



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

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE PREPARADOS DE QUINFAMIDA**  
**PARA EL TRATAMIENTO DE COCCIDIOSIS EN POLLO DE ENGORDA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**ITZCOATL FELIPE AQUINO DÍAZ**

**TUTOR:**

**HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM.**

**COMITÉ TUTORAL:**

**YAZMÍN ALCALÁ CANTO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM.**

**HELGI JUNG COOK**

**FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX. NOVIEMBRE 2017**



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.

## **DEDICATORIAS**

A Claudia Ledesma Carrasco por estar a mi lado durante esta investigación brindándome todo su apoyo, cariño y comprensión.

A mi padre Felipe Aquino Hernández por demostrarme que a pesar de las adversidades siempre se puede salir adelante.

A mi sobrino Gabriel Aquino para inspirarlo a superarse a sí mismo cada día.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Héctor Sumano López por todo el apoyo y atención que me ha brindado para realizar exitosamente este proyecto de investigación como Tutor Principal.

A la Dra. Yasmín Alcalá Canto por su participación como integrante del comité tutorial y por toda la ayuda brindada en el área de Parasitología.

A la Dra. Helgi Jung Cook por su participación como integrante del comité tutorial y por su colaboración para la cuantificación de quinfamida por cromatografía de líquidos de alta resolución.

A la Maestra María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz, por su colaboración para la cuantificación de quinfamida por cromatografía de líquidos de alta resolución.

A la Química Diana Alejandra Flores Gonzáles, quien colaboró en la cuantificación de quinfamida en suero y heces.

A la Dra. Graciela Tapia Pérez por su asesoría para la realización del análisis estadístico.

Al área de Farmacia de la Facultad de Química UNAM, por su colaboración para la cuantificación de quinfamida en suero y heces.

Al Dr. Luis Ocampo Camberos jefe del departamento de Fisiología y Farmacología, por todo el apoyo brindado para concluir exitosamente este trabajo de investigación.

A Claudia Ledesma Carrasco por toda su paciencia, cariño, comprensión y ayuda brindada durante la realización de esta investigación.

Al CONACYT por el apoyo económico que me otorgó para realizar mis estudios de Doctorado.

## RESUMEN

Existe una creciente necesidad de novedosos principios activos para el control de la coccidiosis en pollos y es justificable evaluar nuevas opciones farmacológicas. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia anticoccidiana de quinfamida en pollos. En una primer fase se determinó la dosis de quinfamida con máxima eficacia. Una dosis de 30 mg/kg de peso fue establecida. Una nueva serie de ensayos determinó que el carbopol fue el mejor para combinar con quinfamida. Utilizando esta última combinación, tres diferentes tratamientos se administraron por un periodo de 49 días de la siguiente manera: quinfamida; quinfamida-carbopol y decoquinato como referencia, todos preparados en pellets y mezclados con el alimento a dosis de 30 ppm cada fármaco. Los parámetros medidos fueron: ganancia de peso, número de ooquistes excretados por gramo de cama y el grado de lesión intestinal. La ganancia de peso de quinfamida y quinfamida-carbopol fue significativamente mayor para estos grupos en comparación a los grupos control. Sin embargo, solo el grupo quinfamida-carbopol mostro eficacia similar al decoquinato en el conteo de ooquistes. El grado de lesión intestinal fue menos visible en el grupo quinfamida-carbopol. Basado en estos resultados, se concluyo que la quinfamida posee baja eficacia anticoccidiana. Aunque, ésta se incrementa cuando se prepara en pellets con carbopol. La adhesión del carbopol a la mucosa intestinal puede intervenir en el tiempo de residencia de quinfamida en el tracto gastrointestinal, mejorando la eficacia. Adicionalmente, la biodisponibilidad de quinfamida fue estudiada mediante cromatografía de líquidos, basado en un método previamente validado para humanos. Los resultados muestran que la quinfamida no se absorbe en el tracto gastrointestinal y se elimina por heces. Aunque aproximadamente 18% de la dosis no fue cuantificada en heces o suero. Por lo tanto, es necesario seguir trabajando para definir si su biotransformación es en el tracto gastrointestinal o si hay un metabolismo de primer paso.

**Palabras clave:** anticoccidiano, pollos, coccidiosis, pellets, quinfamida

## **Abstract**

There is a growing need for novel drugs to control coccidiosis in poultry and It is justifiable to assess new pharmacological options. Hence, the aim of this work was to evaluate the anticoccidial efficacy of quinfamide in broilers. First phase aimed at determining the dose of quinfamide for maximum efficacy. A dose of 30 mg/kg of body weight was established. A further set of trials established that carbopol was the best vehicle to combine with quinfamide. Using this latter combination, three different treatments were implemented over a 49 day period as follows: quinfamide; quinfamide plus carbopol and decoquinate as reference, all prepared as pellets and mixed with feed at a dose of 30 ppm of either drug. Parameters measured were: body weight gain, number of oocysts shedding per gram of litter and degree of intestinal gross lesions. Body weight gain was statistically greater for quinfamide and quinfamide-carbopol groups in comparison to control groups. However, only the quinfamide-carbopol group showed similar efficacy in the occyst counts as compared to the decoquinate group. Intestinal lesion-scores were less conspicuous in quinfamide-carbopol group. Based on these results, it is concluded that quinfamide possesses a low anticoccidial efficacy. However, this is noticeably improved when it is prepared as pellets with carbopol. The adhesion of carbopol to intestinal mucosa may influence residence time of quinfamide in the gastrointestinal tract, thus enhancing efficacy. Additionally, systemic bioavailability of quinfamide was studied using Liquid Chromatography as analytical technique, based on a method previously validated for humans. Results show that quinfamide is not absorbed at the gastrointestinal tract and elimination occurs through stools. However approximately 18% of the dose was not accounted for neither in faeces nor in serum. Hence further work is needed to define whether or not biotransformation occurs at the gastrointestinal tract or if there is a first pass metabolism.

**Key words:** anticoccidial, broilers, coccidiosis, pellets, quinfamide

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Control .....	2
1.3 Ciclo de coccidias .....	3
1.4 Lesiones .....	4
1.5 Fármacos anticoccidianos .....	4
1.6 Tiempos de retiro .....	5
1.7 Desarrollo de nuevos fármacos anticoccidianos .....	6
1.8 Quinfamida .....	7
1.8.1 Antecedentes de quinfamida vs Eimeria sp. ....	8
1.9 Vehículos mucoadhesivos .....	8
1.9.1 Quitosán .....	9
1.9.2 Carbopol .....	10
1.10. Justificación .....	10
1.11 Hipótesis .....	11
1.12 Objetivo general .....	11
1.13 Objetivos específicos .....	11
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	12
2.1 Modelo experimental .....	12
2.1.1 Obtención de material biológico .....	12
2.1.2 Eficacia anticoccidiana de quinfamida .....	12
2.1.3 Cuantificación de quinfamida en suero y heces .....	13
2.2 Aves y tratamientos .....	13
2.2.1 Preparación de los tratamientos .....	14
2.2.2 Fase 1. Evaluación de dosis de quinfamida .....	14
2.2.3 Fase 2. Evaluación de dosis de quinfamida-quitosán .....	15
2.2.4 Fase 3. Evaluación de dosis de quinfamida-carbopol .....	15
2.2.5 Fase 4. Evaluación de la eficacia anticoccidiana de quinfamida	

sola y en combinación con carbopol durante un ciclo productivo .....	16
2.2.6 Cuantificación de quinfamida en suero y heces .....	17
2.3 Procesamiento de las muestras .....	17
2.3.1 Conteo de ooquistes .....	17
2.3.2 Grado de lesión .....	18
2.3.3 Cuantificación de quinfamida en suero y heces .....	18
2.4 Análisis estadístico .....	20
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
3.1 Eficacia anticoccidiana de quinfamida .....	21
3.1.1 Fase 1. Evaluación de dosis de quinfamida .....	21
3.1.2 Fase 2. Evaluación de dosis de quinfamida-quitosán .....	23
3.1.3 Fase 3. Evaluación de dosis de quinfamida-carbopol .....	26
3.1.4 Fase 4. Evaluación de la eficacia anticoccidiana de quinfamida sola y en combinación con carbopol durante un ciclo productivo .....	28
3.2 Cuantificación de quinfamida en suero y heces .....	32
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>39</b>
<b>6. REFERENCIAS</b> .....	<b>40</b>



## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b>	Tiempos de retiro de los anticoccidianos más utilizados en pollo de engorda .....	6
<b>Cuadro 2</b>	Componentes de la suspensión de quinfamida .....	14
<b>Cuadro 3</b>	Características macroscópicas para determinar el grado de lesión .....	18
<b>Cuadro 4</b>	Promedio de peso corporal (g) $\pm$ EE de las aves tratadas con diferentes dosis de quinfamida .....	21
<b>Cuadro 5</b>	Eficacia anticoccidiana de quinfamida basada en el promedio de ooquistes por gramo de heces $\pm$ EE .....	22
<b>Cuadro 6</b>	Porcentaje de eficacia de quinfamida basado en la cuantificación de ooquistes por gramo de heces de los diferentes tratamientos al día 7 post- tratamiento .....	22
<b>Cuadro 7</b>	Eficacia anticoccidiana de quinfamida basada en el máximo grado de lesión intestinal al final del estudio .....	23
<b>Cuadro 8</b>	Promedio de peso corporal (g) $\pm$ EE de las aves tratadas con quinfamida sola y en combinación con quitosán .....	23
<b>Cuadro 9</b>	Eficacia anticoccidiana de quinfamida sola y en combinación con quitosán basada en el promedio de ooquistes por gramo de heces $\pm$ EE .....	24
<b>Cuadro 10</b>	Porcentaje de eficacia de quinfamida sola y en combinación con quitosán a partir de la cuantificación de ooquistes por gramo de heces .....	25
<b>Cuadro 11</b>	Eficacia anticoccidiana de quinfamida basada en el máximo grado de lesión intestinal al final del estudio .....	25
<b>Cuadro 12</b>	Promedio de peso corporal (g) $\pm$ EE de las aves tratadas con quinfamida sola y en combinación con carbopol .....	26
<b>Cuadro 13</b>	Eficacia anticoccidiana de quinfamida sola y en combinación con carbopol basada el promedio de ooquistes por gramo de heces $\pm$ EE ...	27
<b>Cuadro 14</b>	Porcentaje de eficacia de quinfamida sola y en combinación con carbopol a partir de la cuantificación de ooquistes por gramo de heces .....	28

<b>Cuadro 15</b>	Eficacia anticoccidiana de quinfamida basada en el máximo grado de lesión intestinal al final del estudio .....	28
<b>Cuadro 16</b>	Promedio de peso corporal (g) $\pm$ EE de las aves en los diferentes tratamientos .....	29
<b>Cuadro 17</b>	Eficacia anticoccidiana de los diferentes tratamientos basada en el promedio de ooquistes por gramo de cama $\pm$ EE .....	30
<b>Cuadro 18</b>	Porcentaje de eficacia de en los diferentes tratamientos a partir del conteo de ooquistes por gramo de cama .....	31
<b>Cuadro 19</b>	Eficacia anticoccidiana en los diferentes tratamientos basada en el máximo grado de lesión por región intestinal y por día .....	31

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ciclo de vida de <i>Eimeria</i> sp .....	3
<b>Figura 2</b>	Fórmula estructural y desarrollada de la quinfamida .....	7
<b>Figura 3</b>	Método de extracción de quinfamida para muestras de suero .....	20
<b>Figura 4</b>	Ejemplo de cromatograma resultante de la medición de quinfamida adicionada a suero de pollo (2.0 µg/mL). Se detectó en un tiempo de retención de 7.5 min y con una altura de 13475 mAU (Unidades de Absorbancia). Esta muestra fue utilizada como parte de la curva de calibración de quinfamida y para determinar su tiempo de retención. Se utilizó diazepam como estándar interno y se encontró en un tiempo de retención de 6.2 min .....	32
<b>Figura 5</b>	Ejemplo de cromatograma obtenido de suero de las aves tratadas con quinfamida en los diferentes tiempos de muestreo. No se detectó el compuesto a los 7.5 min, por lo que se consideró que la quinfamida no estaba presente en el suero. Se utilizó diazepam como estándar interno y se encontró en un tiempo de retención de 6.2 min .....	33
<b>Figura 6</b>	Ejemplo de un cromatograma obtenido de una muestra de heces recolectada por 24 h de un ave tratada con quinfamida, esta se detectó en un tiempo de retención de 7.6 minutos y con una altura de 348459 mAU (Unidades de Absorbancia). La cuantificación se llevó a cabo al comparar las alturas de las detecciones con una curva de calibración. Se utilizó diazepam como estándar interno y se encontró en un tiempo de retención de 6.1 min .....	34

## *In vivo* anticoccidial activity of quinfamide in broilers: a preliminary report

Itzcoatl Aquino<sup>a</sup>, Yazmin Alcalá<sup>b</sup>, Lilia Gutiérrez<sup>a</sup>, Graciela Tapia<sup>c</sup>, Helgi Jung<sup>d</sup> and Héctor Sumano<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiología y Farmacología, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico; <sup>b</sup>Departamento de Parasitología, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico; <sup>c</sup>Departamento de Genética y Bioestadística, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico; <sup>d</sup>Departamento de Farmacia, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

### ABSTRACT

The aim of this trial was to evaluate the anticoccidial efficacy of quinfamide in broilers. Three different treatments were implemented over a 49-day period as follows: quinfamide; quinfamide plus carbopol and decoquinate, all prepared as small pellets and mixed with feed at a final dose of either active principle of 30 ppm. Parameters measured were: weight gain, number of oocysts shedding per gram of litter and degree of gross lesions caused by coccidia. Body weight gain was statistically greater for quinfamide and quinfamide-carbopol groups in comparison to other groups. However, only the quinfamide-carbopol group showed similar efficacy in the oocyst counts as compared to the decoquinate group. Statistically significant differences were observed when intestinal lesions score were compared and the less affected group was quinfamide-carbopol. Based on these results, it is concluded that quinfamide possesses a low anticoccidial efficacy. However, this is noticeably improved when it is prepared as pellets with carbopol. The adhesion of carbopol to intestinal mucosa may influence residence time of quinfamide in the gastrointestinal tract, thus enhancing efficacy.

### ARTICLE HISTORY

Received 11 March 2016  
Revised 16 August 2016  
Accepted 16 August 2016

### KEYWORDS

Anticoccidial; broilers;  
coccidiosis; pellets;  
quinfamide

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

La coccidiosis es una enfermedad de distribución mundial que afecta a una gran variedad de especies, entre ellas las aves (Chapman y col., 2013; Dauschies y col., 1998; Laczay y col., 1995; Long y Jeffers, 1986; Panter y col., 2012; Quiroz y Dantán, 2015; Tenter y col., 2002). En general, los animales jóvenes son más susceptibles a la infección, mientras que las aves adultas parecen relativamente más resistentes (Dorne y col., 2013; Yun, 2000; Yuño y Gogorza, 2008). Su presentación está ligada a las prácticas de manejo en la producción avícola moderna; esto es: alta densidad de aves, sumado a escaso material de cama o alternativamente un inadecuado manejo de la misma (Berezin y col., 2010; Chapman, 1993, 1984; Chapman y col., 2013; Clarke y col., 2014; Dahiya y col., 2006; Dauschies y col., 1998; Long y Jeffers, 1986; Quiroz y Dantán, 2015).

La coccidiosis es considerada como la enfermedad de mayor impacto económico en la producción avícola a nivel mundial (Hafez, 2008; Long y Jeffers, 1986; Quiroz y Dantán, 2015; Tovar, 2002; R.B. Williams, 1999). En las últimas décadas las pérdidas económicas a nivel mundial se calculan alrededor de 3 mil millones de dólares anuales; tan solo en los E.U. se estima una pérdida de 100 a 200 millones de dólares (Chapman y col., 2013; Quiroz y Dantán, 2015). Cerca del 70% de ellas se deben a la presentación subclínica, la cual se ve reflejada como disminución en la ganancia de peso y conversión alimenticia, el resto es por la presentación clínica que provoca la muerte del 6 al 10% de las aves a nivel mundial (Burt y col., 2013; Chapman y Jeffers, 2014; Gussem, 2006; Quiroz y Dantán, 2015; R. B. Williams, 1999). Para evitar estas pérdidas económicas a causa de la coccidiosis, la industria avícola a nivel mundial invierte más de 800 millones de dólares por año para su control y prevención. Por ejemplo: en China, se destina un aproximado de 86.7 millones de dólares y en E.U. cerca de 127 millones de dólares al año en fármacos anticoccidianos (Chapman y col., 2013; Kiani y col., 2007; R. B. Williams, 1999); por lo que, conocer las alternativas farmacológicas que existen en el mercado contra la coccidiosis resulta indispensable al momento de elegir el tratamiento adecuado para la parvada.

En los pollos la coccidiosis es causada por protozoarios del género *Eimeria* sp., las de mayor impacto económico son: *E. acervulina*, *E. máxima*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E.*

*mitis*, *E. mivati*, *E. hagani*, *E. necatrix* y *E. praecox*. Cada especie produce afecciones con localización particular en el tracto intestinal (Chapman y col., 2013; Coombs y col., 1997; Gussem, 2006; Hafez, 2008; Kiani y col., 2007; Long y Jeffers, 1986; Morris y Gasser, 2006; Quiroz y Dantán, 2015; Speer, 1999; Yun, 2000).

Además de su impacto *per se*, la coccidiosis es una enfermedad que predispone a patologías secundarias como enteritis necrótica, colangiohepatitis y dermatitis gangrenosa por *Clostridium* sp. o disbacteriosis, causando diarrea y consecuentemente una mala absorción a nivel intestinal (Dahiya et al., 2006).

## **1.2 Control**

En la actualidad para el control de la coccidiosis se cuenta con varias alternativas:

1. Productos anticoccidianos (químicos, ionóforos)
2. Combinaciones anticoccidiales (roxarsona-betaína, narasina-nicarbazina)
3. Vacunas comerciales
4. Selección genética de resistencia a la enfermedad
5. Manejo y nutrición

Es importante recordar que sin una buena bioseguridad es posible que estas alternativas no proporcionen los resultados deseados. La mayoría de los productos anticoccidianos han estado en uso por varios años, sin embargo, el manejo de la luz, ventilación, alimentación, tiempos de retiro e incremento de animales por metro cuadrado, son factores que han ido complicando el establecimiento de programas de control (Belli y col., 2006; Chapman y Jeffers, 2014; Kiani y col., 2007).

Una alternativa para el control de la coccidiosis que se ha proyectado como prometedora es la vacunación, y esto se refleja en un aumento de la investigación en este rubro los últimos años, aunque el uso de fármacos anticoccidianos todavía es la primer opción para el control de la coccidiosis, por lo que se debe de considerar que el uso de los mismos es una herramienta clave en el control y tratamiento de esta enfermedad (Chapman y Jeffers, 2014; Lee y col., 2013; Malo, 2013; Peek y Landman, 2011). En el pasado se llegó a postular, que se usara solo la medicación terapéutica cuando los signos de coccidiosis ya eran evidentes. Sin embargo, las pérdidas eran incompatibles con la

viabilidad comercial de las parvadas, por ello emergió el concepto de medicación metafiláctica administrando los tratamientos para evitar la aparición de coccidiosis (Clarke y col., 2014; Kiani y col., 2007).

### 1.3 Ciclo de coccidias

Las aves se infectan al ingerir ooquistes esporulados, que por acción de enzimas y secreciones gástricas asociadas a movimientos gástricos; liberan esporozoitos y estos invaden las células de la mucosa intestinal. En el interior de las células se transforman en trofozoitos, por reproducción asexual forman un esquizonte o meronte I, que al madurar libera cientos de merozoitos de primera generación, cada uno de ellos invade un nuevo enterocito y formarán trofozoito II, que produce esquizontes II o merozoitos de segunda generación. De acuerdo con la especie puede haber hasta 4 generaciones de merozoitos. Los de la última generación invaden nuevas células e inicia el ciclo sexual donde los microgametos fecundan a los macrogametos y dan lugar a los cigotos y estos a los ooquistes maduros no esporulados que posteriormente son excretados con las heces (Véase Figura 1). La esporulación se produce en la cama de la caseta (Chapman y Jeffers, 2014; Coombs y col., 1997; McDowgal y Reid, 2003; Sumano y Ocampo, 2004; Tovar, 2002; Yuño y Gogorza, 2008).

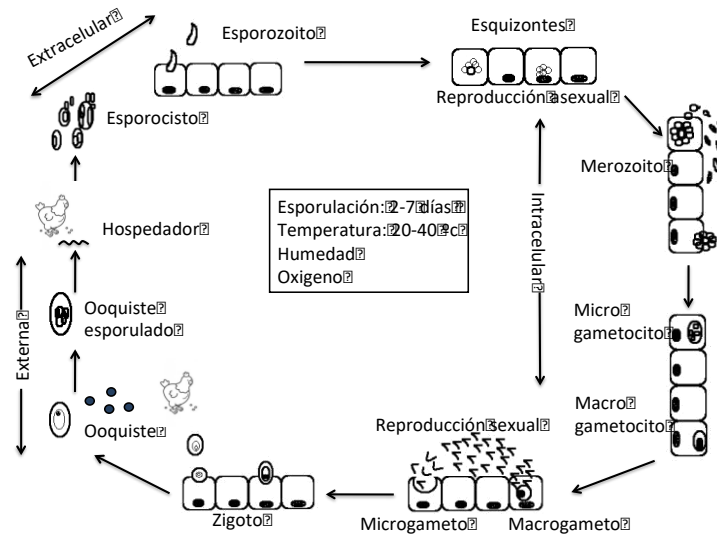


Figura 1. Ciclo de vida de *Eimeria* sp. (Basado en Yun y col. 2000).

## 1.4 Lesiones

En algunas especies (*E. acervulina*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. mivati*), los merozoítos invaden las células epiteliales del intestino y la continua proliferación de esquizontes y gametocitos causa un gran daño a estas células. Otras especies (*E. maxima*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. necatrix*) llevan a cabo parte de su ciclo de vida en capas más profundas provocando una mayor destrucción tisular (Burt y col., 2013; Yuño y Gogorza, 2008).

A la necropsia se pueden identificar nódulos grises o blancos o bien estrías en la luz del intestino. A nivel microscópico, alrededor de las criptas intestinales pueden observarse infiltrados de células mononucleares y granulocitos, edema y adelgazamiento de la mucosa. En pollos, un elevado porcentaje del infiltrado celular está compuesto por linfocitos, los cuales son visibles a menudo como largos agregados en criptas y lámina propia (Hafez, 2008; Tovar, 2002).

## 1.5 Fármacos anticoccidianos

La eficacia de los fármacos anticoccidianos se basa en suprimir o inhibir el ciclo de vida del parásito, al tiempo que permite a las aves el desarrollo de inmunidad (Lee y col., 2012; Morris y col., 2004). La principal vía de administración en aves consiste en añadir los fármacos en el alimento o en el agua de bebida. En la actualidad se estima que se fabrican a nivel mundial 18.3 millones de toneladas de alimento adicionado con anticoccidianos para la industria avícola (Dahiya y col., 2006). Todas las especies de *Eimeria* son capaces de desarrollar resistencia a los fármacos anticoccidianos; esto se facilita al utilizar dosis bajas durante largos periodos, o cuando se ha administrado por varios ciclos productivos un mismo fármaco. Por ello es recomendable rotar los principios activos (Chapman, 1984; Tovar, 2002). Cuando se producen brotes clínicos debido al desarrollo de resistencia es recomendable realizar una prueba de sensibilidad anticoccidiana para tener un historial que permita responder con más certeza en tratamientos empíricos posteriores. No obstante, la mayoría de las veces es suficiente con cambiar el principio activo. Para evitar la aparición de resistencias se han propuesto dos pautas de tratamiento preventivo (McDougald y Seibert, 1998; McDowgal y Reid, 2003; Peek y Landman, 2011):

1. Sistema “*shuttle*”, que propone utilizar un fármaco ionóforo o químico durante la



etapa de iniciación y un ionóforo diferente solo o potenciado en combinación con un químico como la nicarbazina y narasina durante la etapa de crecimiento.

## 2. Sistema rotacional que consiste en cambiar de fármaco en cada ciclo de cría.

Los compuestos anticoccidianos se han dividido en dos grupos de acuerdo con su naturaleza química y actividad biológica. El primer grupo corresponde al de los antibióticos ionóforos y el segundo a los denominados no ionóforos o fármacos químicos producidos por síntesis, con una amplia variedad estructural. Se han dividido de acuerdo con su naturaleza química en derivados de triazinas, piridonas, quinolonas, alcaloides, guanidinas, análogos de tiamina, análogos de purina, derivados de carbamida, arsenicales orgánicos, benzoatos, nitrobenzamidas, nitrofuranos y sulfonamidas (Chapman, 1993, 1984; Clarke y col., 2014; Holdsworth y col., 2004; Laczay y col., 1995; Žižek y Zidar, 2013). A pesar de la variedad de compuestos anticoccidianos, las diversas legislaciones internacionales han limitado el uso de los mismos, un ejemplo de esto es la Unión Europea bajo la regulación 1831/2003/EC por medio de la cual, solo se permite el uso de 12 fármacos como aditivos en el alimento, entre estos se encuentran los ionóforos monensina, lasalocida, salinomycin, narasina, maduramicina y semduramicina y los químicos robenidina, decoquinato, nicarbazina, diclazuril, halofuginona y amprolio (Anonymus, 2003; Clarke y col., 2014).

### **1.6 Tiempos de retiro**

Con respecto al periodo de retiro, es evidente que varía con cada uno de los fármacos, aunque la mayoría se establece de 3 a 5 días. En este punto es importante señalar que los alimentos comerciales destinados al pollo de engorda presentan fármacos anticoccidianos en su fórmula y por consiguiente, deben ser cambiados por otros que estén libres de fármacos para respetar el periodo de retiro. Los huevos producidos por gallinas que estén recibiendo el tratamiento están sujetos al periodo de retiro, por lo que no pueden ser comercializados (Clarke y col., 2014; McDougald y Seibert, 1998; Moloney y col., 2012; Mulder y col., 2005; Sumano y Ocampo, 2004). En el cuadro 1 se presentan los tiempos de retiro de los anticoccidianos más utilizados en pollos de engorda. La selección de los fármacos por cada país está sujeta a intervención regulatoria que a su vez depende de

estudios farmacocinéticos, toxicológicos, de residuos del fármaco y sus metabolitos, Ingesta Diaria Aceptable (IDA) y Límite Máximo de Residuos (LMR) (Dorne y col., 2013; EMEA, 1999, 1998; Hansen y col., 2009).

**Cuadro 1. Tiempos de retiro de los anticoccidianos más utilizados en pollo de engorda.**

<b>Fármaco</b>	<b>Días</b>
<b>Diclazuril</b>	5
<b>Toltrazuril</b>	14-21
<b>Diaveridina</b>	5-7
<b>Decoquinato</b>	5
<b>Halofuginona</b>	4
<b>Robenidina</b>	5
<b>Amprolio</b>	5
<b>Arprinocida</b>	5
<b>Nicarbazina</b>	5
<b>Roxarsona</b>	5
<b>Etopabato</b>	5-7
<b>Ionóforos<sup>1</sup></b>	3-5

<sup>1</sup> Monensina, lasalocida, salinomocina, narasina, maduramicina y semduramicina.

### **1.7 Desarrollo de nuevos fármacos anticoccidianos.**

Existe una creciente necesidad de principios activos novedosos para el control de la coccidiosis en aves comerciales (Peek y Landman, 2003). Por ello, resulta justificable la investigación sobre el desarrollo de nuevas opciones farmacológicas, preferentemente con baja tasa de resistencias e idealmente baja o nula toxicidad, tanto para la parvada como para el ser humano a través de residuos. El costo financiero del desarrollo de un anticoccidiano es muy elevado, porque el principio activo elegido debe someterse a una rigurosa serie de pruebas durante su desarrollo farmacéutico. El principio activo en desarrollo debe demostrar eficacia y seguridad, así como demostrar que una vez utilizado en el campo, la tasa de generación de resistencias sea compatible con su uso rutinario (Vanparijs y col.,

1989). Adicionalmente, el nuevo fármaco deberá pasar por las pruebas de no impacto medio ambiental. Una fuente relativamente económica para obtener nuevas alternativas con efecto anticoccidiano proviene del acervo farmoquímico ya existente, con la ventaja de ser económicamente más viable y uno de estos principios activos es la quinfamida.

### 1.8 Quinfamida

La quinfamida [1-(dicloroacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinil ester] (Véase figura 2) es un derivado dicloroacetilo del quinolinol. Tiene un PM de 354.18 daltones y es un polvo blanco inodoro insoluble en agua y soluble en cloroformo; se metaboliza a través de hidrólisis en su metabolito (1-(dicloroacetil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-quinolinol) (Morales y col., 2000; Romero y col., 2005); además es muy utilizada en el tratamiento de la amebiasis intestinal en humanos y su acción no es sistémica; por lo que se le ha ubicado solo a nivel del lumen intestinal (Morales y col., 2000). En humanos, se considera que posee una buena eficacia terapéutica contra amibas y es un tratamiento de dosis única (4.3 mg/kg), se han realizado estudios comparativos administrando dosis únicas y dosis divididas en un día, demostrado una eficacia similar de 77,8% a 100% contra los trofozoítos de *E. histolytica*., además no se han registrado efectos secundarios a la fecha; por estas características se diferencia del resto de medicamentos introducidos en la práctica médica (Morales y col., 2000; Romero y col., 2005). Su eficacia antiamebiana es de aproximadamente 90%, por otro lado su absorción es mínima, con valores de  $C_{max}$  (Concentración plasmática máxima) a las 7 h ( $T_{max}$  = Tiempo necesario para lograr  $C_{max}$ ) y se elimina por heces en un 98% a las 48 h y el resto por vía renal. Su mecanismo de acción no es del todo conocido pero se sabe que inmoviliza al trofozoíto de *Entamoeba histolytica* evitando así su propagación (Davila y col., 2002; Morales y col., 2000; Padilla y col., 2002, 1995).

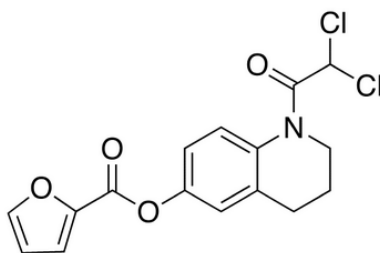


Figura 2. Fórmula estructural y desarrollada de la quinfamida (Baker y col., 1982)

En veterinaria su uso es casi nulo. Por ejemplo: se ha demostrado que la administración oral de 0.25 mg/Kg/día durante 3 días elimina *Entamoeba criceti* del intestino de hámsteres. No se han observado signos de toxicidad en ratones, ratas y hámsteres a dosis de 10 g/Kg de peso, no existen indicios relacionados con toxicidad u otros trastornos en estudios hematológicos, urinarios y post mortem en perros y monos tratados con quinfamida a dosis de 500 mg/kg durante 37 días. (Aquino y col., 2013; Davila y col., 2002; Romero y col., 2005).

#### 1.8.1 Antecedentes de quinfamida contra *Eimeria* sp.

Existe evidencia sobre el efecto anticoccidiano de la quinfamida administrada en borregos, este estudio se llevó a cabo en el departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ, UNAM (Aquino y col., 2013). En él, se administró quinfamida por vía oral sola y en combinación con un mucoadhesivo (qitosán), además, como estándar se utilizó toltrazuril. Como resultado, se obtuvo un 31.27% de eficacia al administrar la quinfamida sola y hasta 76.74% cuando esta se combinó con un mucoadhesivo, obteniéndose un valor superior al obtenido por el toltrazuril el cual fue de 61.66%. En aves, es evidente que pueda existir una ventaja notable si este resultado se reproduce; para esto se debe lograr una combinación exitosa de quinfamida con un vehículo que incremente su estancia en el tubo digestivo en una presentación comercial de fácil administración a las parvadas.

### 1.9 Vehículos mucoadhesivos

El concepto de polímeros mucoadhesivos se introdujo en la tecnología farmacéutica en la década de 1980 y recientemente se ha aceptado como una estrategia prometedora para prolongar el tiempo de residencia de fármacos en las membranas de la mucosa en el cuerpo, incluyendo el tracto gastrointestinal (Oh y col., 2015). Los vehículos mucoadhesivos son generalmente polímeros-macromoléculas capaces de adherirse a la superficie mucosa. La interacción del polímero mucoadhesivo con la membrana de absorción proporciona el potencial para prolongar el tiempo residual del fármaco en su forma administrada y mantiene una liberación sostenida del fármaco en el sitio diana. Se han propuesto numerosos tipos de polímeros como agentes mucoadhesivos (Surassmo y col., 2015).

Resulta factible pensar que la eficacia de la quinfamida podría mejorar al incrementar su estancia en el tubo digestivo de las aves, las cuales presentan un tránsito gastrointestinal rápido (2-8 h) según la edad (Angel y col., 2013; Sumano y Gutiérrez, 2010). Por lo anterior, se postula que la quinfamida y su combinación con un vehículo mucoadhesivo adecuado pueden dar paso al desarrollo de un nuevo producto farmacéutico con potencial para ser utilizado en la industria avícola como una alternativa terapéutica para el control y tratamiento de la coccidiosis. Un obstáculo a vencer es la determinación de la dosis efectiva y la cantidad de fármaco que puede combinarse con el vehículo de propiedades gastro-retentivas (Jana y col., 2014; Kelessidis y col., 2011; Paker y Neau, 2009; Qi y col., 2007; Singh y col., 2014; Surassmo y col., 2015; Tzankov y col., 2013; Wolf y col., 2014).

#### 1.9.1 Quitosán

El quitosán es un polisacárido natural policationico derivado de la quitina, se encuentra en las conchas de los crustáceos, la cutícula de los insectos y la pared celular de los hongos. Las películas de quitosán son biodegradables, biocompatibles, flexibles, resistentes, fuertes y difíciles de romper, tienen valores moderados de agua y permeabilidad al oxígeno, disminuyen la oxidación en los alimentos y también inhiben el crecimiento microbiano, además está clasificado como excipiente “Acreditado Generalmente Seguro” (Generally Recognized As Safe”) por la FDA debido a su nula toxicidad. (Martínez y col., 2010; Sosnik y col., 2015). Este compuesto ha sido ampliamente utilizado en los sistemas de administración de fármacos para modificar la superficie de los preparados y mejorar sus propiedades mucoadhesivas. Debido a que la estructura del quitosán tiene muchos grupos reactivos (NH<sub>2</sub>), la focalización del sitio funcional ha mejorado las propiedades biológicas de las partículas. Sin embargo, el inconveniente de la matriz del quitosán está en su escasa solubilidad en agua. Por lo tanto se requiere el uso de condiciones ácidas para disolver las partículas de quitosán. Esta condición incrementa la toxicidad de las partículas de quitosán al ser aplicado sobre un cultivo celular en función del tiempo de incubación (Surassmo y col., 2015).

### 1.9.2 Carbopol

El carbopol es el nombre comercial para una serie de polímeros cuyas cadenas están reticuladas con polialquenoil éteres o divinil glicol ácido poliacrílico biodegradable. La naturaleza del agente de reticulación puede variar, en longitud, peso molecular crítico, funcionalidad y rigidez dando lugar a diferentes grados que presentan una gama de propiedades distintas. Este polímero ha demostrado utilidad como agente mucoadhesivo exhibiendo perfiles de liberación controlada de fármacos y bioadhesión en mucosa oral, nasal e intestinal (Surassmo y col., 2015). Estas propiedades bioadhesivas del carbopol se atribuyen a su capacidad para formar enlaces de hidrógeno con el polisacárido (mucina) presente en el revestimiento de la mucosa (Qi y col., 2007). En un ambiente alcalino, los grupos carboxilo se ionizan, y se generan cargas negativas a lo largo de la cadena principal del polímero, la repulsión electrostática debido a las cargas negativas ocasiona el desenrollamiento y posterior expansión de las moléculas, lo que conlleva a la hinchazón del polímero y finalmente a la formación de un gel. El fármaco se libera de la matriz de carbopol por disolución y posterior difusión a través de la capa de gel formada en la superficie de la misma. El hinchamiento del polímero y la formación de gel son dependientes del pH (grado de ionización del polímero), la fuerza iónica, y la concentración de polímero en el microambiente (French y col., 1995). Se ha considerado combinar a la quinfolidato con el carbopol debido a su baja toxicidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad y su habilidad de adherirse a membranas mucosas.

### 1.10 Justificación

Se ha determinado previamente en ovinos, que la quinfolidato tiene una eficacia anticoccidiana baja y que ésta puede mejorar al combinarse con un vehículo de propiedades gastro-retentivas. Por otro lado, estudios en medicina humana mostraron, que su biodisponibilidad es muy baja. Por lo tanto, al combinar la quinfolidato con un vehículo gastro-retentivo y en una forma farmacéutica de liberación prolongada para la vía oral, se puede mejorar la eficacia anticoccidiana de la quinfolidato en pollo de engorda. Adicionalmente, se espera que este preparado farmacéutico tenga una mínima o nula residualidad en carne, en virtud de que la absorción de quinfolidato es muy limitada o nula.

### **1.11 Hipótesis**

La quinfamida presenta actividad anticoccidiana en pollos y esta puede incrementar al combinarse con un vehículo mucoadhesivo en un preparado farmacéutico diseñado para administrarse en combinación con el alimento.

### **1.12 Objetivo general**

Evaluar la eficacia anticoccidiana de la quinfamida en pollo de engorda sola o combinada con un vehículo mucoadhesivo en una forma farmacéutica de liberación prolongada para la vía oral y estimar si la quinfamida tiene absorción sistémica.

### **1.13 Objetivos específicos**

1. Evaluar la eficacia anticoccidiana y la dosis adecuada de quinfamida sola.
2. Evaluar la eficacia anticoccidiana de la combinación de quinfamida con quitosán o carbopol mediante ensayos de dosis-respuesta administrados en un preparado que mejore su eficacia.
3. Evaluar la combinación más adecuada de quinfamida con quitosán o carbopol mediante un preparado que mejore su eficacia durante un ciclo productivo.
4. Determinar las concentraciones de quinfamida en suero y heces al ser administrada mediante un preparado que mejore su eficacia.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Modelo experimental

#### 2.1.1 Obtención del material biológico

Los ooquistes sin esporular se obtuvieron de aves del estado de Veracruz infectadas con cepas de campo. Los ooquistes se esporularon al colocarlos en dicromato de potasio al 2.5% utilizando procedimientos estandarizados (Raether y col., 1995). Se homogenizó 1 L de la suspensión en un vaso de precipitados con un agitador magnético durante 15 min, lentamente se añadieron 350 g de NaCl manteniendo la agitación hasta disolver el NaCl, para eliminar las partículas más grandes se filtró la suspensión y el filtrado resultante se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos, con una pipeta se colectaron los ooquistes del sobrenadante y se identificaron utilizando claves taxonómicas, las especies aisladas fueron *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. maxima*. Para preparar el inóculo, se cuantificó el número de ooquistes de cada especie por mL, utilizando una cámara de Fuchs-Rosenthal y un microscopio invertido. Los ooquistes se mantuvieron en dicromato de potasio al 2.5% bajo condiciones constantes de agitación y oxigenación hasta su uso. Para determinar la eficacia anticoccidiana de quinfamida se administró una dosis de inóculo con *E. acervulina*  $5 \times 10^4$ , *E. maxima*  $2 \times 10^4$  y *E. tenella*  $5 \times 10^3$  por ave (Holdsworth y col., 2004).

#### 2.1.2 Eficacia anticoccidiana de quinfamida

El modelo experimental utilizado para determinar la eficacia anticoccidiana de quinfamida sola y en combinación con un vehículo que modifique su estancia en el tracto gastrointestinal (GI) se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos de la “Asociación mundial para el avance en parasitología veterinaria para la evaluación de la eficacia de fármacos anticoccidianos en pollos y pavos (WAAVP)” (Holdsworth y col., 2004). Para determinar la eficacia anticoccidiana de la quinfamida se requirieron cuatro diferentes fases. En cada fase se evaluó la eliminación de ooquistes, ganancia de peso corporal e integridad intestinal. Las fases fueron las siguientes:

Fase 1. Evaluación de dosis de quinfamida

Fase 2. Evaluación de dosis de quinfamida-quitosán



Fase 3. Evaluación de dosis de quinfamida-carbopol

Fase 4. Evaluación de la eficacia anticoccidiana de quinfamida sola y en combinación con carbopol durante un ciclo productivo

### 2.1.3 Cuantificación de quinfamida en suero y heces

En colaboración con el departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se estandarizó un método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de quinfamida en suero y heces, el cual fue previamente publicado en la tesis de licenciatura "Validación de método analítico por CLAR para cuantificación de quinfamida en matrices biológicas", para la obtención del título de Química Farmacéutica Bióloga, presentado por Diana Alejandra Flores González (2015).

## 2.2 Aves y tratamientos

El alojamiento de las aves en los diferentes estudios, se realizó en las unidades de aislamiento dentro del departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. Las aves utilizadas en los diferentes estudios fueron adquiridas desde el primer día de edad en una granja ubicada en el municipio de *Los Reyes la Paz Estado de México*. Las aves recibieron alimento libre de anticoccidianos y antibióticos antes y durante el estudio. El alimento se preparó con base en maíz y pasta de soya, en cada caso cumplió con los requerimientos nutricionales establecidos por el NRC de acuerdo con la edad y fin zootécnico (NRC, 1994).

En los estudios para determinar la eficacia anticoccidiana de quinfamida, se utilizaron dos grupos control, un grupo infectado-no tratado (INT) y un grupo no infectado-no tratado (NNT) (Holdsworth y col., 2004).

Durante la fase 1, 2, 3 y cuantificación de quinfamida en suero y heces las aves se alojaron en jaulas de postura de dos niveles (tres aves por jaula) con la finalidad de evitar reinfección. Cada nivel tenía un comedero de canal y cada jaula un bebedero de copa. En estas fases se utilizaron hembras de la línea *Isa Brown* debido a que estas aves pueden

permanecer por más tiempo en las jaulas sin sufrir de lesiones en patas a diferencia de las líneas pesadas. Para la fase 4 se utilizaron hembras de la línea *Cobb 500* y fueron alojadas en corrales recubiertos con viruta de madera, cada uno con un comedero de tolva y un bebedero de campana.

### 2.2.1 Preparación de los tratamientos

Suspensión de quinfamida: En el cuadro 2 se indican los ingredientes con los que se elaboró la suspensión de quinfamida administrada durante la fase 1.

**Cuadro 2. Componentes de la suspensión de quinfamida**

<b>Componente</b>	<b>g/100 mL</b>	<b>Función</b>
<b>Quinfamida</b>	15.00	Fármaco
<b>Propilenglicol</b>	10.00	Cosolvente
<b>Goma Xantana</b>	0.80	Viscosante
<b>Polivinilpirrolidona</b>	5.00	Viscosante
<b>Tween 80</b>	0.10	Humectante
<b>Citrato de sodio</b>	2.00	Amortiguador de pH (7.8-8.2)
<b>Benzoato de sodio</b>	0.25	Conservador

FOLA (F= biodisponibilidad; O = optima y LA = larga acción): Esta es una forma farmacéutica de liberación sostenida, diseñada con el objetivo de incrementar la biodisponibilidad de antibacterianos, anticoccidiales y otros fármacos en aves comerciales y cerdos. Las FOLAS fueron elaboradas como se describe en la patente MX/a/2012/013222 (Sumano y Gutiérrez, 2012). Esta forma farmacéutica se utilizó para las fases 2, 3, 4 y para la determinación de quinfamida en suero y heces, estas se prepararon a base de quinfamida o decoquinato de acuerdo con cada fase.

### 2.2.2 Fase 1. Evaluación de dosis de quinfamida

A los doce días de edad, con un peso promedio de  $154.5 \pm 3.8$  g, las aves se dividieron de manera aleatoria en cinco grupos de veinte aves cada uno. Tres de los grupos

infectados recibieron un tratamiento de quinfamida en suspensión por vía oral, al primer grupo se le administro una dosis de 15 mg/kg de peso vivo (**Q15**), al segundo una dosis de 30 mg/kg de peso vivo (**Q30**) y al tercero una dosis de 60 mg/kg de peso vivo (**Q60**). Durante los días 0 - 7 post- tratamiento, se pesaron a las aves individualmente para cuantificar la ganancia de peso corporal y se obtuvo una muestra individual de heces para realizar el conteo de ooquistes/g de heces. Al final del estudio en el día siete post- tratamiento se sacrificaron cuatro aves de cada grupo y se obtuvieron muestras de intestino delgado y ciego para realizar la inspección macroscópica y determinar el grado de lesión.

### 2.2.3 Fase 2. Evaluación de dosis de quinfamida-quitosán

A los doce días de edad, con un peso promedio de  $141.6 \pm 8.3$  g, las aves se dividieron de forma aleatoria en siete grupos de quince aves cada uno. Cinco de los grupos infectados recibieron un tratamiento por vía oral en FOLA de la siguiente manera: al primer grupo se le administro quinfamida a dosis de 30 mg/kg de peso vivo (**Q**), al segundo grupo, 0.15 mg de quitosán/ave (**CH**), al tercer grupo una mezcla de quinfamida 30 mg/kg de peso vivo + 1.5 mg de quitosán/ave (**CH1.5**), al cuarto grupo una mezcla de quinfamida a 30 mg/kg de peso vivo + 0.15 mg quitosán/ave (**CH0.15**) y al quinto grupo una mezcla de quinfamida a 30 mg/kg de peso vivo + 0.015 mg quitosán/ave (**CH0.015**) (Sumano y Gutiérrez, 2012). Se pesaron a las aves para cuantificar la ganancia de peso corporal y se colectaron muestras individuales de heces para realizar el conteo de ooquistes/g de heces, durante los días 0, 7, 14 y 21 post- tratamiento. Al final del estudio en el día 21 post- tratamiento se sacrificaron cuatro aves de cada grupo y se obtuvieron muestras de intestino delgado y ciego para realizar la inspección macroscópica.

### 2.2.4 Fase 3. Evaluación de dosis de quinfamida-carbopol

A los doce días de edad, con un peso promedio de  $141.19 \pm 10.3$  g, las aves se dividieron de forma aleatoria en siete grupos de quince aves cada uno. Cinco de los grupos infectados recibieron un tratamiento por vía oral en FOLA de la siguiente manera: al primer grupo se le administro quinfamida a dosis de 30 mg/kg de peso vivo (**Q**), al segundo grupo,

carbopol a dosis de 30 mg/kg de peso vivo (**C**), al tercer grupo una mezcla de quinfamida a dosis de 30 mg/kg de peso vivo + carbopol a dosis de 60 mg/kg de peso vivo (**QC60**), al cuarto grupo una mezcla de quinfamida a 30 mg/kg de peso vivo + carbopol a dosis de 30 mg/kg de peso vivo (**QC30**) y al quinto grupo una mezcla de quinfamida a 30 mg/kg de peso vivo + 15 mg/kg de peso vivo (**QC15**) (Sumano y Gutiérrez, 2012). Se pesaron a las aves para cuantificar la ganancia de peso corporal y se obtuvo una muestra de heces individualmente para realizar el conteo de ooquistes/g de heces durante los días 0, 7, 14 y 21 post- tratamiento. Al final del estudio en el día 21 post- tratamiento se sacrificaron cuatro aves por cada grupo y se obtuvieron muestras de intestino delgado y ciego para determinar el grado de lesión intestinal.

#### 2.2.5 Fase 4. Evaluación de la eficacia anticoccidiana de quinfamida sola y en combinación con carbopol durante un ciclo productivo

Para esta fase, fue necesario simular una infección natural para cuatro grupos. De acuerdo con la metodología propuesta por Mathis y colaboradores (2004), antes del estudio se introdujeron en cada corral diez aves de catorce días de edad inoculadas con 50,000 ooquistes esporulados de *E. acervulina*, 10 aves infectadas con 20,000 ooquistes esporulados de *E. maxima* y 10 aves a las que se les administraron 5,000 ooquistes esporulados de *E. tenella*. Catorce días después, los pollos fueron removidos de los corrales y las aves del experimento fueron colocadas en los mismos y expuestas a la cama infectada.

Las aves se dividieron de manera aleatoria formando cinco grupos con veinte aves cada uno y tres repeticiones por grupo. A tres de los grupos infectados se les administraron los tratamientos en FOLA mezclados con el alimento desde el día 1 hasta el día 49 (Mathis y col., 2004; Sumano y Gutiérrez, 2012). Los tratamientos administrados fueron los siguientes: 30 ppm de quinfamida (**Q**); 30 ppm de quinfamida en combinación con 30 ppm de carbopol (**QC**) y 30 ppm de decoquinato (**D**) el cual se consideró como estándar. Los días 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49, se pesaron a las aves individualmente para cuantificar la ganancia de peso corporal. Se obtuvieron muestras de cama en la parte delantera, media y trasera de cada corral, estas fueron mezcladas hasta obtener una sola muestra compuesta

por corral, con la cual se determinó la cantidad de ooquistes por gramo de cama (Long y Rowell, 1975; Mathis y col., 2004; Morgan y col., 2005). Los días 21, 35 y 49 se sacrificaron 4 aves de cada grupo y se obtuvieron muestras de intestino delgado y ciego para realizar la inspección macroscópica y determinar el grado de lesión.

#### 2.2.6 Cuantificación de quinfamida en suero y heces

Se utilizaron 10 aves de 49 días de edad con un peso promedio de  $2.49 \pm 0.3$  kg. Cada ave recibió una dosis única de 30 mg/kg de peso vivo de quinfamida por vía oral en FOLA. A las 0, 4, 12 y 24 h. se colectaron muestras de sangre a través de la vena radial en tubos sin anticoagulante, una vez formado el coagulo se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 3000 rpm para obtener el suero, una vez separado este se congeló a  $-20$  °C hasta su cuantificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Las muestras de heces se colectaron individualmente en su totalidad durante 24 h, se congelaron a  $-20$ °C y posteriormente se liofilizaron.

### 2.3 Procesamiento de las muestras

#### 2.3.1 Conteo de ooquistes

Para determinar la cantidad de ooquistes/g de heces y ooquistes/g de cama, se realizó la técnica de McMaster utilizando cámaras de 6 campos independientes. Esta técnica de conteo permite disminuir la variación de tal manera que la varianza total en el conteo de ooquistes se acerque a un mínimo irreducible para un tamaño de muestra particular y grado de agregación.

Para relacionar la reducción de ooquistes excretados con la actividad anticoccidiana de los tratamientos utilizados en la diferentes fases, se calculó el porcentaje de eficacia de acuerdo con la siguiente formula (Abakar y col., 2005):

$$\frac{\text{Promedio de ooquistes pre tratamiento} - \text{Promedio de ooquistes post tratamiento}}{\text{Promedio de ooquistes pre tratamiento}} \times 100$$

### 2.3.2 Grado de lesión

El grado de lesión intestinal fue evaluado en duodeno, yeyuno y ciegos, debido a que estas regiones corresponden al sitio donde se multiplica *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* respectivamente y mediante un examen visual directo se asignó una puntuación numérica de acuerdo con las características descritas en el cuadro 3 (Conway y McKenzie, 2008; Johnson y Reid, 1970).

**Cuadro 3. Características macroscópicas para determinar el grado de lesión.**

<b>Grado</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Características</b>
<b>1</b>	Lesión leve	- Estrías blancas orientadas transversalmente a través del intestino - Estas lesiones dispersas no son más de cinco por centímetro cuadrado
<b>2</b>	Lesión moderada	- Incremento en el número de estrías blancas en serosas y superficie de mucosa - Lesiones menos dispersas - No hay engrosamiento de la pared
<b>3</b>	Lesión severa	- Lesiones más numerosas y fusionadas - Engrosamiento de la pared intestinal - Secreciones excesivas de moco
<b>4</b>	Lesión extremadamente severa	- Fusión completa de las lesiones - Engrosamiento considerable de la pared intestinal

### 2.3.3 Cuantificación de quinfamida en suero y heces

Las condiciones cromatográficas y la técnica de extracción utilizada para las muestras biológicas fue desarrollada considerando la estructura química de quinfamida.

El rango de la curva de calibración fue de 0.1 - 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La metodología a seguir fue la siguiente:

Método de extracción para muestras de suero.

Se activaron los cartuchos C18 con 2 mL de metanol, 1 mL de estándar metanólico (diazepam, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y 2 mL de agua deionizada. Se añadió 1 mL de muestra y se lavó con 12 mL de agua. Se eluyó la quinfamida con 1 mL de acetonitrilo empleando un flujo de 1 mL/min. Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  al cromatógrafo. En la figura 3 se resume el proceso utilizado.

Método de extracción para heces

Para el caso de heces, se empleó un método de extracción sólido-líquido, el cual consistió en lo siguiente: A las muestras de heces liofilizadas, se les adicionó una mezcla de 3 mL de acetonitrilo y 2 mL de metanol, se sonicaron y se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min. La fase orgánica se transfirió a un tubo eppendorf y se evaporó en un concentrador a 60 °C. Las muestras se reconstituyeron en 1 mL de estándar metanólico (diazepam, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  al cromatógrafo.

En ambos casos se empleó como fase móvil una mezcla de metanol, agua y acetonitrilo (40-50-10 v/v) y una columna cromatográfica Zorbax SB-CN de 25 mm. Las muestras se detectaron al UV a 269 nm, la sensibilidad del detector fue de 0,01 AUFS. El análisis cromatográfico se realizó a temperatura ambiente.

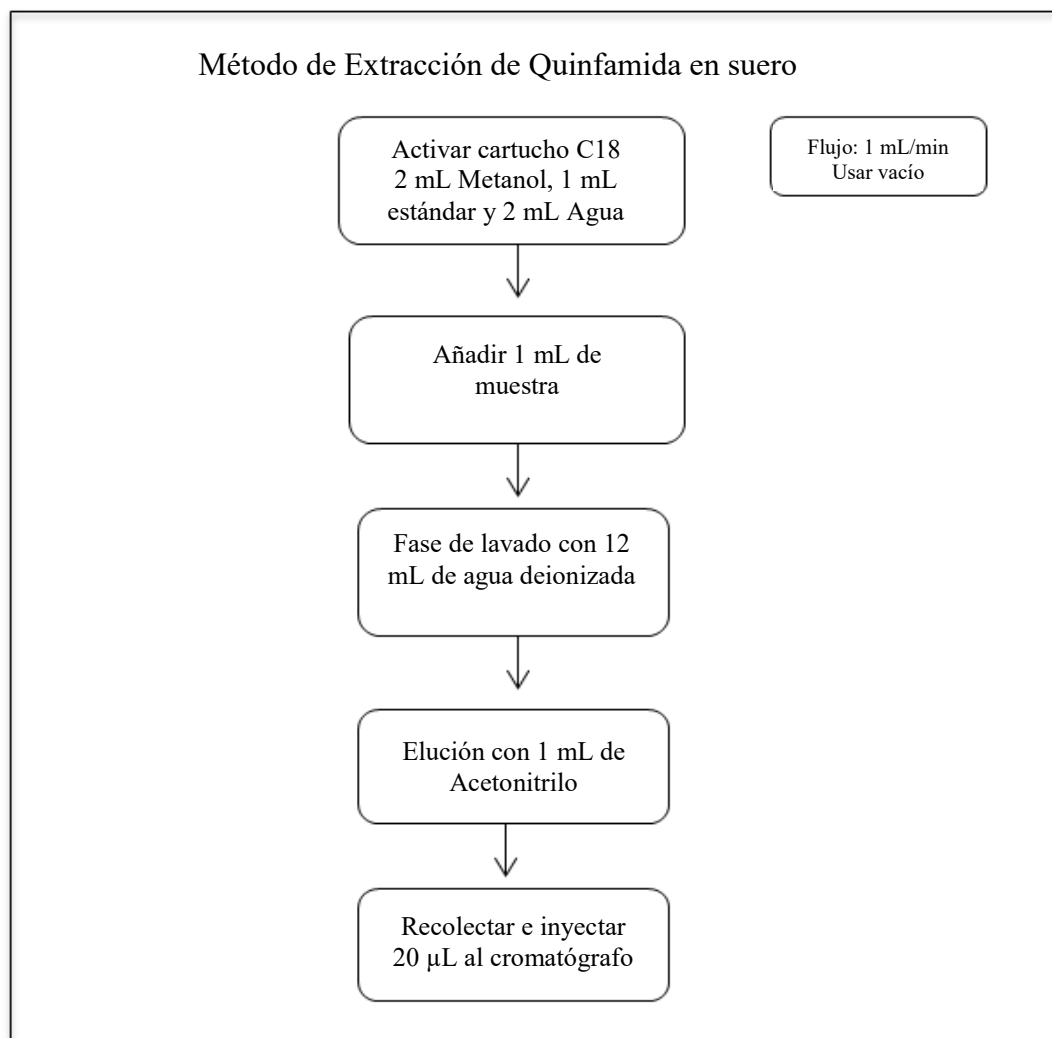


Figura 3. Método de extracción de quinfamida para muestras de suero.

## 2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un Modelo Lineal Generalizado (GLMz). La ganancia de peso corporal se vinculó con una distribución de Gauss, el conteo de ooquistes por gramo de heces o cama se vinculó con una distribución Poisson para normalizar los datos y el grado de lesión fue vinculado a la distribución logit por ser una variable cualitativa. Todos los modelos se analizaron con máxima verosimilitud (Liang y Zeger, 1986). La ganancia de peso corporal y el conteo de ooquistes por gramo de heces o cama se compararon por el método de Bonferroni. Todas las diferencias significativas se basaron en  $P < 0.05$ . Los análisis se realizaron con el software de IBM SPSS® Statistics 20.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Eficacia anticoccidiana de quinfamida

##### 3.1.1 Fase 1. Evaluación de dosis de quinfamida

El peso obtenido en los grupos tratados con quinfamida 30 mg/kg (**Q30**) y quinfamida 60 mg/kg (**Q60**) al final del estudio fueron superiores al resto de los grupos y no presentaron diferencia significativa entre sí ( $P > 0.05$ ), superaron por 18 y 23 g respectivamente al grupo tratado con quinfamida 15 mg/kg (**Q15**), por otra parte el grupo control no infectado-no tratado (**NNT**) no presentó diferencia significativa con el grupo anterior y el grupo control infectado-no tratado (**INT**) obtuvo la menor ganancia de peso al termino del estudio (Véase cuadro 4).

**Cuadro 4. Promedio de peso corporal (g)  $\pm$  EE<sup>4</sup> de las aves tratadas con diferentes dosis de quinfamida.**

Días <sup>2</sup>	Tratamientos <sup>1</sup>				
	NNT	INT	Q15	Q30	Q60
<b>0</b>	153 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup>	153 $\pm$ 8.5 <sup>a</sup>	147 $\pm$ 7.1 <sup>a</sup>	158 $\pm$ 7.9 <sup>a</sup>	158 $\pm$ 7.4 <sup>a</sup>
<b>1</b>	156 $\pm$ 8.2 <sup>a</sup>	156 $\pm$ 13.2 <sup>a</sup>	156 $\pm$ 14.5 <sup>a</sup>	172 $\pm$ 12.7 <sup>b</sup>	169 $\pm$ 9.6 <sup>b</sup>
<b>2</b>	169 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>	157 $\pm$ 16.8 <sup>b</sup>	166 $\pm$ 11.5 <sup>ab</sup>	179 $\pm$ 15.3 <sup>c</sup>	179 $\pm$ 10.3 <sup>c</sup>
<b>3</b>	187 $\pm$ 10.1 <sup>a</sup>	178 $\pm$ 21.3 <sup>b</sup>	182 $\pm$ 17.2 <sup>ab</sup>	203 $\pm$ 17.8 <sup>c</sup>	199 $\pm$ 14.2 <sup>c</sup>
<b>4</b>	202 $\pm$ 11.3 <sup>a</sup>	190 $\pm$ 18.4 <sup>b</sup>	194 $\pm$ 23.9 <sup>b</sup>	218 $\pm$ 19.2 <sup>c</sup>	217 $\pm$ 16.9 <sup>c</sup>
<b>5</b>	220 $\pm$ 8.9 <sup>a</sup>	206 $\pm$ 25.3 <sup>b</sup>	212 $\pm$ 27.3 <sup>ab</sup>	234 $\pm$ 21.6 <sup>c</sup>	233 $\pm$ 18.8 <sup>c</sup>
<b>6</b>	240 $\pm$ 13.1 <sup>a</sup>	221 $\pm$ 21.4 <sup>b</sup>	227 $\pm$ 25.6 <sup>b</sup>	254 $\pm$ 20.4 <sup>c</sup>	257 $\pm$ 19.5 <sup>c</sup>
<b>7</b>	259 $\pm$ 12.5 <sup>a</sup>	237 $\pm$ 23.7 <sup>b</sup>	245 $\pm$ 26.8 <sup>b</sup>	274 $\pm$ 22.6 <sup>c</sup>	279 $\pm$ 21.4 <sup>c</sup>
<b>GTP<sup>3</sup></b>	<b>106 <math>\pm</math> 10.4</b>	<b>84 <math>\pm</math> 17.8</b>	<b>98 <math>\pm</math> 29.1</b>	<b>116 <math>\pm</math> 19</b>	<b>121 <math>\pm</math> 17.9</b>

<sup>a-c</sup> Diferentes literales en cada línea indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>NNT = grupo control no infectado-no tratado; INT = grupo control infectado-no tratado; Q15 = quinfamida 15 mg/kg; Q30 = quinfamida 30 mg/kg; Q60 = Quinfamida 60 mg/kg.

<sup>2</sup>Días post- tratamiento: 12 – 19 días de edad.

<sup>3</sup>GTP = Ganancia total de peso al final del estudio.

<sup>4</sup>EE= Error Estándar.

La eliminación de ooquistes inició a partir del sexto día post- tratamiento en todos los grupos infectados sin presentar diferencia significativa (Véase cuadro 5), al séptimo día el conteo de ooquistes fue inferior en los grupos Q30 y Q60 y no mostraron diferencia significativa entre ambos ( $P > 0.05$ ). En el cuadro 6 se observa el porcentaje de eficacia de las diferentes dosis de quinfamida, el grupo Q15 no mostro eficacia, en cambio los grupos Q30 y Q60 obtuvieron un porcentaje de eficacia de 29.47 y 36.13 respectivamente. En el cuadro 7 se muestra el grado máximo de lesión al séptimo día post- tratamiento, el grupo INT presentó el mayor grado de lesión en comparación al resto de los grupos, seguido por el grupo Q15 y por último los grupos Q30 y Q60 con el menor grado de lesión.

**Cuadro 5. Eficacia anticoccidiana de quinfamida basada en el promedio de ooquistes por gramo de heces  $\pm$  EE<sup>4</sup>.**

Días <sup>2</sup>	Tratamientos <sup>1</sup>				
	NNT	INT	Q15	Q30	Q60
0 - 5	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
6	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	61500 $\pm$ 2300 <sup>a</sup>	65000 $\pm$ 4200 <sup>a</sup>	67000 $\pm$ 8000 <sup>a</sup>	59500 $\pm$ 15000 <sup>a</sup>
7	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	109000 $\pm$ 13000 <sup>b</sup>	67500 $\pm$ 14000 <sup>b</sup>	47250 $\pm$ 6800 <sup>c</sup>	38000 $\pm$ 6900 <sup>c</sup>

<sup>a-b</sup> Diferentes literales en cada línea indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>NNT = grupo control no infectado-no tratado; INT = grupo control infectado-no tratado; Q15 = quinfamida 15 mg/kg; Q30 = quinfamida 30 mg/kg; Q60 = Quinfamida 60 mg/kg.

<sup>2</sup> Días post- tratamiento: 12 – 19 días de edad.

<sup>4</sup>EE= Error Estándar.

**Cuadro 6. Porcentaje de eficacia de quinfamida basado en la cuantificación de ooquistes por gramo de heces de los diferentes tratamientos al día 7 post- tratamiento.**

Eficacia (%)	Tratamientos <sup>1</sup>		
	Q15	Q30	Q60
	0	29.47	36.13

<sup>1</sup>Q15 = quinfamida 15 mg/kg; Q30 = quinfamida 30 mg/kg; Q60 = Quinfamida 60 mg/kg.

**Cuadro 7. Eficacia anticoccidiana de quinfamida basada en el máximo grado de lesión intestinal al final del estudio.**

	Tratamientos <sup>1</sup>				
	NNT	INT	Q15	Q30	Q60
<b>Grado de lesión<sup>2</sup></b>	0	4	3	2	2

<sup>1</sup>NNT = grupo control no infectado-no tratado; INT = grupo control infectado-no tratado; Q15 = quinfamida 15 mg/kg; Q30 = quinfamida 30 mg/kg; Q60 = Quinfamida 60 mg/kg.

<sup>2</sup>Basado en una escala de 0-4.

### 3.1.2 Fase 2. Evaluación de dosis de quinfamida-quitosán

El peso obtenido en todos los grupos no presentó diferencia significativa en el día siete post- tratamiento ( $P > 0.05$ ) (Véase cuadro 8), al final del estudio en el día veintiuno, el grupo con mayor ganancia de peso fue el grupo CH0.15 con un peso de  $565.5 \pm 25.9$ , aunque este grupo no mostró diferencia significativa con los grupos NNT, Q, CH1.5 y CH0.015; el grupo con menor ganancia de peso fue el INT con 489.8 g y no mostró diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) con el grupo CH.

**Cuadro 8. Promedio de peso corporal (g)  $\pm$  EE<sup>4</sup> de las aves tratadas con quinfamida sola y en combinación con quitosán.**

Días <sup>2</sup>	Tratamientos <sup>1</sup>						
	NNT	INT	Q	CH	CH1.5	CH0.15	CH0.015
<b>0</b>	141.6 $\pm$ 13.4 <sup>a</sup>	141.6 $\pm$ 12.3 <sup>a</sup>	140.4 $\pm$ 11.6 <sup>a</sup>	141.6 $\pm$ 10.9 <sup>a</sup>	142.0 $\pm$ 13.7 <sup>a</sup>	143.0 $\pm$ 12.2 <sup>a</sup>	141.6 $\pm$ 10.4 <sup>a</sup>
<b>7</b>	271.3 $\pm$ 21.6 <sup>a</sup>	233.4 $\pm$ 25.7 <sup>a</sup>	268.4 $\pm$ 15.3 <sup>a</sup>	264.2 $\pm$ 17.4 <sup>a</sup>	270.3 $\pm$ 20.6 <sup>a</sup>	259.9 $\pm$ 14.8 <sup>a</sup>	253.1 $\pm$ 15.9 <sup>a</sup>
<b>14</b>	357.9 $\pm$ 28.9 <sup>ab</sup>	327.0 $\pm$ 29.4 <sup>b</sup>	375.0 $\pm$ 19.1 <sup>ab</sup>	368.4 $\pm$ 19.3 <sup>ab</sup>	368.7 $\pm$ 23.9 <sup>ab</sup>	376.3 $\pm$ 21.1 <sup>ab</sup>	387.8 $\pm$ 20.8 <sup>a</sup>
<b>21</b>	545.5 $\pm$ 26.6 <sup>abc</sup>	489.8 $\pm$ 31.0 <sup>c</sup>	555.1 $\pm$ 22.5 <sup>ab</sup>	506.6 $\pm$ 24.2 <sup>bc</sup>	542.5 $\pm$ 26.4 <sup>abc</sup>	565.5 $\pm$ 25.9 <sup>a</sup>	508.5 $\pm$ 29.2 <sup>abc</sup>
<b>GTP<sup>3</sup></b>	<b>403.9</b>	<b>348.2</b>	<b>414.7</b>	<b>365</b>	<b>400.5</b>	<b>422.5</b>	<b>366.9</b>

<sup>a-c</sup> Diferentes literales en cada línea indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>NNT = grupo control no infectado-no tratado; INT = grupo control infectado-no tratado; Q = quinfamida 30 mg/kg; CH = quitosán 0.15 mg; CH1.5 = quinfamida 30 mg/kg + 1.5 mg de quitosán; CH0.15 = quinfamida 30 mg/kg + 0.15 mg de quitosán; CH0.015 = quinfamida 30 mg/kg + 0.015 mg de quitosán.

<sup>2</sup>Días post- tratamiento: 12, 19, 26 y 33 días de edad.

<sup>3</sup>GTP = Ganancia total de peso al final del estudio.

<sup>4</sup>EE= Error Estándar.

Al día siete post- tratamiento el grupo CH eliminó  $7250 \pm 1265$  ooquistes por gramo de heces, con lo que obtuvo el mayor conteo de ooquistes en comparación con el resto de los grupos (Véase cuadro 9), los grupos con el menor conteo de ooquistes fueron los grupos Q y CH0.015 con  $1300 \pm 73$  y  $1100 \pm 187$  ooquistes por gramo de heces, respectivamente sin presentar diferencia significativa entre ambos ( $P > 0.05$ ). Al final del estudio en el día 21 post- tratamiento el grupo con mayor número de ooquistes por gramo de heces fue el grupo INT con  $18400 \pm 1200$ , seguido por el grupo CH con  $14450 \pm 3176$  ooquistes por gramo de heces, este último presentó diferencia significativa con el resto de los grupos, los grupos con el menor conteo de ooquistes fueron CH0.015 y Q, el primero eliminó  $2250 \pm 539$  ooquistes por gramo de heces, mientras que el segundo eliminó  $1850 \pm 235$  ooquistes por gramo de heces mostrando diferencia significativa entre ambos.

**Cuadro 9. Eficacia anticoccidiana de quinfamida sola y en combinación con quitosán basada en el promedio de ooquistes por gramo de heces  $\pm$  EE<sup>4</sup>.**

Días <sup>2</sup>	Tratamientos <sup>1</sup>						
	NNT	INT	Q	CH	CH1.5	CH0.15	CH0.015
<b>0</b>	$0 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$
<b>7</b>	$0 \pm 0^e$	$2000 \pm 569^c$	$1300 \pm 73^d$	$7250 \pm 1265^a$	$5400 \pm 981^b$	$1800 \pm 238^c$	$1100 \pm 187^d$
<b>14</b>	$0 \pm 0^f$	$22000 \pm 3700^e$	$1300 \pm 115^d$	$15050 \pm 2482^a$	$1750 \pm 471^c$	$1400 \pm 163^d$	$2250 \pm 341^b$
<b>21</b>	$0 \pm 0^f$	$18400 \pm 1200^e$	$1850 \pm 235^d$	$14450 \pm 3176^a$	$5400 \pm 1098^b$	$5800 \pm 962^b$	$2250 \pm 539^c$

<sup>a-f</sup>Diferentes literales en cada línea indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>NNT = grupo control no infectado-no tratado; INT = grupo control infectado-no tratado; Q = quinfamida 30 mg/kg; CH = quitosán 0.15 mg; CH1.5 = quinfamida 30 mg/kg + 1.5 mg de quitosán; CH0.15 = quinfamida 30 mg/kg + 0.15 mg de quitosán; CH0.015 = quinfamida 30 mg/kg + 0.015 mg de quitosán.

<sup>2</sup>Días post- tratamiento: 12, 19, 26 y 33 días de edad.

<sup>4</sup>EE= Error Estándar.

Al día 7 el grupo Q obtuvo el mayor porcentaje de eficacia con 35% y posteriormente se redujo a 5% en el día 14 y finalmente 0% de eficacia para el día 21, el grupo CH0.015 obtuvo valores similares 30% el día 7 y 4.5% para el día 14 y 0% para el día 21, el grupo CH tuvo un porcentaje de 0% desde el día 7 hasta el 21 (Véase cuadro 10). El máximo grado de lesión intestinal fue alcanzado por los grupos INT y CH, los grupos Q, CH1.5, CH0.15, CH0.015 obtuvieron un grado máximo de lesión de 2, el único grupo con un grado de lesión cero fue el NNT (Véase cuadro 11).

**Cuadro 10. Porcentaje de eficacia de quinfamida sola y en combinación con quitosán a partir de la cuantificación de ooquistes por gramo de heces.**

Días <sup>2</sup>	Tratamientos <sup>1</sup>				
	Eficacia (%)				
	Q	CH	CH1.5	CH0.15	CH0.015
7	35	0	5	2	30
14	5	0	0	10	4.5
21	0	0	0	0	0

<sup>1</sup>Q = quinfamida 30 mg/kg; CH = quitosán 0.15 mg; CH1.5 = quinfamida 30 mg/kg + 1.5 mg de quitosán; CH0.15 = quinfamida 30 mg/kg + 0.15 mg de quitosán; CH0.015 = quinfamida 30 mg/kg + 0.015 mg de quitosán.

<sup>2</sup>Días post- tratamiento: 19, 26 y 33 días de edad.

**Cuadro 11. Eficacia anticoccidiana de quinfamida basada en el máximo grado de lesión intestinal al final del estudio.**

Grado de lesión <sup>2</sup>	Tratamientos <sup>1</sup>						
	NNT	INT	Q	CH	CH1.5	CH0.15	CH0.015
	0	4	2	4	2	2	2

<sup>1</sup>Q = quinfamida 30 mg/kg; CH = quitosán 0.15 mg; CH1.5 = quinfamida 30 mg/kg + 1.5 mg de quitosán; CH0.15 = quinfamida 30 mg/kg + 0.15 mg de quitosán; CH0.015 = quinfamida 30 mg/kg + 0.015 mg de quitosán.

<sup>2</sup>Basado en una escala de 0-4.

### 3.1.3 Fase 3. Evaluación de dosis de quinfamida-carbopol

Al día 7 el grupo QC30 obtuvo la mayor ganancia de peso mostrando diferencia significativa con el resto de los grupos, no se presentó diferencia significativa entre los grupos NNT, Q, QC60 y QC15, los grupos INT y C obtuvieron la menor ganancia de peso sin presentar diferencia significativa entre ambos. Para los días 14 y 21 el grupo con mayor ganancia de peso fue el QC30 mostrando diferencia significativa con el resto de los grupos (Véase cuadro 12).

**Cuadro 12. Promedio de peso corporal (g)  $\pm$  EE<sup>4</sup> de las aves tratadas con quinfamida sola y en combinación con carbopol.**

Días <sup>2</sup>	Tratamientos <sup>1</sup>						
	NNT	INT	Q	C	QC60	QC30	QC15
<b>0</b>	141.3 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	124.10 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	141.9 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	140.4 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	140.9 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	140.6 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	141.1 $\pm$ 4 <sup>a</sup>
<b>7</b>	253.5 $\pm$ 18 <sup>bc</sup>	238.5 $\pm$ 11 <sup>cd</sup>	253.5 $\pm$ 18 <sup>b</sup>	235.7 $\pm$ 26 <sup>d</sup>	259.5 $\pm$ 16 <sup>b</sup>	271.3 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	251.5 $\pm$ 21 <sup>b</sup>
<b>14</b>	357.5 $\pm$ 20 <sup>b</sup>	326.9 $\pm$ 16 <sup>b</sup>	361.9 $\pm$ 25 <sup>b</sup>	329.4 $\pm$ 25 <sup>b</sup>	364.4 $\pm$ 22 <sup>b</sup>	381.3 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	358.8 $\pm$ 24 <sup>b</sup>
<b>21</b>	538.89 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	486.7 $\pm$ 29 <sup>b</sup>	541.1 $\pm$ 39 <sup>b</sup>	493.3 $\pm$ 34 <sup>b</sup>	502.8 $\pm$ 24 <sup>b</sup>	571.1 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	500.6 $\pm$ 38 <sup>b</sup>
<b>GTP<sup>3</sup></b>	<b>397.59</b>	<b>344.57</b>	<b>399.21</b>	<b>352.93</b>	<b>361.88</b>	<b>430.51</b>	<b>359.46</b>

<sup>a-c</sup> Diferentes literales en cada línea indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>NNT = grupo control no infectado-no tratado; INT = grupo control infectado-no tratado; Q = quinfamida 30 mg/kg; C = carbopol 30 mg/kg; QC60 = quinfamida 30 mg/kg + carbopol 60 mg/kg; QC30 = quinfamida 30 mg/kg + carbopol 30 mg/kg; QC15 = quinfamida 30 mg/kg + carbopol 15 mg/kg.

<sup>2</sup>Días post- tratamiento: 12, 19, 26 y 33 días de edad.

<sup>3</sup>GTP = Ganancia total de peso al final del estudio.

<sup>4</sup>EE= Error Estándar.

Al séptimo día, el grupo con el menor conteo de ooquistes por gramo de heces fue el QC30, el cual no presentó diferencia significativa con el NNT, los grupos Q, QC60 y QC15 no presentaron diferencia significativa entre ellos, los grupos con el mayor conteo de ooquistes fueron el INT y C sin mostrar diferencia significativa entre ambos. Estos resultados fueron similares para el día 14, para el día 21 se incrementó la cantidad de

ooquistes eliminados para la mayoría los grupos y no se presentó diferencia significativa entre ellos, excepto por el NNT el cual se mantuvo en cero desde el inicio del estudio (Véase cuadro 13). En el cuadro 14 se muestra el porcentaje de eficacia correspondiente al conteo de ooquistes, al día 7 el mayor porcentaje de eficacia (65%) fue obtenido por el grupo QC30, seguido por QC60 con 45%, el menor porcentaje de eficacia fue para los grupos Q y QC15 con 30%. Al día 14 los porcentajes de eficacia disminuyeron drásticamente, a pesar de esto el grupo QC30 mantuvo el mayor porcentaje de eficacia (15%) y para el día 21 todos llegaron a cero.

**Cuadro 13. Eficacia anticoccidiana de quinfamida sola y en combinación con carbopol basada el promedio de ooquistes por gramo de heces  $\pm$  EE<sup>4</sup>.**

Días <sup>2</sup>	Tratamientos <sup>1</sup>						
	NNT	INT	Q	C	QC60	QC30	QC15
<b>0</b>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
<b>7</b>	0 $\pm$ 0 <sup>d</sup>	2645 $\pm$ 567 <sup>a</sup>	1165 $\pm$ 313 <sup>b</sup>	2489 $\pm$ 618 <sup>a</sup>	1089 $\pm$ 329 <sup>b</sup>	330 $\pm$ 257 <sup>c</sup>	1455 $\pm$ 535 <sup>b</sup>
<b>14</b>	0 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	6678 $\pm$ 2776 <sup>a</sup>	2217 $\pm$ 1149 <sup>b</sup>	6883 $\pm$ 2764 <sup>a</sup>	2178 $\pm$ 1952 <sup>b</sup>	1067 $\pm$ 339 <sup>b</sup>	2494 $\pm$ 1092 <sup>b</sup>
<b>21</b>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	10550 $\pm$ 3017 <sup>a</sup>	8689 $\pm$ 2425 <sup>a</sup>	11289 $\pm$ 2846 <sup>a</sup>	8711 $\pm$ 2714 <sup>a</sup>	7722 $\pm$ 3821 <sup>a</sup>	9078 $\pm$ 3543 <sup>a</sup>

<sup>a-c</sup> Diferentes literales en cada línea indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>NNT = grupo control no infectado-no tratado; INT = grupo control infectado-no tratado; Q = quinfamida 30 mg/kg; C = carbopol 30 mg/kg; QC60 = quinfamida 30 mg/kg + carbopol 60 mg/kg; QC30 = quinfamida 30 mg/kg + carbopol 30 mg/kg; QC15 = quinfamida 30 mg/kg + carbopol 15 mg/kg.

<sup>2</sup>Días post- tratamiento: 12, 19, 26 y 33 días de edad.

<sup>4</sup>EE= Error Estándar.

**Cuadro 14. Porcentaje de eficacia de quinfamida sola y en combinación con carbopol a partir de la cuantificación de ooquistes por gramo de heces.**

Días <sup>2</sup>	Tratamientos <sup>1</sup>				
	Q	C	QC60	QC30	QC15
7	30	0	45	65	30
14	5	0	8	15	4.5
21	0	0	0	0	0

<sup>1</sup>Q = quinfamida 30 mg/kg; C = carbopol 30 mg/kg; QC60 = quinfamida 30 mg/kg + carbopol 60 mg/kg; QC30 = quinfamida 30 mg/kg + carbopol 30 mg/kg; QC15 = quinfamida 30 mg/kg + carbopol 15 mg/kg.

<sup>2</sup>Días post- tratamiento: 19, 26 y 33 días de edad.

El máximo grado de lesión intestinal (4) (Véase cuadro 15) fue obtenido por los grupos INT y C, el menor grado de lesión (cero) fue obtenido por el grupo NNT y el resto de los grupos obtuvieron un máximo grado de lesión de 2.

**Cuadro 15. Eficacia anticoccidiana de quinfamida basada en el máximo grado de lesión intestinal al final del estudio.**

Grado de lesión <sup>2</sup>	Tratamientos <sup>1</sup>						
	NNT	INT	Q	C	QC60	QC30	QC15
	0	4	2	4	2	2	2

<sup>1</sup>NNT = grupo control no infectado-no tratado; INT = grupo control infectado-no tratado; Q = quinfamida 30 mg/kg; C = carbopol 30 mg/kg; QC60 = quinfamida 30 mg/kg + carbopol 60 mg/kg; QC30 = quinfamida 30 mg/kg + carbopol 30 mg/kg; QC15 = quinfamida 30 mg/kg + carbopol 15 mg/kg.

<sup>2</sup>Basado en una escala de 0-4.

3.1.4 Fase 4. Evaluación de la eficacia anticoccidiana de quinfamida sola y en combinación con carbopol durante un ciclo productivo

En el cuadro 16 se muestra el promedio  $\pm$  1 EE (Error Estándar) del peso registrado semanalmente desde el día 1 hasta el día 49. En este cuadro, diferentes literales muestran diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). En este caso, la diferencia entre los grupos se muestra a



partir del día 14 y esta se mantiene hasta el final del estudio (día 49). La ganancia de peso de los grupos Q y QC fue superior a la obtenida por el grupo D y INT. No se presentó diferencia estadísticamente significativa entre el peso de los grupos QC y NNT y entre los grupos NNT y D. Al final del estudio los grupos Q y QC obtuvieron una ganancia de peso superior al grupo D por 187 g y 254 g respectivamente.

En cuanto a la eliminación de ooquistes por gramo de cama no hubo diferencia significativa entre los grupos para el día 7 post tratamiento. Sin embargo, a partir del día 14 al 49, el grupo QC mostró una disminución significativa en la eliminación de ooquistes comparado con el grupo INT y desde el día 21 con el grupo Q. Este último grupo eliminó más ooquistes por gramo de cama que los grupos QC y D desde el día 21 hasta el día 49. Los pollos de los grupos QC o D no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre ellos desde el día 14 hasta el final del estudio. Los pollos del grupo INT excretaron una mayor cantidad de ooquistes por gramo de cama que el grupo Q (Véase cuadro 17).

**Cuadro 16. Promedio de peso corporal (g)  $\pm$  EE<sup>2</sup> de las aves en los diferentes tratamientos.**

Día	Tratamientos <sup>1</sup>				
	NNT	INT	Q	QC	D
<b>1</b>	42 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	41 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	41 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	42 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>	42 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>
<b>7</b>	240 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>	247 $\pm$ 2.0 <sup>ab</sup>	237 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	247 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	242 $\pm$ 2.4 <sup>ab</sup>
<b>14</b>	355 $\pm$ 13.6 <sup>ab</sup>	356 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	377 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	391 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	344 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>
<b>21</b>	713 $\pm$ 5.6 <sup>a</sup>	709 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>	756 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>	720 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	694 $\pm$ 14.8 <sup>a</sup>
<b>28</b>	1058 $\pm$ 18.46 <sup>a</sup>	1083 $\pm$ 25.7 <sup>ab</sup>	1164 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>	1161 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>	1076 $\pm$ 16.7 <sup>a</sup>
<b>35</b>	1683 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	1613 $\pm$ 20.5 <sup>a</sup>	1684 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	1730 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>	1657 $\pm$ 23.0 <sup>ab</sup>
<b>42</b>	2147 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>	1907 $\pm$ 24.8 <sup>b</sup>	2078 $\pm$ 3.3 <sup>c</sup>	2120 $\pm$ 4.9 <sup>d</sup>	1969 $\pm$ 22.6 <sup>b</sup>
<b>49</b>	2556 $\pm$ 48.6 <sup>c</sup>	2216 $\pm$ 30.5 <sup>b</sup>	2482 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	2550 $\pm$ 4.9 <sup>c</sup>	2296 $\pm$ 21.9 <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup> Diferentes literales en cada línea indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>NNT = grupo control no infectado-no tratado; INT = grupo control infectado-no tratado; Q = quinfamida 30 ppm; QC = quinfamida 30ppm con carbopol y D = decoquinato 30ppm.

<sup>2</sup>EE= Error Estándar.

**Cuadro 17. Eficacia anticoccidiana de los diferentes tratamientos basada en el promedio de ooquistes por gramo de cama  $\pm$  EE<sup>2</sup>.**

Día	Tratamientos <sup>1</sup>				
	NNT	INT	Q	QC	D
7	0 <sup>a</sup>	1000 $\pm$ 108 <sup>bc</sup>	1250 $\pm$ 23 <sup>c</sup>	1300 $\pm$ 184 <sup>bc</sup>	850 $\pm$ 23 <sup>b</sup>
14	0 <sup>a</sup>	5250 $\pm$ 209 <sup>b</sup>	1000 $\pm$ 70 <sup>c</sup>	800 $\pm$ 23 <sup>c</sup>	1000 $\pm$ 47 <sup>c</sup>
21	0 <sup>a</sup>	4750 $\pm$ 348 <sup>b</sup>	6000 $\pm$ 216 <sup>b</sup>	1300 $\pm$ 47 <sup>c</sup>	1150 $\pm$ 143 <sup>c</sup>
28	0 <sup>a</sup>	11000 $\pm$ 623 <sup>b</sup>	9500 $\pm$ 209 <sup>b</sup>	1500 $\pm$ 47 <sup>c</sup>	2000 $\pm$ 187 <sup>c</sup>
35	0 <sup>a</sup>	15500 $\pm$ 418 <sup>b</sup>	8000 $\pm$ 294 <sup>d</sup>	1100 $\pm$ 47 <sup>c</sup>	1200 $\pm$ 108 <sup>c</sup>
42	0 <sup>a</sup>	16000 $\pm$ 707 <sup>b</sup>	8500 $\pm$ 117 <sup>d</sup>	750 $\pm$ 84 <sup>c</sup>	600 $\pm$ 81 <sup>c</sup>
49	0 <sup>a</sup>	15500 $\pm$ 294 <sup>b</sup>	7750 $\pm$ 204 <sup>d</sup>	400 $\pm$ 62 <sup>c</sup>	150 $\pm$ 23 <sup>c</sup>

<sup>a-d</sup> Diferentes literales en cada línea indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>NNT = grupo control no infectado-no tratado; INT = grupo control infectado-no tratado; Q = quinfamida 30 ppm; QC = quinfamida 30ppm con carbopol y D = decoquinato 30ppm.

<sup>2</sup>EE= Error Estándar.

En el cuadro 18 se muestra la eficacia anticoccidiana en los diferentes grupos tratados. La mayor eficacia (99.03%) fue obtenida por el grupo D en el día 49. La mayor eficacia obtenida por el grupo Q fue de 80.95% en el día 14 y disminuyó a 50% para el día 49, para el grupo QC a los 14 días fue de 84.76, y posteriormente, se incrementó hasta 97.42% en el día 49. En cuanto al grado de lesión, en el grupo D no se observó engrosamiento de las paredes cecales ni estrechamiento cecal, sin embargo, las paredes en yeyuno se mostraron eritematosas y con hemorragias petequiales. En el grupo Q, las lesiones más frecuentes en intestino alcanzaron una puntuación máxima de dos, sin embargo, se presentó engrosamiento de las paredes del ciego, además de presencia de moco en las paredes intestinales. El grupo control INT mostró la mayor parte de las lesiones en la región cecal, donde se presentó engrosamiento de las paredes y reducción del lumen en comparación a los animales NNT. El ciego de las aves NNT se encontraba dilatado con heces blandas y pastosas. Como era de esperar, las aves del grupo NNT no mostraron lesiones macroscópicas (Véase cuadro 19).

**Cuadro 18. Porcentaje de eficacia de en los diferentes tratamientos a partir del conteo de ooquistes por gramo de cama.**

Día	Tratamientos <sup>1</sup>		
	Q	QC	D
7	-25.00	-30.00	15.00
14	80.95	84.76	80.95
21	-26.32	72.63	75.79
28	13.64	86.36	81.82
35	48.39	92.90	92.26
42	46.88	95.31	96.25
49	50.00	97.42	99.03

<sup>1</sup>Q = quinfamida 30 ppm; QC = quinfamida 30ppm con carbopol y D = decoquinato 30ppm.

**Cuadro 19. Eficacia anticoccidiana en los diferentes tratamientos basada en el máximo grado de lesión por región intestinal<sup>2</sup> y por día.**

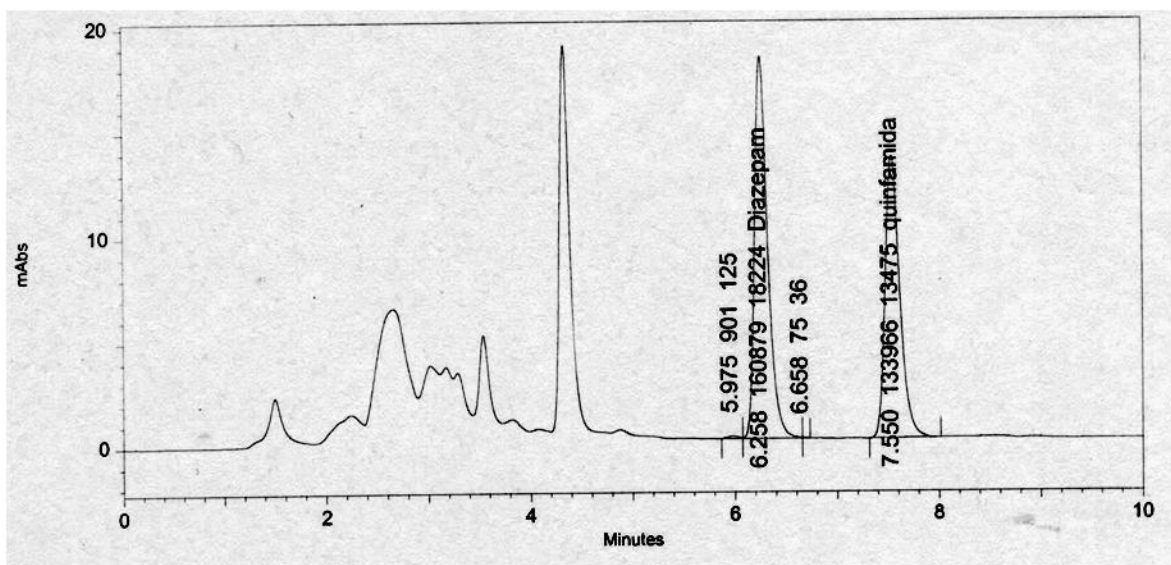
Tratamientos <sup>1</sup>	Día 21			Día 35			Día 49		
	Duo	Yey	Cie	Duo	Yey	Cie	Duo	Yey	Cie
NNT	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INT	1	0	1	2	2	2	1	1	3
Q	1	0	1	1	2	2	1	1	2
QC	0	1	1	0	0	0	1	1	1
D	0	0	1	0	1	1	0	0	1

<sup>1</sup>NNT = grupo control no infectado-no tratado; INT = grupo control infectado-no tratado; Q = quinfamida 30 ppm; QC = quinfamida 30ppm con carbopol y D = decoquinato 30ppm.

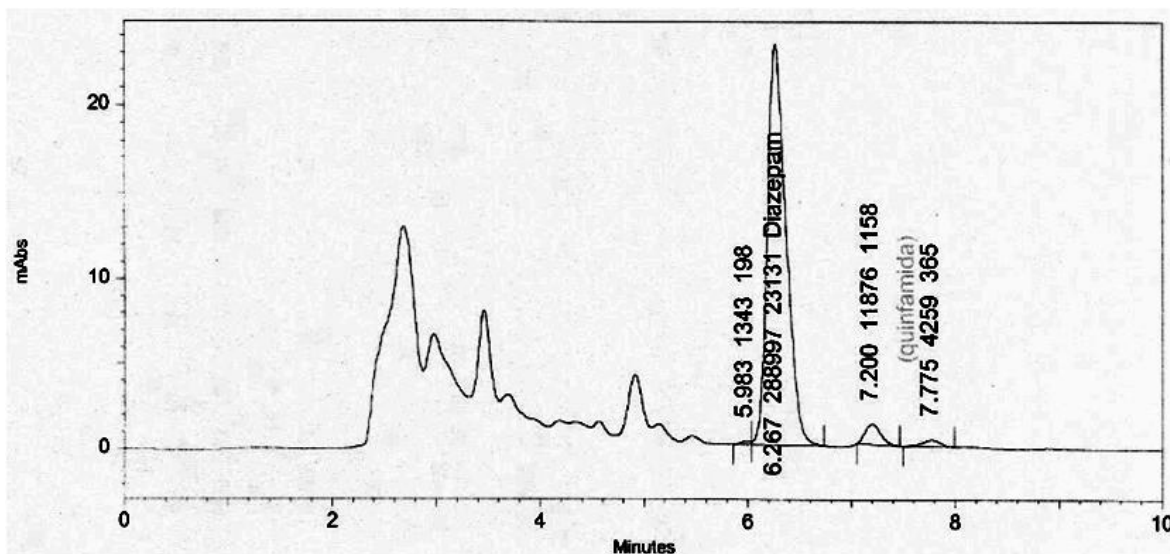
<sup>2</sup>El grado de lesión está basado en una escala de 0-4. Duo= duodeno (*E. Acervulina*); Yey = yeyuno (*E. maxima*) y Cie = ciegos (*E. tenella*).

### 3.2 Cuantificación de quinfamida en suero y heces

En la figura 4 se muestra el ejemplo de un cromatograma resultante de la medición de quinfamida adicionada a suero de pollo (2.0 µg/mL). Se detectó en un tiempo de retención de 7.5 min y con una altura de 13475 mAU (Unidades de Absorbancia), esta muestra fue parte de la curva de calibración, en esta se detecta la presencia de quinfamida y su tiempo de retención. Por el contrario, en los diferentes tiempos de muestreo de las aves no se detectó quinfamida en suero y los cromatogramas obtenidos en todas las aves y en todos los tiempos de muestreo fueron tal como el ejemplo que se presenta en la figura 5 y debido a que no se detectó ningún compuesto a los 7.5 minutos se consideró que la quinfamida no estaba presente en suero. En todos los cromatogramas de suero, el diazepam se encuentra en un tiempo de retención de 6.2 minutos.

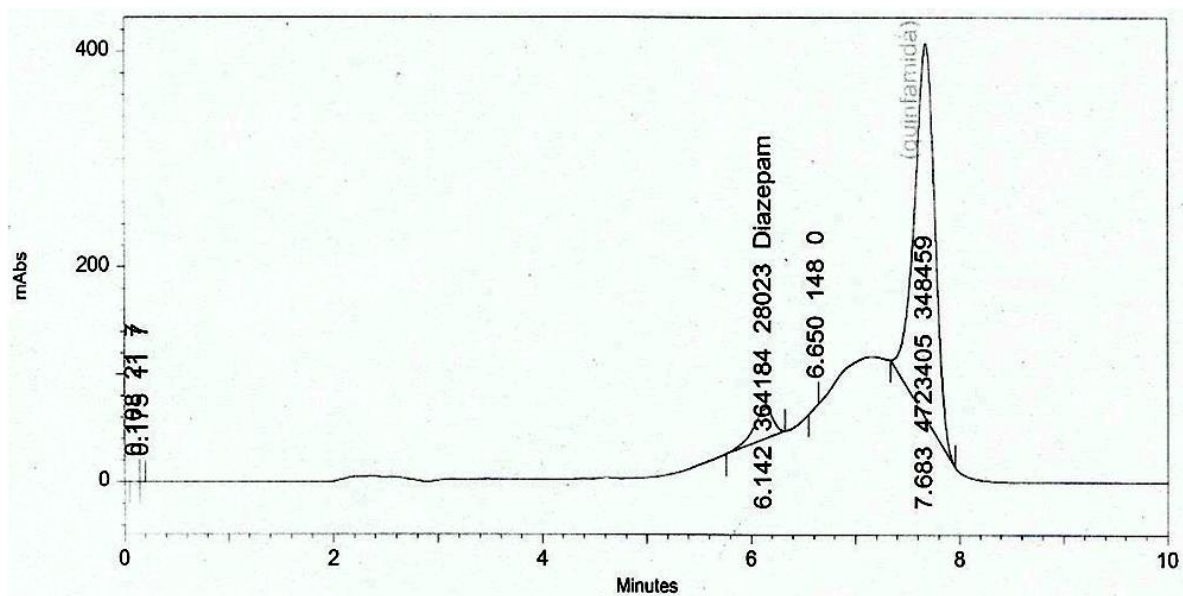


**Figura 4.** Ejemplo de cromatograma resultante de la medición de quinfamida adicionada a suero de pollo (2.0 µg/mL). Se detectó en un tiempo de retención de 7.5 min y con una altura de 13475 mAU (Unidades de Absorbancia). Esta muestra fue utilizada como parte de la curva de calibración de quinfamida y para determinar su tiempo de retención. Se utilizó diazepam como estándar interno y se encontró en un tiempo de retención de 6.2 min.



**Figura 5.** Ejemplo de cromatograma obtenido de suero de las aves tratadas con quinfamida en los diferentes tiempos de muestreo. No se detectó el compuesto a los 7.5 min, por lo que se consideró que la quinfamida no estaba presente en el suero. Se utilizó diazepam como estándar interno y se encontró en un tiempo de retención de 6.2 min.

En la figura 6 se muestra el ejemplo de un cromatograma obtenido de una muestra de heces recolectada por 24 h de un ave tratada con quinfamida, esta se detectó en un tiempo de retención de 7.6 min y con una altura de 348459 mAU (Unidades de Absorbancia). La cuantificación se llevó a cabo al comparar las alturas de las detecciones con una curva de calibración. Se recuperó un promedio de quinfamida de  $3.76 \pm 0.59 \mu\text{g} / 10 \text{ mg}$  heces durante 24 h, el promedio de muestra de heces recolectada durante 24 h fue de  $145 \pm 8.32 \text{ g}$ , lo que representó una eliminación de  $54.52 \pm 3.16 \text{ mg}$  (72.9 % de la dosis total) de quinfamida en heces durante las primeras 24 horas post- tratamiento por ave. El diazepam se encontró en un tiempo de retención de 6.1 min.



**Figura 6.** Ejemplo de un cromatograma obtenido de una muestra de heces recolectada por 24 h de un ave tratada con quinfolamida, esta se detectó en un tiempo de retención de 7.6 minutos y con una altura de 348459 mAU (Unidades de Absorbancia). La cuantificación se llevó a cabo al comparar las alturas de las detecciones con una curva de calibración. Se utilizó diazepam como estándar interno y se encontró en un tiempo de retención de 6.1 min.

#### 4. DISCUSIÓN

La WAAVP ha establecido una serie de lineamientos para ayudar en el diseño, implementación e interpretación de estudios para la evaluación de la eficacia de los fármacos contra especies de *Eimeria* en pollos y pavos. Para el desarrollo de estos lineamientos se tomaron en cuenta los requisitos reglamentarios para la generación de datos de eficacia de los medicamentos anticoccidianos en pollos y pavos de diversas naciones, incluyendo la EMA<sup>1</sup> (European Medicines Agency) de la Unión Europea, la FDA<sup>2</sup> (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos, la Autoridad Veterinaria de Medicamentos y Pesticidas de Australia<sup>3</sup> y la NZFSA (Nueva Zelanda Food Standards Authority)<sup>4</sup>. La información proporcionada en esta guía se ocupa de los aspectos necesarios para llevar a cabo estudios controlados en jaulas en batería (determinación de la dosis), corrales de piso (confirmación dosis), en instalaciones comerciales (estudios de efectividad de campo), la selección de las aves, el alojamiento, la alimentación, la preparación del alimento, técnicas de diagnóstico y los métodos para la preparación, mantenimiento y uso de los parásitos. Estas directrices también tienen como objetivo ayudar a los investigadores en la realización de estudios específicos, ayudar en la aprobación y registro de nuevos fármacos anticoccidianos y facilitar la estandarización de procesos a nivel internacional (Fei y col., 2013; Holdsworth y col., 2004). De esta forma, haber seguido las indicaciones anteriores respalda la validez de esta investigación, en la cual se evalúa por primera vez el uso de la quinfamida contra diferentes especies de *Eimeria* en aves. Además de evaluar la eficacia anticoccidiana de quinfamida, se evaluó si esta eficacia podría mejorar al administrarse en combinación con quitosán o carbopol, como vehículos gastro-retentivos en un preparado de patente UNAM denominado FOLA.

La lista de compuestos gastro-retentivos es extensa, algunos ejemplos de estos son: carboximetilcelulosa sódica, alginato de calcio, goma xantana, carbopol y quitosán. Este ensayo se limitó al uso de quitosán y carbopol; ya que existe evidencia del incremento de la actividad anticoccidiana de quinfamida cuando se administra en combinación con el

---

<sup>1</sup> <http://www.ema.europa.eu/ema/>

<sup>2</sup> <http://www.fda.gov/>

<sup>3</sup> <http://www.apvma.gov.au/guidelines/vetguidelines.shtml>

<sup>4</sup> <http://www.nzfsa.govt.nz/acvm/publications/standards-guidelines>

quitosán, razón por la cual fue elegido para este ensayo (Aquino y col., 2013). En cuanto al carbopol, éste se utilizó debido a su bajo costo en comparación a otros compuestos gastro-retentivos con características similares.

Usualmente, antes de administrar una nueva forma farmacéutica se realizan estudios de difusión como la cámara de Franz, estabilidad y disolución con el fin de tener una mayor certeza cuando el preparado se administre en la especie diana. Sin embargo, estas metodologías son de difícil extrapolación a la fisiología del pollo, debido a que los compartimentos en los que se encuentra dividido el tubo gastrointestinal de las aves, tienen características diferentes de pH y la velocidad del tránsito GI varía de 2 a 8 h dependiendo de la edad del ave (Angel y col., 2013). Esta dificultad técnica estimuló a realizar una prueba *in vivo* con el principio activo en cuestión para determinar la dosis máxima eficaz y su combinación con un compuesto gastro-retentivo.

En este estudio se demostró que la actividad anticoccidiana de la quinfamida es similar al administrar 60 mg/kg o 30 mg/kg, por lo que se eligió administrar una dosis 30 mg/kg para las fases en las que se combinaría con quitosán o carbopol. En la primera fase se administró el tratamiento en suspensión, sin embargo, esta presentación no es conveniente para la administración en grandes poblaciones y es por esta razón que en las siguientes fases los tratamientos se administraron en presentación FOLA debido a que esta forma farmacéutica fue desarrollada para poder mezclarse en el alimento y administrarse en grandes poblaciones. La eficacia de quinfamida sola a dosis de 30 mg/kg, fue similar durante las diferentes fases, de esta forma se corroboró lo obtenido al evaluar la dosis óptima, pero cuando se administró en combinación con quitosán o carbopol, su eficacia se modificó dependiendo del vehículo mucoadhesivo y la dosis en la que se combinó con la quinfamida ya sea de forma positiva o negativa. Contrario a lo que se esperaba, al combinar la quinfamida con el quitosán la actividad anticoccidiana no se ve incrementada, posiblemente se debe a que la degradación del quitosán en las aves se lleva a lo largo del intestino (67 – 98%) y de esta forma la liberación de la quinfamida es irregular en los diferentes segmentos del tubo gastrointestinal, a diferencia de los borregos en los cuales el quitosán es degradado en el rumen por bacterias ruminales y de esta forma la quinfamida es liberada al TGI, en una sección previa a la que se localizan las coccidias y la oportunidad



de entrar en contacto con éstas y ejercer su efecto es mayor (Dash y col., 2011; Şenel y McClure, 2004; Yoshino y col., 1991).

En las diferentes fases del estudio la quinfamida mostró una actividad anticoccidiana limitada, cuando se combinó con una dosis de 30 mg/kg de carbopol su actividad se incrementó de forma significativa, por lo cual esta combinación resulta eficaz para ser utilizada en aves a diferencia de la combinación quinfamida-quitosán. Este efecto puede ocurrir debido a las propiedades mucoadhesivas de este vehículo, el cual retarda el tiempo de tránsito gastrointestinal de la quinfamida, y de este modo se mantiene un contacto prolongado de quinfamida con las diferentes especies de *Eimeria* sp. (Surassmo y col., 2015).

Al administrar la quinfamida con el alimento durante un ciclo productivo, se presentó una eficacia limitada y esta mejoró notablemente cuando se combinó con carbopol y al final se obtuvo una eficacia similar a la obtenida por el decoquinato. Por otra parte la ganancia de peso obtenida en los grupos tratados con quinfamida sola y en combinación con carbopol fue superior significativamente a la obtenida por el decoquinato, una característica de gran valor para la industria avícola. A pesar de los resultados anteriores, éstos no corresponden con el grado de lesión obtenido en los diferentes grupos, en este caso el grupo con menor grado de lesión fue el tratado con decoquinato, sin embargo el grado de lesión y la actividad anticoccidiana no siempre se encuentran correlacionados y es por esa razón que se requiere determinar diferentes parámetros para evaluar la eficacia anticoccidiana de un nuevo fármaco (Holdsworth y col., 2004).

Los resultados de este estudio demostraron la actividad anticoccidiana de la quinfamida en aves y una mejora de la actividad al combinarse con carbopol. Por lo cual, este estudio es un referente para el inicio de la investigación de la quinfamida como agente anticoccidiano en aves y en caso de poder reproducir estos resultados en grandes poblaciones, podría convertirse en una nueva alternativa para el control de la coccidiosis en la industria avícola.

El modelo de infección utilizado en la fase final de este estudio para *Eimeria* sp. fue el reportado por Mathis y col. (2004), con el fin de simular una infección natural en los pollos. La administración continúa de quinfamida, mezclada con el alimento del día uno al

día 49, también simula la forma en la que la mayoría de los fármacos anticoccidianos se administran en la industria avícola. Sin embargo, una relación dosis respuesta en virtud de diversos entornos comerciales y las diferentes especies de *Eimeria* sp. son necesarios para optimizar el esquema de dosificación de esta molécula, así como la combinación con otros vehículos que pudieran mejorar su actividad anticoccidiana.

Una de la motivaciones para estudiar a la quinfamida en pollos fue que, dados los antecedentes es poco probable que se absorbiera debido a las características de la quinfamida y del TGI de las aves (Angel y col., 2013; Morales y col., 2000; Padilla y col., 2002). Se realizaron ensayos de biodisponibilidad a través de cromatografía de líquidos, debido a que esta técnica para la determinación de quinfamida y su metabolito en plasma, orina y heces ya había sido desarrollada para humanos, en el Departamento de Farmacia de la Facultad de química de la UNAM. Este método se validó previamente de acuerdo con los procedimientos y criterios de aceptación basados en los lineamientos de la USP XXIII (Morales y col., 2000; USP, 1994). Debido a que ya se contaba con un método válido para la cuantificación de quinfamida, no se requirió desarrollar un nuevo método para su cuantificación, lo que representó un ahorro en recursos y tiempo. El análisis de los resultados indicaron una absorción mínima o nula, debido a la ausencia de quinfamida en suero en los diferentes tiempos de muestreo y una recuperación en heces a las 24 h de 72%, lo que corresponde con los resultados reportados en humanos, demostrando la baja biodisponibilidad de quinfamida y al igual que con *Entamoeba histolytica* su acción contra *Eimeria* sp. podría ser a nivel luminal (Aquino y col., 2013; Morales y col., 2000). Si bien es cierto que no se encontró quinfamida en suero, faltaría determinar si existen concentraciones de su metabolito en suero, por lo que aún no se puede asegurar que su absorción es nula.

Otros aspectos sobre la quinfamida por ser determinados para considerarse como un fármaco que pudiera ser comercializado para su uso en la industria avícola incluyen: estudios de toxicidad en aves, perfil residual y mecanismo de acción, aunque este último no ha sido determinado en todos los fármacos anticoccidianos que se encuentran en el mercado (Conway y McKenzie, 2008; Peek y Landman, 2011).

## **5. CONCLUSIONES**

En este estudio se comprobó la actividad anticoccidiana de quinfamida así como su dosis optima al administrarse en presentación FOLA. Por otra parte se determinó la combinación adecuada de carbopol como compuesto gastro-retentivo, el cual es indispensable para la elaboración de esta forma farmacéutica. Además la combinación de quinfamida carbopol en presentación FOLA resultó exitosa al administrarse durante un ciclo productivo, mostrando que la eficacia anticoccidiana de quinfamida puede incrementarse cuando se combina con el vehículo gastro-retentivo adecuado. Por último, se demostró que la absorción de quinfamida es casi nula y que la mayor parte es eliminada en heces en las primeras 24 h, por lo que su residualidad es mínima, sin embargo para asegurar este último punto se requiere determinar la presencia o ausencia de su metabolito en sangre.

## 6. REFERENCIAS

- Abakar, A.D., Seri, H.I., Ismail, A.A., Musa, H.H., 2005. Comparative efficacy of selected anticoccidial drugs in Ambarorow sheep naturally infected with enteric coccidian in South Darfur, Sudan. *Sudan J. Vet. Res.* 20, 61–67.
- Angel, R., Kim, S.W., Li, W., Jimenez, M.E., 2013. Velocidad de paso y pH intestinal en aves: Implicaciones para la digestión y el uso de enzimas. USA.
- Anonymus, 2003. Regulation No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22nd September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Union* L268, 29–43.
- Aquino, I., Espinoza, F., Alcalá, Y., Tapia, G., Sumano, H., Gutiérrez, L., 2013. Comparative efficacy of chitosan enhancement of quinfamide or toltrazuril alone in an outbreak of coccidiosis in sheep. *Indian J. Vet. Res.* 22, 1–7.
- Baker, J.F., O'Melia, P.E., Benziger, D.P., Clemans, S.D., Edelson, J., 1982. The disposition of Quinfamide in the rat. *Arch. Int. Pharmacodyn. thérapie* 29–38.
- Belli, S.I., Smith, N.C., Ferguson, D.J.P., 2006. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! *Trends Parasitol.* 22, 416–423. doi:10.1016/j.pt.2006.07.004
- Berezin, V.E., Bogoyavlenskyi, A.P., Khudiakova, S.S., Alexuk, P.G., Omirtaeva, E.S., Zaitceva, I.A., Tustikbaeva, G.B., Barfield, R.G., Fetterer, R.H., 2010. Immunostimulatory complexes containing *Eimeria tenella* antigens and low toxicity plant saponins induce antibody response and provide protection from challenge in broiler chickens. *Vet. Parasitol.* 167, 28–35. doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.045
- Burt, S.A., Tersteeg, Z.M.H.G., Jongerius, G.B.G.M., Vervelde, L., Vernooij, J.C.M., 2013. In vitro inhibition of *Eimeria tenella* invasion of epithelial cells by phytochemicals. *Vet. Parasitol.* 191, 374–378. doi:10.1016/j.vetpar.2012.09.001
- Chapman, H.D., 1993. Resistance to anticoccidial drugs in fowl. *Parasitol. Today* 9, 159–162. doi:10.1016/0169-4758(93)90137-5
- Chapman, H.D., 1984. Drug resistance in avian coccidia (A review). *Vet. Parasitol.* 15, 11–

27.

- Chapman, H.D., Barta, J.R., Blake, D., Gruber, A., Jenkins, M., Smith, N.C., Suo, X., Tomley, F.M., 2013. A selective review of advances in coccidiosis research. *Adv. Parasitol.* 83, 93–171. doi:10.1016/B978-0-12-407705-8.00002-1
- Chapman, H.D., Jeffers, T.K., 2014. Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4, 214–217. doi:10.1016/j.ijpddr.2014.10.002
- Clarke, L., Fodey, T.L., Crooks, S.R.H., Moloney, M., O’Mahony, J., Delahaut, P., O’Kennedy, R., Danaher, M., 2014. A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. *Meat Sci.* 97, 358–74. doi:10.1016/j.meatsci.2014.01.004
- Conway, D.P., McKenzie, M.E., 2008. Anticoccidial Drugs and Vaccines, en: *Poultry Coccidiosis: Diagnostic and Testing Procedures*. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, pp. 77–164. doi:10.1002/9780470344620.ch6
- Coombs, G.H., Denton, H., Brown, S.M., Thong, K.W., 1997. Biochemistry of the coccidia. *Adv. Parasitol.* 39, 141–226.
- Dahiya, J.P., Wilkie, D.C., Van Kessel, A.G., Drew, M.D., 2006. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Anim. Feed Sci. Technol.* 129, 60–88. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.12.003
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M., Chiellini, E., 2011. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 36, 981–1014. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001
- Dauguschies, A., Gässlein, U., Rommel, M., 1998. Comparative efficacy of anticoccidials under the conditions of commercial broiler production and in battery trials. *Vet. Parasitol.* 76, 163–171. doi:10.1016/S0304-4017(97)00203-3
- Davila, G.C.E., Vasquez, C., Trujillo, H.B., Huerta, M., 2002. Nitazoxanide compared with quinfamide and mebendazole in the treatment of helminthic infections and intestinal

- protozoa in children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 251–254.
- Dorne, J.L.C.M., Fernández, C.M.L., Bertelsen, U., Renshaw, D.W., Peltonen, K., Anadon, A., Feil, A., Sanders, P., Wester, P., Fink, G.J., 2013. Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 270, 196–208. doi:10.1016/j.taap.2010.12.014
- EMA, 1999. Toltrazuril Extension to ppigs, Summary Report 2, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMA/MRL/314/97-FINAL.
- EMA, 1998. Toltrazuril, Summary Report 1, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMA/MRL/314/97-FINAL.
- Fei, C., Fan, C., Zhao, Q., Lin, Y., Wang, X., Zheng, W., Wang, M., Zhang, K., Zhang, L., Li, T., Xue, F., 2013. Anticoccidial effects of a novel triazine nitromezuril in broiler chickens. *Vet. Parasitol.* 198, 39–44. doi:10.1016/j.vetpar.2013.08.024
- French, D.L., Himmelstein, K.J., Mauger, J.W., 1995. Physicochemical aspects of controlled release of substituted benzoic and naphthoic acids from Carbopol® gels. *J. Control. Release* 37, 281–289. doi:10.1016/0168-3659(95)00086-0
- Gussem, M. De, 2006. Coccidiosis in poultry : review on diagnosis , control , prevention and interaction with overall gut health, en: 16th European Symposium on Poultry Nutrition. pp. 253–261.
- Hafez, M., 2008. Poultry coccidiosis : prevention and control approaches. *Arch.Geflügelk* 72, 2–7.
- Hansen, M., Krogh, K.A., Björklund, E., Halling-Sørensen, B., Brandt, A., 2009. Environmental risk assessment of ionophores. *Trends Anal. Chem.* 28, 534–542. doi:10.1016/j.trac.2009.02.015
- Holdsworth, P.A., Conway, D.P., McKenzie, M.E., Dayton, A.D., Chapman, H.D., Mathis, G.F., Skinner, J.T., Mundt, H., Williams, R.B., 2004. World Association for the

- Advancement of Veterinary Parasitology ( WAAVP ) guidelines for evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in chickens and turkeys. *Vet. Parasitol.* 121, 189–212. doi:10.1016/j.vetpar.2004.03.006
- Jana, S., Manna, S., Nayak, A.K., Sen, K.K., Basu, S.K., 2014. Carbopol gel containing chitosan-egg albumin nanoparticles for transdermal aceclofenac delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 114, 36–44. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.09.045
- Johnson, J., Reid, W.M., 1970. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 28, 30–36.
- Kelessidis, V.C., Poulakakis, E., Chatzistamou, V., 2011. Use of Carbopol 980 and carboxymethyl cellulose polymers as rheology modifiers of sodium-bentonite water dispersions. *Appl. Clay Sci.* 54, 63–69. doi:10.1016/j.clay.2011.07.013
- Kiani, R., Rasadi, M., Mohammadian, M.N., 2007. Sources and Routes of Introduction of *Eimeria* Oocysts into Broiler Chick` s Houses. *Int. J. Poult. Sci.* 6, 925–927. doi:10.3923/ijps.2007.925.927
- Laczay, P., Vörös, G., Semjén, G., 1995. Comparative Studies on the Efficacy of Sulphachlorpyrazine and Toltrazuril for the Treatment of Caecal Coccidiosis in Chickens. *Int. J. Parasitol.* 25, 753–756. doi:10.1016/S0020-7519(98)00211-2
- Lee, K.W., Ho Hong, Y., Lee, S.H., Jang, S.I., Park, M.S., Bautista, D. a, Ritter, G.D., Jeong, W., Jeung, H.Y., An, D.J., Lillehoj, E.P., Lillehoj, H.S., 2012. Effects of anticoccidial and antibiotic growth promoter programs on broiler performance and immune status. *Res. Vet. Sci.* 93, 721–8. doi:10.1016/j.rvsc.2012.01.001
- Lee, K.W., Lillehoj, H.S., Jang, S.I., Lee, S.H., Bautista, D.A., Donald Ritter, G., Lillehoj, E.P., Siragusa, G.R., 2013. Comparison of live *Eimeria* vaccination with in-feed salinomycin on growth and immune status in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* 95, 110–114. doi:10.1016/j.rvsc.2013.02.005
- Long, P.L., Jeffers, T.K., 1986. Control of chicken coccidiosis. *Parasitol. Today* 2, 236–240. doi:10.1016/0169-4758(86)90002-5

- Long, P.L., Rowell, J.G., 1975. Sampling broiler house litter for coccidial oocysts. *Br. Poult. Sci.* 16, 583–592. doi:10.1080/00071667508416233
- Malo, E.D.C., 2013. Coccidiosis : La enfermedad , consecuencias y tratamiento. *Congr. Cient. Agric.*
- Martínez, C.A.P., Cortez, R.M.O., Ezquerro, B.J.M., Z, Graciano, V.A., Rodriguez, F.F., Castillo, O.M.M., Yépez, G.M.Z., Plascencia, J.M., 2010. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydr. Polym.* 82, 305–315. doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.069
- Mathis, G.F., Froyman, R., Kennedy, T., 2004. Coccidiosis control by administering toltrazuril in the drinking water for a 2-day period. *Vet. Parasitol.* 121, 1–9. doi:10.1016/j.vetpar.2004.02.020
- McDougald, L.R., Seibert, B.P., 1998. Residual activity of anticoccidial drugs in chickens after withdrawal of medicated feeds. *Vet. Parasitol.* 74, 91–99. doi:10.1016/S0304-4017(97)00172-6
- McDowgal, R., Reid, M., 2003. *Coccidiosis in Disease of Poultry*, 11a ed. Iowa State University Press, USA, Iowa.
- Moloney, M., Clarke, L., O’Mahony, J., Gadaj, A., O’Kennedy, R., Danaher, M., 2012. Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1253, 94–104. doi:10.1016/j.chroma.2012.07.001
- Morales, J.M., Jung, C.H., Alarcón, A., Barreda, A., 2000. Solid-phase extraction and liquid chromatographic quantitation of quinfolin in biological samples. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 746, 133–139. doi:10.1016/S0378-4347(00)00307-8
- Morgan, E.R., Cavill, L., Curry, G.E., Wood, R.M., Mitchell, E.S.E., 2005. Effects of aggregation and sample size on composite faecal egg counts in sheep. *Vet. Parasitol.* 131, 79–87. doi:10.1016/j.vetpar.2005.04.021



- Morris, B.C., Danforth, H.D., Caldwell, D.J., Pierson, F.W., McElroy, A.P., 2004. Intestinal Mucosal Mast Cell Immune Response and Pathogenesis of Two *Eimeria acervulina* Isolates in Broiler Chickens. *Poult. Sci.* 83, 1667–1674.  
doi:10.1093/ps/83.10.1667
- Morris, G.M., Gasser, R.B., 2006. Biotechnological advances in the diagnosis of avian coccidiosis and the analysis of genetic variation in *Eimeria*. *Biotechnol. Adv.* 24, 590–603. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.06.001
- Mulder, P.P.J., Balzer, R.P., Te Brinke, E.M., Bolck, Y.J.C., Berendsen, B.J.A., Gerçek, H., Schat, B., Van Rhijn, J.A., 2005. Deposition and depletion of the coccidiostats toltrazuril and halofuginone in eggs. *Anal. Chim. Acta* 529, 331–337.  
doi:10.1016/j.aca.2004.08.017
- NRC, 1994. Nutrient requirements of poultry, Ninth. ed. National Academy Press, Washington , D.C.
- Oh, S., Wilcox, M., Pearson, J.P., Borrós, S., 2015. Optimal design for studying mucoadhesive polymers interaction with gastric mucin using a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D): Comparison of two different mucin origins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96, 477–83. doi:10.1016/j.ejpb.2015.08.002
- Padilla, N., Diaz, R., Alarcon, A., Barreda, R., 2002. Antiamoebic chemoprophylaxis using quinifamide in children: a comparative study. *Sci. World J.* 2, 1070–1078.  
doi:10.1100/tsw.2002.174
- Padilla, N., Figueroa, R., Rivera, M. del R., Guerrero, S., 1995. Estudio comparativo entre quinifamida y etofamida en el tratamiento de la infección amibiana asintomática. *Rev. Mex. pediatría* 62, 5–7.
- Paker, S., Neau, S., 2009. Pellet characteristics and drug release when the form of propranolol is fixed as moles or mass in formulations for extruded and spheronized Carbopol-containing pellets. *Int. J. Pharm.* 369, 96–104.  
doi:10.1016/j.ijpharm.2008.11.002

- Panter, K.E., Welch, K.D., Gardner, D.R., Lee, S.T., Green, B.T., Pfister, J.A., Cook, D., Davis, T.Z., Stegelmeier, B.L., 2012. Ionophores, en: *Veterinary Toxicology*. Elsevier Inc., pp. 1031–1079. doi:10.1016/B978-0-12-385926-6.00100-9
- Peek, H.W., Landman, W.J.M., 2011. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet. Q.* 31, 143–161. doi:10.1080/01652176.2011.605247
- Peek, H.W., Landman, W.J.M., 2003. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathol.* 32, 391–401. doi:10.1080/0307945031000121149
- Qi, H., Chen, W., Huang, C., Li, L., Chen, C., Li, W., Wu, C., 2007. Development of a poloxamer analogs/carbopol-based in situ gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. *Int. J. Pharm.* 337, 178–187. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.12.038
- Quiroz, R.E., Dantán, E., 2015. Control of Avian Coccidiosis: Future and Present Natural Alternatives. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–11. doi:10.1155/2015/430610
- Raether, W., Hofmann, J., Uphoff, M., 1995. Cultivation and cryopreservation, en: Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P. (Eds.), *Biotechnology : guidelines on techniques in coccidiosis research*. Luxembourg, pp. 79–84.
- Romero, R., Robert, L., Martínez, I., Vázquez, O., Ruiz, D., Tay, J., Sánchez, J., Calderon, L., 2005. Evaluation of the efficacy and security of quinfamide administered in a single dose of 300 mg in adult patients with intestinal amebiasis. *Parasitol. Latinoam.* 60, 57–60. doi:10.4067/S0717-77122005000100009
- Şenel, S., McClure, S.J., 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1467–1480. doi:10.1016/j.addr.2004.02.007
- Singh, V.K., Anis, A., Banerjee, I., Pramanik, K., Bhattacharya, M.K., Pal, K., 2014. Preparation and characterization of novel carbopol based bigels for topical delivery of metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis. *Mater. Sci. Eng. C* 44, 151–

158. doi:10.1016/j.msec.2014.08.026

- Sosnik, A., Imperiale, J.C., Vázquez-González, B., Raskin, M.M., Muñoz-Muñoz, F., Burillo, G., Cedillo, G., Bucio, E., 2015. Mucoadhesive thermo-responsive chitosan-g-poly(N-isopropylacrylamide) polymeric micelles via a one-pot gamma-radiation-assisted pathway. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 136, 900–907.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.10.036>
- Speer, C., 1999. Coccidiosis, en: Howard, J., Smith, R. (Eds.), *Current veterinary therapy 4: food animal practice*. WB Saunders, Philadelphia.
- Sumano, H., Gutiérrez, L., 2012. Composicion de vehiculos y formas farmaceuticas de liberacion sostenida y aumento de biodisponibilidad de antibacterianos, anticoccidianos y otros farmacos en aves comericales y cerdos. MX/a/2012/013222.
- Sumano, H., Gutiérrez, L., 2010. *Farmacología clínica en aves*, 4a ed. Mc Graw Hill, México.
- Sumano, H., Ocampo, L., 2004. *Farmacología veterinaria*, 3a ed. Mc Graw Hill, México.
- Surassmo, S., Saengkrit, N., Ruktanonchai, U.R., Suktham, K., Woramongkolchai, N., Wutikhun, T., Puttipipatkachorn, S., 2015. Surface modification of PLGA nanoparticles by carbopol to enhance mucoadhesion and cell internalization. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 130, 229–36. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.04.015
- Tenter, A.M., Barta, J.R., Beveridge, I., Duszynski, D.W., Mehlhorn, H., Morrison, D.A., Thompson, A.R.C., Conrad, P. a, 2002. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *Int. J. Parasitol.* 32, 595–616. doi:10.1016/S0020-7519(02)00021-8
- Tovar, H.M., 2002. Situación actual en la prevención de la coccidiosis y perspectivas de futuro, en: *Jornadas Prof. de Producción de Carne de Pollo. Selecciones avícolas*, Lloret de mar, pp. 361–371.
- Tzankov, B., Yoncheva, K., Popova, M., Szegedi, A., Momekov, G., Mihály, J., Lambov, N., 2013. Indometacin loading and in vitro release properties from novel carbopol coated spherical mesoporous silica nanoparticles. *Microporous Mesoporous Mater.*

- 171, 131–138. doi:10.1016/j.micromeso.2012.12.037
- USP, 1994. US Pharmacopoeia XXIII. Rockv. United States Pharmacopeial Conv. Inc 1929.
- Vanparijs, O., Hermans, L., van der Flaes, L., Marsboom, R., 1989. Efficacy of diclazuril in the prevention and cure of intestinal and hepatic coccidiosis in rabbits. *Vet. Parasitol.* 32, 109–117. doi:10.1016/0304-4017(89)90111-8
- Williams, R.B., 1999. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int. J. Parasitol.* 29, 1209–1229. doi:10.1016/S0020-7519(99)00086-7
- Williams, R.B., 1999. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int. J. Parasitol.* 29, 1209–1229. doi:10.1016/S0020-7519(99)00086-7
- Wolf, J.M., Dungan, S.R., Mccarthy, M.J., Lim, V., Phillips, R.J., 2014. Vibration-induced geometric patterns of persistent holes in Carbopol gels. *J. Nonnewton. Fluid Mech.* 1–9. doi:10.1016/j.jnnfm.2014.10.001
- Yoshino, Y., Matsushashi, A., Minam, S., Okamoto, Y., Shigemasa, Y., Oura, R., Sekine, J., 1991. A study on the degradability of chitin and chitosan in the rumen of sheep given Italian ryegrass hay ad libitum. *J. Fac. Agric. Tottori Univ.* 27, 47–51.
- Yun, C., 2000. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 303–324. doi:10.1016/S0145-305X(99)00080-4
- Yuño, M., Gogorza, L., 2008. Coccidiosis aviar: respuesta inmune y mecanismos de control en la industria avícola. *Rev. Vet.* 19, 61–66.
- Žižek, S., Zidar, P., 2013. Toxicity of the ionophore antibiotic lasalocid to soil-dwelling invertebrates: Avoidance tests in comparison to classic sublethal tests. *Chemosphere* 92, 570–575. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.04.007