Hamilton-West, C. et al. (2012) “Caracterización de los sistemas de producción avícola de traspatio y riesgo de enfermedades en la zona central de Chile”, *Investigación en ciencias veterinarias*, 93(1), pp. 121–124. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.06.015.

12. Mariaca M, Cano C. Proyecto FORDECYT “Gestión Y Estrategias De Manejo Sustentable Para El Desarrollo Regional En La Cuenca Hidrográfica Transfronteriza Grijalva” Subproyecto de Enriquecimiento de Milpas y Huertos Familiares. Memorias de talleres en ECOSUR. 2010. <https://xdoc.mx/preview/caracterizacion-y-enriquecimiento-de-la-milpa-5e6a9d8b7fc02> (Consultado: el 15 agosto de 2022).
13. Tikhomirov, M. et al. (2021) "Farmacocinética de florfenicol y tiamfenicol después de una sola administración oral e intravenosa, así como múltiples administraciones orales a gansos", *ciencia avícola británica*, 62(1), págs. 25–31. doi: 10.1080/00071668.2020.1824290.
14. Abd El-Aty, AM et al. (2004) “Farmacocinética y biodisponibilidad del florfenicol después de la administración intravenosa, intramuscular y oral en conejos”, *Comunicaciones de investigación veterinaria*, 28(6), págs. 515–524. doi: 10.1023/b:verc.0000040241.06642.49.
15. Shen, J., Hu, D. y Wu, X. (2003) “Biodisponibilidad y farmacocinética de florfenicol en pollos de engorde. *Revista de Farmacología y Terapéutica Veterinaria*”, JR, 26(5), pp. 337–341.
16. Mei, X. et al. (2021) “Florfenicol enhances colonization of a *Salmonella enterica* serovar enteritidis floR mutant with major alterations to the intestinal Microbiota and metabolome in neonatal chickens”, *Applied and environmental microbiology*, 87(24), p. e0168121. doi: 10.1128/AEM.01681-21.
17. Li, Z. et al. (2022) “Florfenicol-polyarginine conjugates exhibit promising antibacterial activity against resistant strains”, *Frontiers in chemistry*, 10, p. 921091. doi: 10.3389/fchem.2022.921091.
18. Héctor, S. y Lilia, G. (2010) *Farmacología clínica en aves comerciales*. 4ta. Edición México, DF: McGraw-Hill-Interamericana editores.
19. Procuraduría Federal del Consumidor (2017) Comparativo de precios de medicamentos, [gob.mx](https://www.gob.mx). Disponible en: <https://www.gob.mx/profeco/documentos/comparativo-de-precios-de-medicamentos?state=published> (Consultado: el 28 abril de 2022).

20. Industria farmacéutica: valor de la producción México 2014-2019 (2023) Statista. Disponible en: <https://es.statista.com/estadisticas/613948/valor-de-la-produccion-farmaceutica-mexico/> (Consultado: el 27 de mayo de 2023).
21. CAEME (2019) “¿Cuánto cuesta producir un nuevo medicamento?”, CAEME, 2 julio. Disponible en: <https://www.caeme.org.ar/cuanto-cuesta-producir-un-nuevo-medicamento/> (Consultado: el 27 mayo de 2023).
22. Puvača, N. et al. (2020) “Influence of different tetracycline antimicrobial therapy of Mycoplasma (Mycoplasma synoviae) in laying hens compared to tea tree essential oil on table egg quality and antibiotic residues”, *Foods* (Basel, Switzerland), 9(5), p. 612. doi: 10.3390/foods9050612.
23. Los sistemas de liberación modificada de fármacos (sin fecha) Gov.ar. Disponible en: <https://bahiablanca.conicet.gov.ar/boletin/boletin29/indexb452.html> (Consultado: el 3 abril de 2022).
24. Piña, K. A. P. (2022) Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.
25. Rai, P. (2019) “Zidovudine: Formulation and development of matrix tablets”, *Research Article ISSN*, 8(6), pp. 1005–1021. doi: 10.20959/wjpr20196-14845.
26. Busatto, C. A. et al. (sin fecha) MICROESFERAS BIODEGRADABLES DE PLGA PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE PROGESTERONA, Org.br. Disponible en: http://slabo.org.br/cont_anais/anais_9_colaob/manuscript/18-014TT.pdf (Consultado: el 23 marzo 2022).
27. Sheskey, P. J. et al. (eds.) (2020) *Handbook of pharmaceutical excipients: Edition 9. 9a ed.* London, England: Pharmaceutical Press.
28. Chenite, A. et al. (2000) “Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ”, *Biomaterials*, 21(21), pp. 2155–2161. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00116-2.
29. Ahmed, T. A. y Aljaeid, B. M. (2016) “Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery”, *Drug design, development and therapy*, 10, pp. 483–507. doi: 10.2147/DDDT.S99651.

30. Guadarrama-Escobar, O. R. et al. (2023) "Chitosan nanoparticles as oral drug carriers", *International journal of molecular sciences*, 24(5). doi: 10.3390/ijms24054289.
31. Mohammed, G. M. et al. (2021) "Potential improvement of the immune response of chickens against E. coli vaccine by using two forms of chitosan nanoparticles", *International journal of biological macromolecules*, 167, pp. 395–404. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.200.
32. Laurienzo, P. (2010) "Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview", *Marine drugs*, 8(9), pp. 2435–2465. doi: 10.3390/md8092435.
33. Rauw, F. et al. (2010) "The positive adjuvant effect of chitosan on antigen-specific cell-mediated immunity after chickens vaccination with live Newcastle disease vaccine", *Veterinary immunology and immunopathology*, 134(3–4), pp. 249–258. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.10.028.
34. Wang, W. et al. (2020) "Chitosan derivatives and their application in biomedicine", *International journal of molecular sciences*, 21(2), p. 487. doi: 10.3390/ijms21020487.
35. Limsatanun, A., Sasipreeyajan, J. y Pakpinyo, S. (2018) "La bacteria de *Mycoplasma gallisepticum* adyuvada con quitosano mediante administración intraocular mejora la protección de *Mycoplasma gallisepticum* en ponedoras comerciales", *Poultry science*, 97(6), pp. 1934–1940. doi: 10.3382/ps/pey051.
36. Valderrama, JET (2018) Evaluación de la capacidad depuradora de *Chlorella vulgaris* Beyerinck inmovilizada en alginato para el tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Huara-Lima. UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE.
37. Vacío-Muro, KJ et al. (2020) "REMOCIÓN DE CONTAMINANTES DEL NEJAYOTE CON ALGINATO Y QUITOSANO", *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. doi: 10.20937/rica.53185.
38. Bedoya, LO (2018) Efectividad de un hongo inmovilizado en alginato para solubilizar P y promover el crecimiento vegetal en suelos tropicales. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
39. G., H.-C., Rodríguez-Montesinos, Y. E., Arvizu-Higuera, D. L., Reyes-Tisnado, R., Murillo-Álvarez, J. I. y Muñoz-Ochoa, M. (2012) «Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México», *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 13(2).

Disponible en: <https://www.revistas.unam.mx/index.php/ingenieria/article/view/30833>
(Consultado: el 3 abril de 2022).

40. Murillo-Álvarez, JI y Hernández-Carmona, G. (2007) "Composición y secuencia de monómeros del alginato de sodio extraído a escala de planta piloto de tres algas comercialmente importantes de México", *Revista de sicología aplicada*, 19(5), pp. 545–548. doi: 10.1007/s10811-007-9168-5.

41. Dhamecha, D. et al. (2019) "Aplicaciones de microesferas de alginato en la administración de tratamientos y cultivo celular: pasado, presente y futuro", *Revista internacional de productos farmacéuticos*, 569 (118627), pág. 118627. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118627

42. Bishnoi, S. et al. (2022) "Películas de polisacáridos-proteínas ajustables hechas de proteínas acuosas de trigo y soluciones de alginato", *Química de los alimentos*, 391 (133196), p. 133196. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133196.

43. Ayuntamiento de texcoco (2021) Gob.mx. Disponible en: <https://www.texcocoedomex.gob.mx/> (Consultado: el 3 abril de 2022).

44. Yu, Y. et al. (2023) "La diversidad genética y fenotípica de *Bacillus* spp. Del sistema de maricultura en China y su función potencial contra el *Vibrio* patógeno", *Drogas marinas*, 21(4). doi: 10.3390/md21040228.

45. Bavera, MVG (2013) Resistencia a los antimicrobianos en la medicina veterinaria y su relación con la salud pública. *Información Veterinaria (CMVOC)*, Com.ar. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar> (Consultado: el 3 abril de 2022).

46. Tameirão, ER et al. (2021) "Eficacia de florfenicol para el tratamiento de pioderma por *Staphylococcus intermedius* en perros", *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 32(1), p. e17678. doi: 10.15381/rivep.v32i1.17678

47. Mestorino, N., Daniele, M. y Errecalde, JO (sin fecha) RESIDUOS TISULARES DE FLORFENICOL TRAS SU ADMINISTRACIÓN ORAL EN POLLOS PARRILLEROS, Edu.ar. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/118352/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1 (Consultado: el 29 octubre de 2022).

48. Ángel, R. et al. (sin fecha) VELOCIDAD DE PASO Y PH INTESTINAL EN AVES: IMPLICACIONES PARA LA DIGESTIÓN Y EL USO DE ENZIMAS, Com.ar.

Disponible en: https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/produccion_avicola/05-13CAP_VIIItrad.pdf

(Consultado: el 29 octubre de 2022).

49. Mohammed, GM et al. (2021) "Mejora potencial de la respuesta inmunitaria de los pollos contra la vacuna E. coli mediante el uso de dos formas de nanopartículas de quitosano", Revista internacional de macromoléculas biológicas, 167, págs. 395–404. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.200.

50. González, R. y Martínez-Piñeiro, E. (2018) "Nuevos quimioterápicos endovesicales y vehículos de aplicación", Arch Esp Urol, 71(4), pp. 384–392.

51. Mendoza-Muñoz, N. et al. (2021) "Nanopartículas de lípidos sólidos: un enfoque para mejorar la administración oral de fármacos", Revista de farmacia y ciencias farmacéuticas: una publicación de la Sociedad Canadiense de Ciencias Farmacéuticas, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques, 24, págs. 509–532. doi: 10.18433/jpps31788.

52. Gharaibeh, S. y Al-Rashdan, M. (2011) "Change in antimicrobial susceptibility of Mycoplasma gallisepticum field isolates", Veterinary microbiology, 150(3–4), pp. 379–383. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.005.

53. Catania, S. et al. (2019) "Evaluación de concentraciones inhibitorias mínimas para 154 aislamientos de Mycoplasma synoviae de Italia recolectados durante 2012-2017", PloS one, 14(11), p. e0224903. doi: 10.1371/journal.pone.0224903.

54. Ayling, RD et al. (2000) "Comparación de la actividad in vitro de danofloxacin, florfenicol, oxitetraciclina, espectinomicina y tilmicosina contra Mycoplasma mycoides subespecie mycoides tipo de colonia pequeña", Registro veterinario, 146(9), págs. 243–246. doi: 10.1136/vr.146.9.243.

55. Li, Z. et al. (2022) "Los conjugados de florfenicol-poliarginina exhiben una actividad antibacteriana prometedora contra cepas resistentes", Frontiers in chemistry, 10, p. 921091. doi: 10.3389/fchem.2022.921091.

56. Liu, J. et al. (2022) "Actividad antibacteriana de nanogeles compuestos de florfenicol contra variantes de colonias pequeñas de Staphylococcus aureus", Revista de ciencia veterinaria, 23(5), p. e78. doi: 10.4142/jvs.22046.

57. Jourquin, S. et al. (2022) “Ensayo de campo aleatorizado que compara la eficacia del florfenicol y la oxitetraciclina en un brote natural de neumonía en terneros utilizando la reaeración pulmonar como criterio de curación”, *Revista de medicina interna veterinaria*, 36(2), págs. 820–828. doi: 10.1111/jvim.16348.
58. Mechesso, AF y Park, S.-C. (2020) "La exposición a la tilosina reduce la susceptibilidad de *Salmonella Typhimurium* al florfenicol y la tetraciclina", *Investigación veterinaria de BMC*, 16(1), p. 22. doi: 10.1186/s12917-020-2246-5.
59. Kim, S. et al. (2020) “Sinergia entre florfenicol y aminoglucósidos contra aislados de *Escherichia coli* resistentes a múltiples fármacos del ganado”, *Antibióticos* (Basilea, Suiza), 9(4), pág. 185. doi: 10.3390/antibióticos9040185.
60. Herrera Barros, AP et al. (2016) “PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO MODIFICADAS CON ALGINATO DE SODIO CON POTENCIAL PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE MEDICAMENTOS”, *Revista EIA*, 3(12), pp. 75–83. doi: 10.24050/reia.v12i2.965.
61. Ángel, R. et al. (2013) VELOCIDAD DE PASO Y PH INTESTINAL EN AVES: IMPLICACIONES PARA LA DIGESTIÓN Y EL USO DE ENZIMAS, *Com.ar*. Disponible en: https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/produccion_avicola/05-13CAP_VIIItrad.pdf (Consultado: el 16 agosto de 2022).
62. Bello, A. et al. (2022) “The influence of the site of drug administration on florfenicol pharmacokinetics in turkeys”, *Poultry science*, 101(1), p. 101536. doi: 10.1016/j.psj.2021.101536.
63. Kogiannou, D. et al. (2021) “Evaluación de la absorción y el agotamiento del florfenicol en la lubina europea *Dicentrarchus labrax*”, *Medicina y ciencia veterinaria*, 7(3), págs. 987–997. doi: 10.1002/vms3.415.
64. Li, P. et al. (2022) “Caracterización molecular de la resistencia a florfenicol y oxazolidinona en aislamientos de *Enterococcus* de animales en China”, *Frontiers in microbiology*, 13, p. 811692. doi: 10.3389/fmicb.2022.811692.
65. Sumano, LH et al. (2004) “Influencia del agua dura en la biodisponibilidad de la enrofloxacin en pollos de engorde”, *Poultry Science*, 83(5), págs. 726–731. doi: 10.1093/ps/83.5.726.

66. La agencia europea para la evaluación de medicamentos veterinarios e inspecciones (2002) Europa.eu. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/florfenicol-extension-all-food-producing-species-summary-report-6-committee-veterinary-medicinal_en.pdf (Consultado el 2 abril de 2023)
67. Müller, MM, Nediakov, R. y Arndt, KM (2022) "Estrategias para la inactivación enzimática del antibiótico veterinario florfenicol", *Antibióticos* (Basilea, Suiza), 11(4), p. 443. doi: 10.3390/antibióticos11040443.
68. Sumano LH y Gutiérrez OL (2005) *Farmacología clínica en aves*. México: McGraw-Hill.
69. Bennet JB, Brodie JL, Benner EJ, Kirby WM. 1966. Simplified accurate method for antibiotic assay. *Clinical specimens*. American Society for Microbiology. 14:170-177.
70. Afifi NA, El-Sooud KA. Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *British Poultry Sci.* (1997) 38:425–8. doi: 10.1080/00071669708418013