



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DISEÑO Y EVALUACIÓN FARMACOCINÉTICA DE UN FORMULADO  
SUBCUTÁNEO DE LIBERACIÓN MODIFICADA DE CLORHIDRATO DE  
TRAMADOL PARA USO FINAL EN PERROS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:**

**ELIZABETH ORTEGA MOLINA**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**LUIS OCAMPO CAMBEROS (FMVZ-UNAM)**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DINORAH VARGAS ESTRADA (FMVZ-UNAM)**

**MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD (FQ-UNAM)**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **DEDICATORIAS**

A mi mamá, María Rosalinda Molina Oliver y a mis hermanas Ana Lilia y Alejandra, por ser el apoyo que han sido durante toda mi vida.

A mi papá, Víctor Hugo Ortega Morales, Q.E.P.D.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado nuevamente la oportunidad de seguir siendo su alumna, ahora en otro nivel y de igual manera, por abrirme caminos y desarrollar mi vida profesional.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, por permitirme realizar mi posgrado y contribuir a mi formación académica y científica.

A la Facultad de Química por la asesoría, el espacio y el tiempo ofrecido para la realización de este proyecto, incluyendo todos los compañeros de dicha facultad que me ayudaron en su momento.

Al Dr. Luis Ocampo Camberos por aceptar ser mi tutor principal para este proyecto, por confiar en mí y por su apoyo.

A la Dra. Dinorah Vargas Estrada por su apoyo durante todo el proceso, por su infinita ayuda en la parte experimental del proyecto, por su amabilidad, paciencia y confianza.

A la Dra. María Josefa Bernad Bernad y al Dr. Jesús Gracia Mora por su asesoría y apoyo en este proyecto.

A la Dra. Sara Caballero Chacón por haber permitido trabajar en el laboratorio 2207 y utilizar los equipos y cristalería bajo su resguardo, para la realización de este trabajo.

Al proyecto PAPIIT IT202317 por haber financiado la adquisición del equipo (incubadora con agitación, con inventario de la UNAM 02512176) utilizada en este trabajo.

A CONACYT por el apoyo económico que me otorgó para realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Itzcoatl Aquino Díaz y a la Dra. Claudia Ledesma Carrasco que aparte de su amistad fueron de gran apoyo en varios puntos de la tesis.

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
LISTA DE GRÁFICAS	6
LISTA DE CUADROS	7
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
KEYWORDS	12
INTRODUCCIÓN	13
1.1 Antecedentes	13
1.1.1 Manejo del dolor	15
1.1.1.2 Clorhidrato de tramadol	16
1.1.3 Liberación modificada	19
1.1.4 Poloxámero 407	19
1.1.5 Reología	22
1.1.6 Modelo matemático- correlación <i>in vivo-in vitro</i>	25
2. JUSTIFICACIÓN	29
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVO GENERAL	31
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
6. MATERIALES Y METODOLOGÍA	33
6.1 ÁREA DE ESTUDIO	33
6.2 MATERIALES	33
6.3 EQUIPO	33

6.4 MÉTODO EXPERIMENTAL	34
6.5 TÉCNICA ESPECTROSCÓPICA	35
6.6 LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> CON DISPOSITIVO FLOAT-A-LIZER DE 50 kDa	35
6.7 LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> SIN DISPOSITIVO FLOAT-A-LIZER	36
6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
6.9 ESTUDIO DE DEFORMACIÓN DEL POLÍMERO	37
7 RESULTADOS	38
7.1 RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE LIBERACIÓN	38
7.2 RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE REOLOGÍA	44
7.3 CORRELACIÓN <i>IN VITRO-IN VIVO</i>	48
8 DISCUSIÓN	52
9 CONCLUSIONES	55
10 REFERENCIAS	56
11 ARTÍCULOS PUBLICADOS	65

## LISTA DE GRÁFICAS

TÍTULO DE LA GRÁFICA	PÁGINA
<b>Gráfica 1:</b> Curva de calibración del clorhidrato de tramadol en solución HEPES Buffer con un pH de 7.4	38
<b>Gráfica 2:</b> Espectroscopía de las absorbancias de las formulaciones del tramadol	39
<b>Gráfica 3:</b> Liberación de la concentración del clorhidrato de tramadol a través Dispositivo Float-A-Lizer para diálisis con membrana de 50 kDa, Dispositivo Float-A-Lizer ® en porcentaje	40
<b>Gráfica 4:</b> Liberación del clorhidrato de tramadol sin el uso de un Dispositivo Float-A-Lizer en porcentaje	42
<b>Gráfica 5:</b> Viscosidad a diferentes temperaturas de la concentración del poloxámero al 17%	45
<b>Gráfica 6:</b> Comportamiento viscoelástico a diferentes temperaturas de la concentración del poloxámero al 20 %	46
<b>Gráfica 7:</b> Curvas de viscoelasticidad de las formulaciones del clorhidrato de tramadol y poloxámero con una concentración del 17% a 38°C	47
<b>Gráfica 8:</b> Curvas de viscoelasticidad de las formulaciones del clorhidrato de tramadol y poloxámero con una concentración del 20% a 38°C.	48

--	--

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1</b>	Variables farmacocinéticas del tramadol SC en varias especies.	18
<b>Cuadro 2</b>	Nomenclatura de las formulaciones diseñadas y trabajadas en el presente trabajo	35
<b>Cuadro 3</b>	Análisis estadístico a través de las pruebas de liberación con el uso de membranas de diálisis de 50 kDa, Dispositivo Float-A-Lizer®	41
<b>Cuadro 4</b>	Análisis estadístico a través de las pruebas de liberación sin el uso de membranas de diálisis.	43
<b>Cuadro 5</b>	Liberación modificada del tramadol, excipientes usados y resultados obtenidos con la membrana de diálisis de 50 kDa, Dispositivo Float-A-Lizer®	43
<b>Cuadro 6</b>	Liberación modificada del tramadol, excipientes usados y resultados	43



	obtenidos sin la membrana de diálisis	
<b>Cuadro 7</b>	Valores farmacocinéticos usando una membrana de diálisis de 50 kDa para las formulaciones de tramadol, Dispositivo Float-A-Lizer®	51
<b>Cuadro 8</b>	Valores farmacocinéticos sin el uso de una membrana de diálisis.	52

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Clorhidrato de tramadol.	16
<b>Figura 2</b>	Estructura molecular del 407	20
<b>Figura 3</b>	Esquema de la concentración micelar critica de los poloxámeros	21
<b>Figura 4</b>	Esquema experimental con el Dispositivo Float-A- Lizer ®	36

## RESUMEN

Se diseñaron formulaciones de clorhidrato de tramadol al 5% en un sistema matricial a base de poloxámero 407 (Pluronic F127) a diferentes concentraciones (siendo del 10%, 14%, 17% y 20% respectivamente) con el fin de obtener prototipos de liberación prolongada, que se medirán a través de estudios *in vitro* para estudiar el efecto que tiene el polímero en adición con el fármaco.

Se ha reportado en estudios previos que el tiempo en que permanecen las concentraciones terapéuticas en sangre del clorhidrato de tramadol con las formulaciones comerciales disponibles de liberación inmediata o convencional en perros tiene un intervalo de 0.5-1.7 h.

El objetivo de este trabajo es el de conocer la liberación de las formulaciones diseñadas primeramente en un sistema *in vitro* con el propósito de obtener una nueva presentación farmacéutica para su posterior evaluación en perros, con la finalidad de que con una sola administración se obtengan concentraciones plasmáticas terapéuticas por tiempo prolongado, superando el intervalo de 0.5-1.7 h que alcanza la formulación comercial.

Por medio de un estudio *in vitro* de liberación a través de espectrofotometría con luz ultravioleta la longitud de onda de 273.15 nm, se evaluó el porcentaje de liberación del clorhidrato de tramadol en cada una de las formulaciones establecidas, los resultados se compararon con la formulación de tramadol sin adición del poloxámero 407, la obtención de las muestras se realizó de las 0.25 h hasta las 72 h, para el análisis de liberación se compararon los resultados obtenidos del uso de un dispositivo Float-A-Lizer con membrana de diálisis de 50 kDa y con los obtenidos sin el uso de membranas de diálisis

Con base en los resultados obtenidos con el uso de una membrana de 50 kDa- se observó que el poloxámero a la concentración del 10% se liberó un 98%, a la concentración del 14% se liberó un 50%, a la concentración del 17% se liberó un 23% y para el poloxámero al 20% se liberó un 16% a las 72 h.

Considerando todas las formulaciones a diferencia de la liberación con el tramadol sin adición del poloxámero y de la formulación comercial donde se liberó cerca del 100% a las 24 h, se comprobó que la liberación es más tardada en las formulaciones que se diseñaron en este estudio.

Al comparar el presente estudio con las pruebas *in vitro* de liberación sin utilización de las membranas de diálisis, se observó que las concentraciones de poloxámero al 10% y 14%, se liberó 90-100% del clorhidrato de tramadol en adición con el poloxámero 407 a las 36 h, igual que, en las concentraciones de poloxámero al 17% y 20%, al comparar dichas formulaciones con la del producto comercial y a la formulación sin adición del poloxámero donde se liberó casi el 100% del clorhidrato de tramadol a las 2 h.

Los resultados muestran que el tamaño de poro de la membrana 50 kDa del dispositivo Float-A-Lizer permitió el libre paso del clorhidrato de tramadol, por lo que es recomendable el uso de este tamaño de poro en estudios posteriores.

Adicionalmente se hicieron estudios de reología para estimar a que temperatura la formulación sol-gel se gelificaba dependiendo la concentración del poloxámero.

Finalmente se realizó un estudio para conocer el comportamiento cinético del fármaco a través de modelos matemáticos de correlación *in vivo-in vitro*.

## **ABSTRACT**

Tramadol is an analgesic that can achieve therapeutic plasma concentrations in a time interval from 0.5 to 1.7 hours, so it is necessary to re-dose four times a day, which reduces the dosage compliance and treatment effectiveness.

Several formulations of tramadol hydrochloride at 5% were designed in a matrix system based on poloxamer 407 at different concentrations (10%, 14%, 17%, and 20%), named: TP10, TP14, TP17, and TP20, respectively, to achieve a modified-release formulation.

In vitro release studies were carried out using a visible light spectrophotometer at a wavelength of 273.15 nm. We compared a tramadol formulation without polymer supplements (TF) and the commercial formulation (CF). In addition, we determined the samples' rheological properties of formulations in a lapse of time from 0.25 to 72 hours, and we compared the use or absence of dialysis membrane-50 kDa.

The formulations TP10, TP14, TP17, and TP20 released 98%, 50%, 23%, and 16% each at 72 hours, while formulations TF and TF CF released almost 100% at 24 hours. On the other hand, without using dialysis membranes, the formulations TP10 and TP14 released around 90-100% at 36 hours, while TP17 and TP20 achieved it in 48 hours, and the TF and CF formulations released almost 100% at 2 hours.

In this work, modified-release formulations were obtained, which can prolong and retain the release of tramadol hydrochloride compared to the commercial product, reducing the daily dose frequency and complying with the analgesic treatment in patients with pain for a longer time.

About rheological studies results show gels with a 17% and 20% poloxamer concentration at a temperature of 38°C and 45°C is a non-newtonian fluid, indicating that the viscosity decreases when the deformation occurs velocity of temperature increases.

**KEYWORDS:** Tramadol, poloxamer 407, release, rheology, spectrophotometer, membrane, concentrations.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 ANTECEDENTES

El médico veterinario especialista en perros y gatos tiene como misión corregir el origen de la enfermedad, así como de preservar la calidad de vida del paciente, controlando el dolor que estos lleguen a presentar.

Existen enfermedades que presentan una signología con dolor leve, moderado o severo, principalmente en pacientes con alteraciones gastrointestinales, del sistema urinario, neurológicos o enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, enfermedades de articulaciones o enfermedad del disco intervertebral y es común que se presenten pacientes con esta signología clínica (Papich *et al.*, 2004, Sumano *et al.*, 2015 y Gustavsson *et al.*, 2012).

El dolor neuropático requiere una amplia variedad de distintas clases de medicamentos y procedimientos y no puede ser manejado con una monoterapia. Antes y durante cualquier cirugía, distintas drogas analgésicas y procedimientos pueden ser utilizadas para reducir la excitación del impulso doloroso aferente. Algunas de estas drogas deben continuar su administración durante el postoperatorio para evitar la sensibilización central y periférica.

Existen diversos grupos de analgésicos que se utilizan en pequeñas especies, tales como son: AINEs: Hay evidencia que sustenta la causa inflamatoria que conlleva a los cambios patofisiológicos sobre el sistema nervioso central y periférico; y el posterior dolor neuropático y el aumento del dolor mediado por los prostanoïdes espinales.

Opiáceos:

Desde hace mucho tiempo se sabe que la morfina, prototipo de agonista de opioides, alivia el dolor intenso con eficacia notoria. La adormidera (amapola) es la fuente del opio crudo. El opio, fuente de la morfina, se obtiene de la adormidera *Papaver somniferum* y de *P. album*. El opio contiene muchos alcaloides, de los cuales el principal es la morfina, presente en una concentración de casi 10%. La morfina es un agonista completo del receptor de opioides, el principal receptor de los opioides analgésicos

Otros subtipos de receptores de opioides incluyen los  $\delta$  y  $\kappa$ .

Algunos opioides, por ejemplo, la nalbufina, pueden producir un efecto agonista (o agonista parcial) en un subtipo de receptores de opioides y un antagonista en otro.

La nalbufina es un *agonista* fuerte de receptores  $\kappa$  y un *antagonista* de receptores  $\mu$  que se administra por vía parenteral. A dosis más altas parece haber un efecto máximo, no observado con la morfina, de depresión respiratoria; por desgracia, cuando ésta ocurre puede ser relativamente resistente.

La buprenorfina es un potente derivado del fenantreno de acción prolongada, agonista parcial del receptor  $\mu$  y antagonista del receptor  $\kappa$ . Se prefiere su administración por vía sublingual para evitar un efecto significativo de primer paso. La prolongada duración de acción se debe a su lenta disociación de los receptores  $\mu$ . El tramadol es un analgésico de acción central cuyo mecanismo de acción se basa de manera predominante en el bloqueo de la recaptación de serotonina; también se ha observado que inhibe la función del transportador de noradrenalina. El tramadol es un analgésico de acción central cuyo mecanismo de acción se basa de manera predominante en el bloqueo de la recaptación de serotonina; también se ha observado que inhibe la función del transportador de noradrenalina. Como se antagoniza sólo parcialmente por la naloxona, se cree que es apenas un débil agonista de receptores  $\mu$ . La dosis recomendada es de 50 a 100 mg por vía oral cada 6 h. La toxicidad incluye el vínculo con convulsiones.

Algunos estudios en animales indican que la administración perioperatoria de gabapentina en animales con daño nervioso puede reducir el potencial desarrollo o la progresión del dolor neuropático. Han sido reportados los beneficios de la suplementación por largo tiempo con gabapentina luego de un trauma en 3 gatos; sin embargo, hasta la fecha no hay estudios veterinarios prospectivos sobre los efectos a largo plazo de la gabapentina incluida en los protocolos analgésicos multimodales (Papich *et al.*, 2004, Sumano *et al.*, 2015 y Gustavsson *et al.*, 2012).

Se han publicado estudios de formulaciones de liberación modificada para el clorhidrato de tramadol donde se han utilizado diversidad de excipientes, por ejemplo, en una tesis se utilizó clorhidrato de tramadol con chitosan al 0.5%, también se utilizó carbopol 934-P al 0.7% y poloxámero 407 al 10%, siendo los resultados de esta tesis los siguientes: se alcanzaron concentraciones plasmáticas superiores a 12 h en las primeras 2 formulaciones y de hasta 24 h con la formulación que incluye poloxámero 407 (Riviere *et al.*, 2017, Katzung *et al.*, 2013 y Gaitán *et al.*, 2010).

Basado en estos resultados se decidió trabajar con el poloxámero 407, aumentando el porcentaje de la formulación con el fin de superar el tiempo del clorhidrato de tramadol en posteriores muestras, donde se corrobore a través de estudios de caracterización, tales como estudios de liberación, de reología y de correlación *in vitro-in vivo* que las concentraciones terapéuticas se mantienen en un tiempo superior al de los estudios previos referidos (Gaitán *et al.*, 2010).

### 1.1.1 MANEJO DEL DOLOR

La definición oficial de dolor por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) se refiere a una sensación desagradable que se asocia a un daño tisular, el cual desencadena el efecto de inflamación y manda señales al sistema nervioso central indicando el grado de daño hacia el tejido celular que este afectado por diversas causas provocando una sensación de malestar y de dolor, la cual es una experiencia individual única en humanos y animales (IASP, 2014). Es difícil apreciar cómo se sienten los animales, sin embargo, a través de la exploración física, de la signología y del comportamiento se puede conocer la causa que genera dicha sensación (Sumano *et al.*, 2015, Kögel *et al.*, 2014, Barter *et al.*, 2011 y Mathews *et al.*, 2014).

La manera de controlar el dolor es a través de la administración de analgésicos, fármacos que tienen el efecto de minimizar o eliminar de manera reversible la sensación de dolor de los pacientes (Kögel *et al.*, 2014, Barter *et al.*, 2011, Giral *et al.*, 2014, Taylor *et al.*, 2016., Wolfe *et al.*, 2015, Black *et al.*, 2010, Kilburn *et al.*, Souza *et al.*, 2012 y Baker *et al.*, 2011).

Existen diversos tipos de analgésicos que inhiben las prostaglandinas que generan el proceso de inflamación y asimismo el dolor, como es el caso de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), o que actúan a nivel del sistema nervioso central, siendo estos los opioides, así como los esteroides, glucocorticoides derivados del cortisol, que inhiben la inflamación y dolor (Giral *et al.*, 2014, Taylor *et al.*, 2016., Wolfe *et al.*, 2015, Black *et al.*, 2010, Kilburn *et al.*, Souza *et al.*, 2012 y Baker *et al.*, 2011 y Katzung *et al.*, 2013).

Dentro de los opioides, la buprenorfina y el tramadol se han utilizado recientemente debido a la seguridad que genera para el manejo del dolor leve, moderado y severo con mínimos

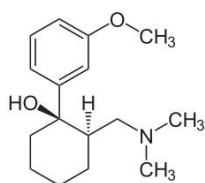


efectos adversos, mejorando así la calidad de vida del paciente (Plumb's, 2008, Subedi *et al.*, 2018., Sumano *et al.*, 2005, Kögel *et al.*, 2014 y Barter *et al.*, 2011).

Además del manejo del dolor, hay estudios recientes que recomiendan el uso del tramadol para uso post-operatorio (Vadivelu *et al.*, 2010).

Se ha reportado que uno de los efectos adversos de los opioides es la alteración de la respiración de los pacientes, por lo que a través de años de investigación los químicos y farmacólogos han diseñado y mejorado este tipo de analgésicos, logrando así generar dos opioides que tiene mínimo o nulo efecto adverso respiratorio y aun así logran minimizar el dolor de manera efectiva, siendo entre ellos, el clorhidrato de tramadol y la buprenorfina (Giral *et al.*, 2014, Taylor *et al.*, 2016., Wolfe *et al.*, 2015, Black *et al.*, Plumb's, 2008, Subedi *et al.*, 2018., Sumano *et al.*, 2005, Kögel *et al.*, 2014 y Barter *et al.*, 2011).

### 1.1.2 CLORHIDRATO DE TRAMADOL



**Figura 1 Estructura molecular del clorhidrato de tramadol**

El clorhidrato de tramadol [trans-(+/-)-2-[(dimetilmino) metil]-1-(3-met-oxifenil), ciclohexanol, clorhidrato (Fig.1)]

En cuanto a las características del tramadol se caracteriza por ser un polvo blanco cristalino amargo que tiene una solubilidad de 0.75 mg/mL, es soluble en agua y etanol, tiene un peso molecular de 263.19 g/mol y una detección ultravioleta en el espectrofotómetro de 272-279 nm. (Papich *et al.*, 2004, Villarejo *et al.*, 2000, Sumano *et al.*, 2015 y Vazzana *et al.*, 2015).

Papich y Kukanich (Papich *et al.*, 2004) refieren concentraciones terapéuticas del clorhidrato de tramadol de 0.5 – 1.7 h en el plasma de perros, siendo que a las 6 h se obtienen concentraciones máximas subterapéuticas, por lo que es necesario volver a dosificar 3 o 4

veces al día para cubrir con el perfil terapéutico (Papich *et al.*, 2004, Villarejo *et al.*, 2000, Plumb's, 2008 y Subedi *et al.*, 2018)

Por esta razón, el planteamiento de esta tesis fue obtener una formulación que mantuviera las concentraciones plasmáticas terapéuticas del tramadol por mayor tiempo en comparación con las establecidas con una formulación de liberación convencional de presentación comercial, siendo este tiempo un intervalo de 2 h – 6 h (Papich *et al.*, 2004), así una vez que se use en la clínica de pequeñas especies, el manejo del dolor en los pacientes no persista y tengan una favorable calidad de vida, el objetivo es evitar el dolor durante todo el proceso de la enfermedad (Papich *et al.*, 2004, Villarejo *et al.*, 2000, Plumb's, 2008, Subedi *et al.*, 2018, Sumano *et al.*, 2005 y Kögel *et al.*, 2014).

Los opioides son analgésicos potentes, tales como la morfina, el fentanilo, y el butorfanol, por mencionar algunos, pero tienen algunos efectos adversos: constipación, náusea, vómito y alteraciones respiratorias (Papich *et al.*, 2004, Villarejo *et al.*, 2000, Plumb's, 2008, Subedi *et al.*, 2018, Sumano *et al.*, 2005 y Kögel *et al.*, 2014). El tramadol es un opioide analgésico sintético de acción central y ha sido aprobado en algunos países desde 1980 y se ha convertido en el opioide recetado por todo el mundo (Khosrojerdi *et al.*, 2015).

La ventaja del tramadol es que sus efectos adversos son mínimos o nulos en comparación con los demás opioides, principalmente hablando del daño respiratorio, de esta manera se justifica el uso del tramadol a largo plazo para casos clínicos en pequeñas especies de hasta 14 días (Riviere *et al.*, 2017 y Katzung *et al.*, 2013).

Respecto a la farmacodinamia del tramadol se comercializa como una mezcla racémica de ambos estereoisómeros R y S, esto es porque los dos isómeros complementan la actividad analgésica del otro. El tramadol se metaboliza al O-desmetiltramadol (M1), una sustancia significativamente más potente que la morfina que también inhibe la recaptación de serotonina y norepinefrina, (Lagard *et al.*, 2016).

El tramadol es un débil agonista del receptor de opioides  $\mu$ ; inhibe la recaptación de norepinefrina y serotonina, estos efectos en las vías catecolaminérgicas centrales contribuyen significativamente a los efectos analgésicos del fármaco (Brayfield *et al.*, 2014, Raffa *et al.*, 2012., Reiman *et al.*, 1998, Stoelting *et al.*, 1999 y Khosrojerdi *et al.*, 2015).

El tramadol también exhibe actividad monoaminérgica, producida por la inhibición de la recaptación de norepinefrina y serotonina en uniones sinápticas. El tramadol es ampliamente metabolizado en el hígado por las vías hepáticas de O y N desmetilación catalizada por las isoenzimas 2D6, 2B6 y 3A4 del citocromo P-450, en ese orden (Emerson *et al.*, 1999). De estos, O-desmetiltramadol (M1) y N-desmetiltramadol (M2) son los principales metabolitos del tramadol en humanos, mientras que M1 y M2 pueden metabolizarse más a N,O-didesmetiltramadol (M5) y otros metabolitos en perros.

Entre los metabolitos de tramadol, M1 representa el metabolito activo primario; M5 también es un metabolito activo, pero tiene una actividad analgésica más débil en comparación con M1 (García-Quetglas *et al.*, 2007 y Wu *et al.*, 2002).

De acuerdo con lo que se establece por Papich & Kukanich las variables farmacocinéticas del tramadol en el perro a dosis de 5 mg/Kg SC en comparación con el gato y con el humano se muestran en el cuadro 1 (Papich *et al.*, 2004).

**Cuadro 1: Variables farmacocinéticas del tramadol por vía subcutánea en varias especies.**

<b>Tramadol</b>	Perro	Gato	Humano
Tiempo de vida media (h)	0.8 h	2.5 h	5-6 h
Cmax (mg/Kg)	11 mg/Kg	536 mg/Kg	1.4 mg/Kg
Volumen de distribución (L/Kg)	3 L/Kg	3 L/Kg	2.8-3.4 L/Kg
Depuración (mL/Kg/min)	55 mL/Kg/min	21 mL/Kg/min	0.35 mL/Kg/min

Considerando las variables farmacocinéticas en animales, se ha establecido que en la rata la vida media del tramadol es de aproximadamente 3 h (Khosrojerdi *et al.*, 2015). Mientras que las variables farmacocinéticas en perros, el tramadol tiene una biodisponibilidad de 65-70%

que se debe a su extenso metabolismo de primer paso, la biodisponibilidad aumenta a >90% con múltiples dosis. El gran volumen de distribución 3 L/Kg después de la administración oral sugiere su alta afinidad tisular (Khosrojerdi *et al.*, 2015).

En el presente trabajo la dosis por administrarse en el ratas y perros se basó del estudio de extrapolación de dosis *in vitro-in vivo* y de lo referido en el compendio del Doctor Plumb, siendo la dosis de 5 mg/Kg (Papich *et al.*, 2004 y Hartung *et al.*, 2018).

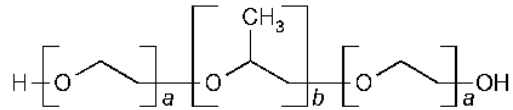
### **1.1.3 LIBERACIÓN MODIFICADA**

En el mercado farmacéutico tanto de medicina hecha para humanos como de medicina veterinaria, existen medicamentos de diversas formas farmacéuticas, siendo algunas de liberación modificada, de liberación inmediata, o bien, de liberación convencional, generalmente las que se son de liberación modificada son aquellas diseñadas de tal manera que se modifica la velocidad o el lugar de liberación del principio activo respecto a las formas farmacéuticas de liberación inmediata del mismo principio activo.

El término “liberación modificada” es el que emplean las farmacopeas europea y americana se refiere a las formas de acción prolongada, donde el principio activo se libera inicialmente en proporción suficiente para producir su efecto, y después se libera de forma lenta a una velocidad no necesariamente constante, manteniendo la concentración eficaz durante más tiempo que con las formas de liberación inmediata (Navarra *et al.*, 2005, Allen *et al.*, 2000).

### **1.1.4 POLOXÁMERO 407**

El poloxámero 407 (comercialmente conocido como Pluronic F 127 ®), es un copolímero en tribloque del tipo óxido de polietileno (porción hidrofílica), óxido de polipropileno (porción hidrofóbica) y óxido de polietileno (porción hidrofílica) que al estar en contacto con el agua forma un gel (Balakrishnan *et al.*, 2015, González *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2007, Yu *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2016).

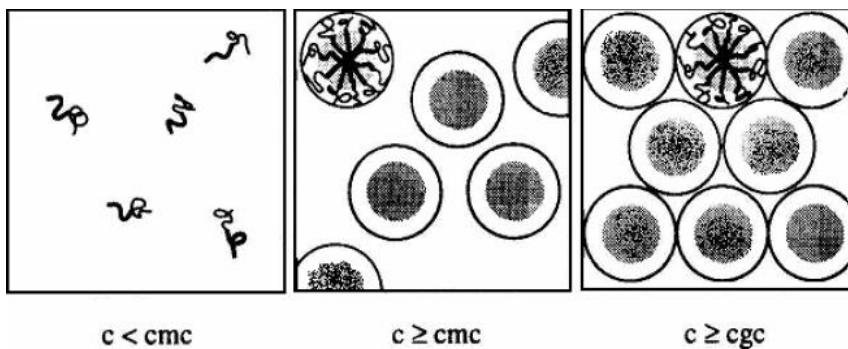


**Figura 2: Estructura molecular del poloxámero 407**

Los poloxámeros son tensoactivos no iónicos que se emplean en la industria farmacéutica como vehículos en diversas formulaciones farmacéuticas, así mismo, se emplea para la formación de presentaciones farmacéuticas en forma de geles termorreversibles que con base en artículos de investigación previos y en el experimento del presente trabajo se demostró que depende de la temperatura y la concentración, las formulaciones transicionan a la forma sol-gel, mientras que en temperaturas frías (generalmente <15°C) se mantienen en estado líquido, el cual es importante para su fácil administración subcutánea, la cual al aumentar la temperatura >30° comienza con esta transición sol-gel, esto varía dependiendo la relación de la temperatura con la concentración del poloxámero en la formulación (Wang *et al.*, 2016 y Peng *et al.*, 2016).

El poloxámero 407 (Pluronic F 127) proporciona al farmacólogo un excelente sistema de liberación del fármaco para ser utilizado por diferentes vías de administración, siendo oral, tópica, parenteral, etc. ya que es compatible con diferentes sustancias. El poloxámero a mayores concentraciones resulta en un agregado multi molecular de un núcleo hidrofóbico con cadenas de óxido de polipropileno y una corona hidrofílica (Peng *et al.*, 2016, Derakhshanden *et al.*, 2010, Maderuelo *et al.*, 2011, Mabrouk *et al.*, 2018, Escobar *et al.*, 2006).

La micelización ocurre únicamente en soluciones diluidas de bloques de copolímeros por encima de la Concentración Micelar Crítica a una temperatura dada. A concentraciones más altas por arriba de la Concentración Micelar Crítica del gel las micelas pueden agregarse dentro de una red (Mabrouk *et al.*, 2018, Yap *et al.*, 2016., Volkmer *et al.*, 2013).



**Figura 3: Esquematación de la concentración micelar crítica (cmc) y concentración crítica en gel (cgc) en una solución de bloques de copolímeros**

El poloxámero 407 en general tiene una baja concentración de  $10^4$ -  $10^5$  que forman micelas monomoleculares, pero a más altas concentraciones resultan en agregados multimoleculares que consisten en un centro hidrofóbico y una corona hidrofílica (Mendonca *et al.*, 2015, Guzmán *et al.*, 2009., Giorgi *et al.*, 2009, Matthew *et al.*, 2002, Escobar-Chávez *et al.*, 2006, Galgatte *et al.*, 2014 y Pereira *et al.*, 2013).

Considerando que el tiempo de vida media tan corto del tramadol, que es de 0.5-1.7 h, como lo refiere Papich & Kukanich, se puede modificar aumentando la exposición del fármaco y evitando la redosificación de mínimo 4 veces al día, para los casos de dolor leve-moderado agudo o crónico en pacientes que así lo requieran, para ello es necesario diseñar un sistema de liberación modificada que mantenga por mayor tiempo las concentraciones dentro de la ventana de margen terapéutico del fármaco (Papich *et al.*, 2004, Escobar-Chávez *et al.*, 2006, Galgatte *et al.*, 2014 y Pereira *et al.*, 2013).

Las ventajas de la liberación modificada son: facilitar el manejo en pacientes, reducir la frecuencia de dosificación diaria, cumplir con el tratamiento sin depender del propietario y obtener una eficacia de analgesia por mayor tiempo en pacientes con dolor; estas características son proporcionadas por la adición del poloxámero 407 (Mendonca *et al.*, 2015, Guzmán *et al.*, 2009 y Giorgi *et al.*, 2009).

En este trabajo de investigación se trabajó con una formulación que contiene clorhidrato de tramadol con poloxámero, la cual por debajo de una temperatura y una concentración se encuentran en estado líquido y conforme aumenta la concentración y la temperatura se da su transición sol-gel, alcanzando así la denominada Temperatura Micelar Crítica, lo que

permitió que las disoluciones acuosas tengan la capacidad de autoorganización en forma de micelas por encima de la Concentración Micelar Crítica y de la Temperatura Micelar Crítica, logrando obtener estructuras de tipo gel, lo que permite la prolongación de liberación del fármaco dentro del diseño de dicha formulación (Deore *et al.*, 2010, Subramanian *et al.*, 2012, Arjunan *et al.*, 2014, Mayol *et al.*, 2010, Guzmán *et al.*, 1994).

### 1.1.5 REOLOGÍA

La reología es la ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia, concepto propuesto por el profesor Bingham Lafayette. Las mediciones reológicas son útiles porque proporcionan información sobre la estructura y las interacciones de los componentes de un sólido o un líquido. Además, existen modelos reológicos que se utilizan para relacionar las propiedades mecánicas más importantes como: viscosidad aparente (relación entre fuerza y velocidad de corte), viscosidad compleja (respuesta ante la fuerza de corte, de corte oscilatorio), módulo de almacenamiento y módulo de pérdida (comportamiento viscoelástico lineal). Las propiedades reológicas se definen a partir de la relación existente entre fuerza o sistema de fuerzas externar y su respuesta, ya sea como deformación o flujo. Todo fluido se va a deformar en mayor o menor medida al someterse a un sistema de fuerzas externas.

Para poder caracterizar el comportamiento reológico de un material es necesario definir algunos términos (Balakrishna *et al.*, 2015, Goodwyn *et al.*, 2008, Barnes *et al.*, 2000, Calderas *et al.*, 2016, Silbelberg *et al.*, 1977).

#### **Tipos de fluidos:**

**Fluidos no newtonianos:** la viscosidad depende de la naturaleza de las fases continua y dispersa, las interacciones partícula-partícula y partícula-solvente, la concentración de partículas, su forma, tamaño y composición química. Estos fluidos pueden subdividirse en dos grupos principales, dependientes e independientes del tiempo.

De igual manera, los fluidos no newtonianos son aquellos que exhiben flujo uniforme, pero la relación entre el esfuerzo cortante y velocidad de deformación no es lineal. Son generalmente complejos y constan de más de una fase, aunque las disoluciones de polímero puedan considerarse como fases únicas. Una de las fases es continua y la otra dispersa. La reología de un sistema disperso depende de las propiedades de la fase continua, las de la fase

dispersa y la interacción entre ambas. En la fase continua son de interés la viscosidad, la composición química, el pH y la concentración de electrolitos. En la fase dispersa, que puede ser líquida o sólida, la concentración en volumen, la viscosidad, el tamaño de partícula, la forma, la distribución por tamaños y la composición química (Balakrishna *et al.*, 2015, Goodwyn *et al.*, 2008, Barnes *et al.*, 2000, Calderas *et al.*, 2016, Silbelberg *et al.*, 1977).

Fluidos no newtonianos que presentan adelgazamiento al flujo (Shear-thinning): En los fluidos del tipo de adelgazamiento al flujo (Pseudoplásticos) la viscosidad aparente depende de la velocidad de deformación por cizalla, pero no del tiempo durante el que están sometidos a la tensión cizallante; es decir, el aumento de la velocidad de deformación disminuye la fricción entre las capas del fluido. El esfuerzo causa un desorden, las moléculas de cadena larga se orientan y llegan a alinearse al flujo, lo que da la reducción de la viscosidad. Este comportamiento es el tipo más común de los fluidos no newtonianos. Las soluciones poliméricas tienen un comportamiento pseudoplástico que depende fuertemente de la concentración de la solución. Para sistemas diluidos, el comportamiento pseudoplástico puede deberse a la orientación del flujo de las partículas o el cambio en la conformación de las moléculas poliméricas. Así, cuando la velocidad de deformación es mayor que la velocidad de la reorientación térmica de las partículas, estas serán alineadas en dirección al flujo. Para sistemas concentrados, el comportamiento pseudoplástico aparece cuando la velocidad de deformación es mayor que la velocidad para alcanzar el equilibrio de las partículas (Balakrishna *et al.*, 2015, Goodwyn *et al.*, 2008, Barnes *et al.*, 2000, Calderas *et al.*, 2016, Silbelberg *et al.*, 1977).

**Fluidos newtoniano:** Se definen como aquellos para los que la representación del esfuerzo cortante en función de la velocidad de deformación es una línea recta. La mayoría de los gases y fluidos simples, como el agua, presentan este comportamiento.

**Fluidos viscoelásticos:** Son aquellos que exhiben simultáneamente las propiedades viscosas propias de un líquido y las elásticas características de un sólido; en general, los fluidos biológicos se caracterizan por tener estas características.

**Velocidad de deformación y flujo:** Cuando un fluido es estudiado por la aplicación de un esfuerzo, un movimiento se genera hasta que el esfuerzo es removido. Consideremos dos superficies separadas por una pequeña abertura en la cual se mantiene un líquido. Un esfuerzo



cortante debe mantenerse en la superficie para que ella se mueva a una velocidad constante, “ $v$ ”. Este esfuerzo de barrido producirá un cambio continuo en la velocidad a través de la abertura hasta llegar a ser cero para superficie más baja (Goodwin *et al.*, 2008). Ahora, en cada segundo los desplazamientos producidos están en  $X$  y la deformación está dada por  $Y$ .

Podemos describir la velocidad de deformación como:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{v}{z}$$

**Velocidad de deformación, gradiente de velocidad y velocidad cortante:** son utilizados como sinónimos y se emplea para indicar el operador diferencial con respecto al tiempo. Para grandes aberturas la velocidad de deformación variará a través de la abertura.

**Viscosidad:** Se define como una medida de la resistencia a la deformación del fluido. La Ley de Newton relaciona el esfuerzo cortante (tensión de cizalla) con la velocidad de deformación (gradiente de velocidad o intensidad de cizalla), y puede expresarse en una dimensión como:

$$\sigma = \mu \cdot \gamma$$

Dónde:

$\sigma$  = Esfuerzo constante (Pa)

$\mu$  = Viscosidad dinámica o absoluta (Pa.s)

$\gamma$  = Velocidad de deformación ( $s^{-1}$ )

El esfuerzo cortante se representa también por  $\tau$ , el cual es proporcional al gradiente de velocidad o velocidad de deformación. La constante de proporcionalidad:  $\mu$  es llamada viscosidad aparente para fluidos no newtonianos ya que varía en función de la velocidad de deformación. La viscosidad de los materiales reales puede ser significativamente afectada por variables como la rapidez de deformación, la temperatura, presión y el tiempo. Para un fluido newtoniano el parámetro  $\mu$  es una constante en la ecuación. Generalmente el comportamiento de los materiales es de tipo no-newtoniano, por lo cual se utiliza el concepto de viscosidad aparente o cortante (Balakrishna *et al.*, 2015, Goodwin *et al.*, 2008, Barnes *et al.*, 2000, Calderas *et al.*, 2016, Silbelberg *et al.*, 1977).

En los experimentos de viscosidad, la rapidez de deformación se determina con la magnitud de la deformación dividida por el tiempo que está tarda en producirse y se expresa en términos de  $s^{-1}$ . La ecuación reológica de estado de los fluidos establece la relación entre la tensión y la rapidez de deformación. Así, para una velocidad dada, la fuerza resultante se incrementa cuando la viscosidad aumenta; mientras que, para una fuerza dada, la velocidad es reducida cuando la viscosidad se eleva (Silberberg *et al.*, 1977, De Larrad *et al.* 1999).

**Fluidos poliméricos:** están formados por macromoléculas que adoptan una conformación determinada dependiendo de su estructura molecular, del tipo de flujo y de las interacciones con las otras moléculas. Los dos tipos principales de flujos son el flujo cortante y el flujo extensional. El flujo cortante tiene una familia de superficies materiales (superficie de corte) que se mueven isométricamente, esto es que la distancia entre dos partículas en la superficie es constante y el volumen de cada elemento del fluido es constante (Silberberg *et al.*, 1977, De Larrad *et al.* 1999).

#### 1.1.6 MODELO MATEMÁTICO CORRELACIÓN *IN VIVO-IN VITRO*

Se han empleado modelos matemáticos de correlación in vitro-in vivo (IVIVC), siendo así el establecimiento de un modelo matemático predictivo que describe la relación entre una característica del perfil de liberación in vitro y una respuesta in vivo, esta correlación puede ser una valiosa herramienta en el diseño de medicamentos, es parte integral de los procesos de investigación y desarrollo de fármacos (Emami, *et al.*, 2006, Dighe *et al.*, 1994, Rojas, *et al.*, 2015).

Existen modelos matemáticos, tales como los reportados en este trabajo que pueden predecir con exactitud el comportamiento *in vivo* de los medicamentos a partir de observaciones *in vitro*, así como sus aplicaciones útiles en áreas que incluyen: la valoración de las propiedades farmacocinéticas, el aseguramiento de la calidad en programas de farmacovigilancia y el control de calidad durante el desarrollo industrial de una formulación (Rojas, *et al.*, 2015, Emami, *et al.*, 2006).

La correlación se define, según la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU (FDA), como el modelo matemático que describe la dependencia entre el comportamiento in vitro de una propiedad o cualidad y la medida de la intensidad de una respuesta in vivo, tal que ésta sea relevante para el fármaco en estudio. La propiedad de los medicamentos sólidos, comúnmente aplicada in vitro en investigación y desarrollo y pruebas de calidad, es la tasa de disolución o de liberación del fármaco de la forma farmacéutica; mientras que la respuesta in vivo a correlacionar es la concentración o cantidad absorbida que llega al plasma en la unidad de tiempo . De esta manera, con una IVIVC con base en pruebas de disolución, es posible predecir el comportamiento in vivo de algunos fármacos (Emami, *et al.*, 2006, Dighe *et al.*, 1994 y Grundy *et al.*, 1997, Rojas, *et al.*, 2015).

Si bien se reconoce que existen correlaciones entre la disolución in vitro y la absorción in vivo, se ha avanzado poco en el desarrollo de modelos integrales que comprendan la valoración de propiedades complementarias, de tal forma que mejoren la capacidad predictiva de los métodos in vitro. Lo anterior es necesario si se tienen en cuenta los factores físicos, químicos y biológicos que contribuyen tanto al proceso de disolución como al de absorción. Entre los factores se señalan las propiedades fisicoquímicas del fármaco, las propiedades biofarmacéuticas del medicamento y las características fisiológicas de las vías de absorción en el paciente. La solubilidad a su vez, está determinada por factores como el estado de ionización del fármaco, que cualifica diferentes propiedades de los compuestos, según las diferentes condiciones de pH en el sitio de disolución (Emami, *et al.*, 2006, Dighe *et al.*, 1994, Rojas, *et al.*, 2015).

La USP y la FDA proponen cada una su definición de correlación *in vivo-in vitro*. (Dighe *et al.*, 1994 y Grundy *et al.*, 1997).

- *USP*: El establecimiento de una relación entre una propiedad biológica o un parámetro derivado de una propiedad biológica producida por una forma dosificada, y una característica fisicoquímica de la misma forma dosificada.
- *FDA*. Mostrar una relación entre 2 parámetros. Típicamente se obtiene una relación entre la velocidad de disolución *in vitro* y la velocidad de entrada *in vivo*.

Para predecir la biodisponibilidad y bioequivalencia y de evaluar la variabilidad en cuanto a características de liberación de los productos se han realizado estudios de disolución y relación *in vivo-in vitro*, tales como la prueba físico-química, siendo de las más usadas para estimar la liberación del principio activo a partir de la forma dosificada, debido a la estrecha relación existente entre la velocidad de disolución del fármaco *in vitro* y la absorción *in vivo*, considerando así, el estudio de disolución como el criterio necesario y suficiente para permitir la comercialización de un producto (Carrión *et al.*, 1999, Dighe *et al.*, 1994 y Grundy *et al.*, 1997).

A partir de estas definiciones y de la experiencia acumulada por muchos investigadores que han trabajado desde principios de la década de 1960 sobre este tema, se ha dividido la manera de obtener correlaciones en 3 niveles en orden descendiente según su capacidad para predecir la curva plasmática completa que resultará de la administración de una forma dosificada dada (Carrion *et al.*, 1999, Dighe *et al.*, 1994, Grundy *et al.*, Cardot *et al.*, 1993).

A continuación, se definen los 3 niveles propuestos:

*Nivel A.* Relación punto a punto entre la disolución *in vitro* y la velocidad de entrada *in vivo* del fármaco a partir de la forma dosificada (Carrion *et al.*, 1999, Dighe *et al.*, 1994, Grundy *et al.*, Cardot *et al.*, 1993).

*Nivel B.* Utiliza los principios del análisis de momentos estadísticos. Se compara el tiempo medio de disolución *in vitro* (MDT) con el tiempo medio de residencia (MRT) (Carrion *et al.*, 1999, Dighe *et al.*, 1994, Grundy *et al.*, Cardot *et al.*, 1993).

*Nivel C.* Esta categoría relaciona un punto de tiempo de disolución y un parámetro farmacocinético como AUC, Cmax y Tmax (Carrion *et al.*, 1999, Dighe *et al.*, 1994, Grundy *et al.*, Cardot *et al.*, 1993).

Los objetivos de la correlación *in vivo-in vitro* independientemente del nivel de correlación que se obtenga, se persigue, en primer lugar, obtener una prueba de disolución.

Independientemente del nivel de correlación, se obtendrá una prueba de disolución que sirva como sustituto del estudio de bioequivalencia durante el escalado o cambios en el sitio de

manufactura y equipos, y, en segundo lugar, ajustar especificaciones de disolución para cada formulación en particular (Siewert *et al.*, 1995).

Con el método de disolución escogido y los datos obtenidos en los estudios de bioequivalencia y biodisponibilidad se obtienen las especificaciones de disolución *in vitro* que no es más que un intervalo de valores de porcentaje disuelto *in vitro*, en el cual puede moverse una formulación y aun así resultar bioequivalentes (Shah *et al.*, 1992).

La extrapolación cuantitativa *in vivo-in vitro* (IVIV) se considera en general un prerrequisito para conocer los hallazgos hacia un paradigma de dosis administrado *in vivo*.

La calidad y la relevancia de los sistemas celulares son el primer requisito previo para el estudio de correlación IVIV (Skelly *et al.*, 1990).

## 2. JUSTIFICACIÓN

En el presente proyecto se eligió el clorhidrato de tramadol para realizar pruebas *in vitro*, (de liberación, de reología y de deformación termoelástica, así como de modelos matemáticos de correlación *in vitro-in vivo*) para predecir la farmacocinética a través de variables farmacocinéticas en ratas y perros.

En general, a pesar del interés entre los médicos veterinarios para el uso del tramadol, hay pocos datos de estudios experimentales y clínicos para apoyar la administración de tramadol en perros para tratar condiciones dolorosas debido al tiempo de vida media tan corto (Papich *et al.*, 2004, Villarejo *et al.*, 2000, Plumb's *et al.*, 2008 y Subedi *et al.*, 2018).

Los efectos secundarios, tales como, gastroenteritis hemorrágica y/o daño renal se debe a la administración de los antiinflamatorios no esteroidales, mientras que, diversos artículos sugieren al tramadol, perteneciente al grupo de los opioides, como una molécula potencial para la terapia crónica y a largo plazo de dolor en animales por sus mínimos efectos adversos efectuados en comparación con los antiinflamatorios no esteroidales (Riviere *et al.*, 2017 y Katzung *et al.*, 2013).

Anteriormente se realizó un estudio donde a través de pruebas *in vitro* se comprobó el tiempo de vida media de las formulaciones diseñadas del tramadol considerando los siguientes excipientes:

- Chitosan al 0.5% → obtuvo un tiempo de vida media de 12 h
- Carbopol 934-P al 0.7% → obtuvo un tiempo de vida media de 12 h
- Poloxámero 407 al 10% → obtuvo un tiempo de vida media de 24 h

En esta tesis se diseñaron formulados de liberación modificada de Tramadol con la administración de poloxámero en diferentes concentraciones hasta lograr una liberación *in vitro* por un tiempo mayor a 24 horas.

### **3. HIPÓTESIS**

Las formulaciones desarrolladas de Tramadol con la adición del poloxámero 407 al 10%, 14%, 17% y 20%, nos permitirá una liberación *in vitro* del principio activo por un tiempo mayor a 24 h, superando el tiempo de liberación del producto comercial, modificará la viscosidad del formulado y la correlación *in vitro-in vivo*, con respecto al producto comercial y al formulado de tramadol sin la adición de poloxámero.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Diseñar, desarrollar, caracterizar y evaluar cuatro formulaciones líquidas de clorhidrato tramadol en presentación líquida, donde utilizando poloxámero 407 en varias concentraciones se va a lograr obtener una liberación prolongada de más de 24 horas en comparación con el producto comercial y con la formulación del clorhidrato de tramadol sin adición poloxámero 407 a través de estudios *in vitro*, con lo cual se logrará contar con un analgésico de liberación prolongada estos estudios serán la base para estudios posteriores *in vivo* en perros.



## 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar, caracterizar (determinar propiedades físico-químicas) y evaluar formulaciones líquidas de tramadol con poloxámero 407 a concentraciones del 10%, 14%, 17% y 20% con el fin de obtener la liberación *in vitro* del principio activo por mayor tiempo, en comparación con el producto comercial y la formulación de tramadol sin adición del poloxámero 407.
2. Comparar las concentraciones de clorhidrato de tramadol liberadas de la formulación comercial con la adición del poloxámero 407, para conocer el tiempo que permanecen en plasma sanguíneo y compararlos con las concentraciones de la formulación comercial y la formulación sin adición del poloxámero 407.
3. Evaluar la viscosidad a través de estudios de reología las formulaciones diseñadas, con el fin de corroborar la transición de líquido a sol-gel de las formulaciones respecto a las temperaturas manejadas a través del reómetro
4. Evaluar a través de un modelo matemático la correlación *in vivo-in vitro* de las formulaciones diseñadas con el fin de conocer el comportamiento farmacocinético

## **6. MATERIALES Y METODOLOGÍA**

### **6.1 AREA DE ESTUDIO**

El diseño de las formulaciones y el estudio de liberación con el uso del dispositivo Float-A-Lizer para diálisis con membranas de 50 kDa y sin el uso de estas membranas se llevó a cabo en el Laboratorio 2207, a cargo de la Dra. Sara Caballero Chacón, ubicado en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, así como en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, desde agosto del 2017 hasta noviembre de 2018.

El estudio reológico se realizó en el Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, desde enero del 2019 a julio del 2019.

El cálculo de las variables farmacocinéticas se realizó en un periodo de marzo a abril del 2021.

### **6.2 MATERIALES**

El clorhidrato de tramadol fue donado por PISA Agropecuaria SA de CV (México).

El poloxámero 407 conocido comercialmente como Pluronic F127 y la solución de HEPES fue adquirido de Sigma Aldrich (México).

### **6.3 EQUIPO**

En este estudio se utilizó una incubadora con agitación, modelo: ES-60/ES-60 + /ES-60E, número de serie: MU36SM, ubicada en el Laboratorio 2207, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta incubadora se configuró para proporcionar una temperatura de 38°C, al cerrarse las muestras se agitaron a 100 rpm durante 72 h.

Dispositivo Float-A-Lizer para diálisis de 50 kDa fue adquirido a través de IBI Scientific® membrana sintética sin metales pesados. La geometría tubo cilíndrico impide la dilución de la muestra proporciona un acceso abierto para la recuperación de volumen total con una pipeta. Sólo el Dispositivo Float-A-Lyzer® G2 asegura una recuperación de la muestra 95-98% mientras se mantiene 99% de pureza de la muestra y <1% de dilución de la muestra.

Equipo espectrofotómetro S2000, fuente de luz de tungsteno DT-1000CE-BT (Ocean Optics, Inc, USA) con una celda de cuarzo óptico de 10 mm, ubicado en la Facultad de Química, edificio F, área de Tecnología Farmacéutica, Universidad Nacional Autónoma de México. La obtención de un espectro requiere medir manualmente la transmitancia (Ley de Beer-Lambert) de la muestra y el disolvente simultáneamente.

Un reómetro de esfuerzos controlados Discovery HR-3 (TA-Instrumentos) Geometría de esfuerzos controlados: cilindros concéntricos, ubicado en la Facultad de Química, edificio F, área de Tecnología Farmacéutica, Universidad Nacional Autónoma de México.

Las soluciones se probaron bajo barridos de tiempo viscoelásticos lineales con aplicación simultánea de ultrasonidos para monitorear el proceso de gelificación. El gel resultante se caracterizó mediante barridos de frecuencia oscilatoria lineal y pruebas de relajación de esfuerzos a diferentes temperaturas (25°C, 38°C y 45°C).

#### **6.4 MÉTODO EXPERIMENTAL**

Para la preparación de la formulación con Pluronic 407 (F127), se prepararon un total de 6 formulaciones: a partir de la primera formulación. Se pesaron 5 g de tramadol en una balanza analítica, luego se añadió a un vaso de precipitado de 100 mL en el que se añadieron también 20 mL de agua desionizada, luego se pesaron 10 g de poloxámero 407 (Pluronic F127) y se vertieron cuidadosamente en la solución mientras se agitaba con un agitador magnético, además, se agregaba agua desionizada para llegar a una solución de 100 mL, considerando que esto se realizó a temperatura fría refiriéndose al “método frío”, siendo una temperatura < 15°C (Matthew *et al.*, 2002).

Se realizó el mismo procedimiento con el resto de las formulaciones, incluyendo en su respectivo caso 14 g del polímero para referir 14%, 17 g para el 17% y 20 g para el 20%; estas formulaciones fueron diseñadas por la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## 6.5 TÉCNICA ESPECTROSCÓPICA

La curva estándar del clorhidrato de tramadol se preparó con concentraciones de 0.001 a 0.15 mg/mL en solución buffer HEPES, la cual tiene un pH de 7.4.

Se analizaron las muestras obtenidas del estudio de liberación in vitro de cada formulación:

**Cuadro 2: Nomenclatura de las formulaciones diseñadas en este trabajo**

NOMBRE DE LA FORMULACIÓN	CONCENTRACIÓN DEL TRAMADOL	CONCENTRACIÓN DEL POLOXAMERO 407
TP10	5%	10%
TP14	5%	14%
TP17	5%	17%
TP20	5%	20%
TF	5%	Sin adición
CF	5%	Presentación comercial

(TP10, TP14, TP17, TP20, TF y CF) con y sin el uso del Dispositivo Float-A-Lizer para diálisis de 50 kDa, mediante el espectrofotómetro S2000 (Ocean Optic, Inc. USA). La absorbancia se midió en una longitud de onda de 273.13 nm.

## 6.6 LIBERACIÓN *IN VITRO* CON MEMBRANAS DE 50 kDa

Con base en la técnica de (Xu *et al.*, 2012), se utilizaron dispositivos Float-A-Lizer con membranas de 50 kDa (Sigma Aldrich ®), agregando 0.5 mL de cada formulación que contenía 5% de clorhidrato de tramadol con poloxámero al 10%, 14%, 17% y 20% denominado en el presente trabajo como TP10, TP14, TP17 y TP20, respectivamente, además de la formulación sin adición del poloxámero denominada FT y la formulación comercial, siendo esta última FC, respectivamente.

El medio de liberación se introdujo en un vaso de precipitados con 333 mL de solución Buffer HEPES con un pH de 7.4 a una temperatura de 38°C con una agitación de 100 rpm, luego se tomaron 3 mL de cada formulación en tiempos específicos que debieron haber sido liberados en la solución Buffer HEPES con un pH de 7.4.

Los tiempos de muestreo fueron:

0.25 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h y 72 h. A medida que se iban obteniendo cada una de las muestras, se añadieron 3 mL al medio de solución buffer de HEPES con un pH de 7.4.

Para las pruebas de liberación de cada formulación se utilizó un dispositivo Float-A-Lizer para diálisis con un tamaño de poro de 50 kDa con sus respectivas repeticiones, considerando la muestra de referencia sin la adición de poloxámero (FT) y el producto comercial (FC), que presenta una liberación inmediata o convencional.

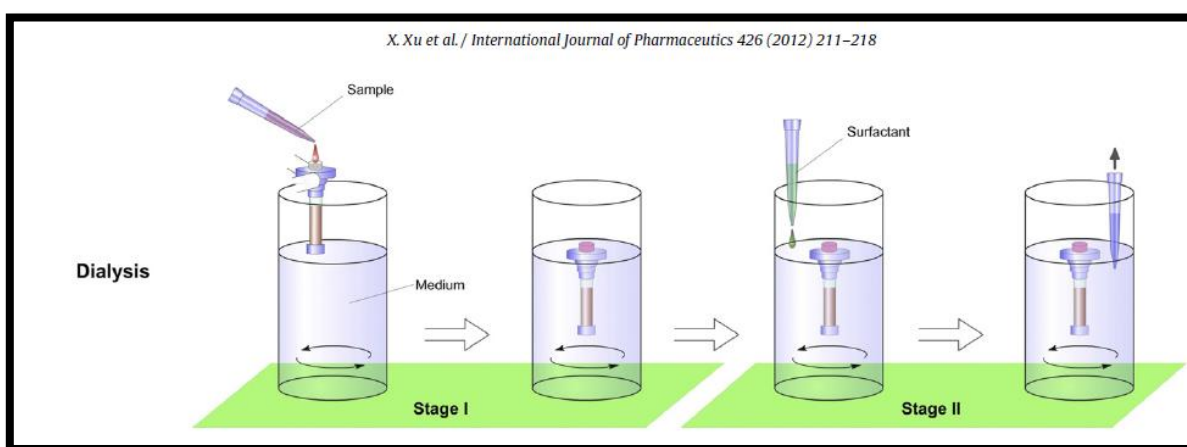


FIGURA 4: Esquematación de las pruebas de liberación con los Dispositivos Float-A-Lizer®

## 6.7 LIBERACIÓN IN VITRO SIN USO DE MEMBRANAS

Basado en la técnica de (Marcos *et al.*, 2016) 0.5 mL de cada formulación (TP10, TP14, TP17, TP20, TF y CF) fueron contenidas en vasos de precipitados de 5 mL. El medio de liberación fue de 3 mL de solución buffer HEPES con un pH de 7.4 a temperatura de 38°C, con una agitación de 100 rpm, posteriormente se administraron 3 mL de cada formulación fueron tomados en tiempos específicos, en el cual se liberó el principio activo en el medio de solución buffer HEPES. Los tiempos de muestreo fueron: 0.25 h, 0.5 h, 1 hora, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h y 72 h.

## **6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El porcentaje liberado del clorhidrato de tramadol está reportado a través del promedio y la desviación estándar de las formulaciones TP10, TP14, TP17, TP20, FT y FC se realizó la prueba de ANOVA para ver si había diferencias significativas entre los grupos. Las diferencias específicas entre los grupos fueron obtenidas mediante la prueba de Tukey. Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente con el software JMP ®.

La normalidad de los datos se determinó a través de la prueba de Shapiro-Wilks y la homogeneidad de las variaciones por la prueba de Levene.

## **6.9 ESTUDIO DE DEFORMACIÓN DEL POLÍMERO (FLUJO A CIZALLA SIMPLE)**

Las mediciones de flujo a cizalla simple fueron determinadas a temperaturas de 25°C, 38°C y 45°C con una velocidad de corte de 0.1 a 1000 s<sup>-1</sup>. Para este caso, se utilizó una geometría cilíndrica concéntrica de aluminio (Con un diámetro de 20.38 mm; el diámetro de un cilindro externo de 21.96 mm y una longitud de 59.5 mm) fueron usados para las muestras de las diferentes formulaciones.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE LIBERACIÓN

La gráfica 1 muestra el análisis de espectroscopía de la curva de calibración del estándar del clorhidrato de tramadol, con un coeficiente de correlación de 0.9995.

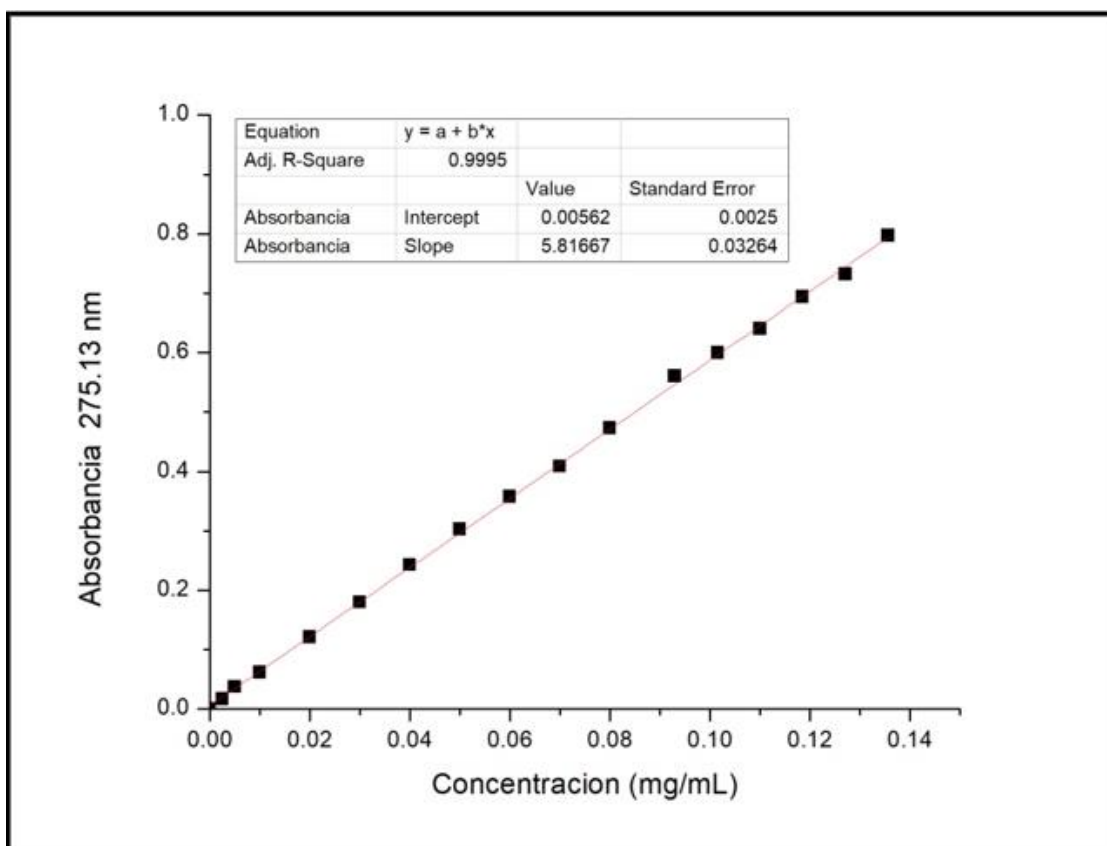
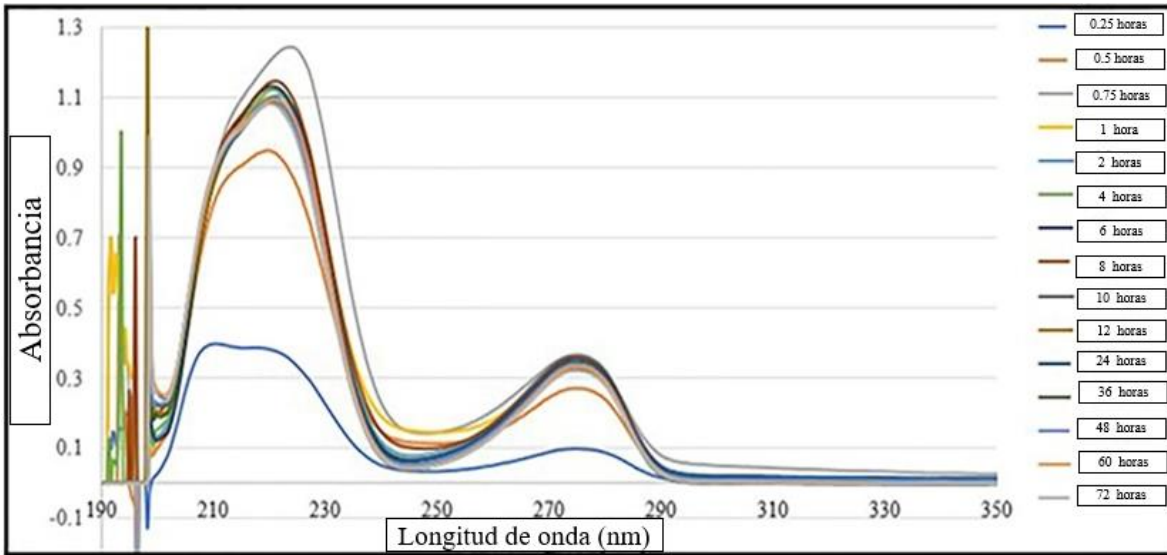


Gráfico 1: Curva de calibración del clorhidrato de tramadol en solución HEPES Buffer con un pH de 7.4

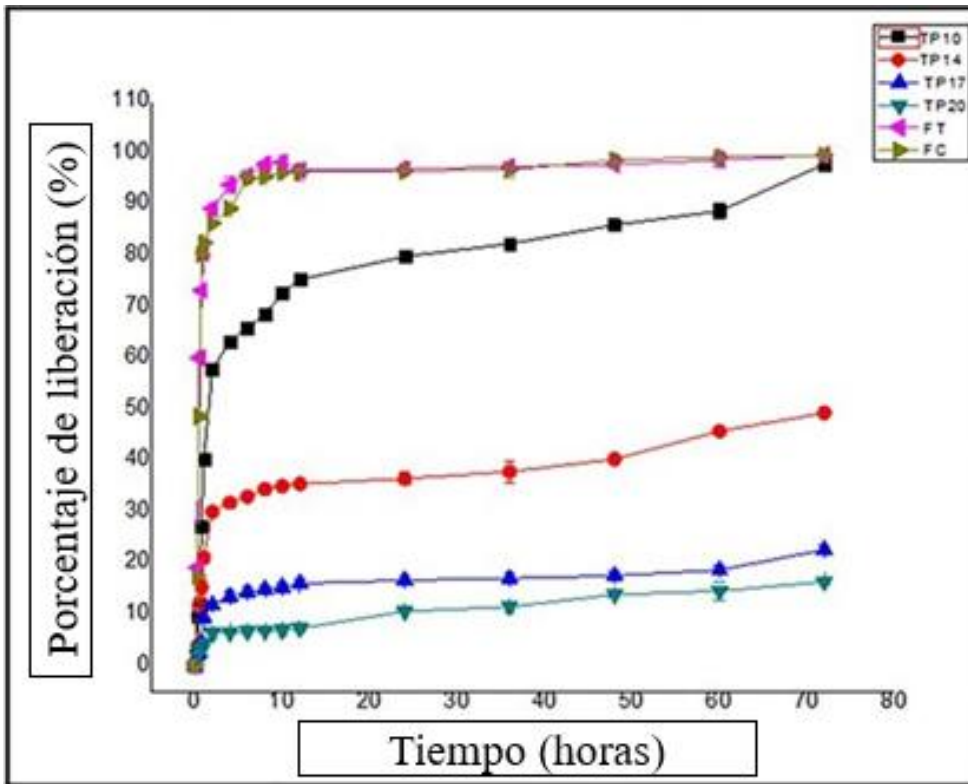
La gráfica 2 presenta el espectro UV del principio activo, el clorhidrato de tramadol, en su medio de dispersión, agua desionizada.



**Gráfica 2: Espectro del clorhidrato de tramadol.** Se muestran el espectro de las absorbancias obtenidas del clorhidrato de tramadol en agua desionizada a diferentes tiempos.

En la gráfica 3 se representa la liberación efectuada con una membrana de diálisis de 50 kDa, las formulaciones denominadas TP20 y TP17 liberaron del 10 al 20% del clorhidrato de tramadol aproximadamente en ese lapso de 72 h, mientras que la formulación TP 14 liberó un 40% del clorhidrato del tramadol en 72 h y la formulación TP10% liberó del 70-80 % en 72 h en comparación con la formulación del tramadol (FT) sin adición del poloxámero y la formulación comercial del tramadol (FC) que alcanzaron del 90-100 % en 4 h.





**Gráfica 3: Liberación de la concentración del clorhidrato de tramadol en porcentaje utilizando una membrana de diálisis de 50 kDa.** Se representa el promedio con su respectiva desviación estándar de la liberación de las formulaciones del clorhidrato de tramadol con poloxámero 407, siendo estas representadas como TP10, TP14, TP17, TP20, FT y FC.

Posteriormente, en el cuadro 3 se muestra el análisis estadístico de las diferentes concentraciones del poloxámero 407: TP10, TP14, TP17, TP20, FT y FC considerando los horarios de muestreo. Estadísticamente hay una diferencia significativa entre la formulación del producto comercial con la formulación TP10 y TP14, así como hay una diferencia significativa entre la formulación TP10 y TP14 con la formulación TP17 y TP20 ( $P < 0.05$ ) a través del programa JMP®.

El grupo A se refiere a la formulación control (a la cual no se le adicionó poloxámero) y la formulación del producto comercial no tienen diferencia significativa, lo mismo ocurre con el grupo D, el cual incluye las formulaciones con poloxámero de 17% y 20%, siendo que entre estas formulaciones no se presenta diferencia significativa, mientras tanto, las únicas formulaciones con diferencia significativa comparada con el resto de las formulaciones son las correspondientes a las concentraciones de 10% y 14%, nombradas como grupo B y grupo C.

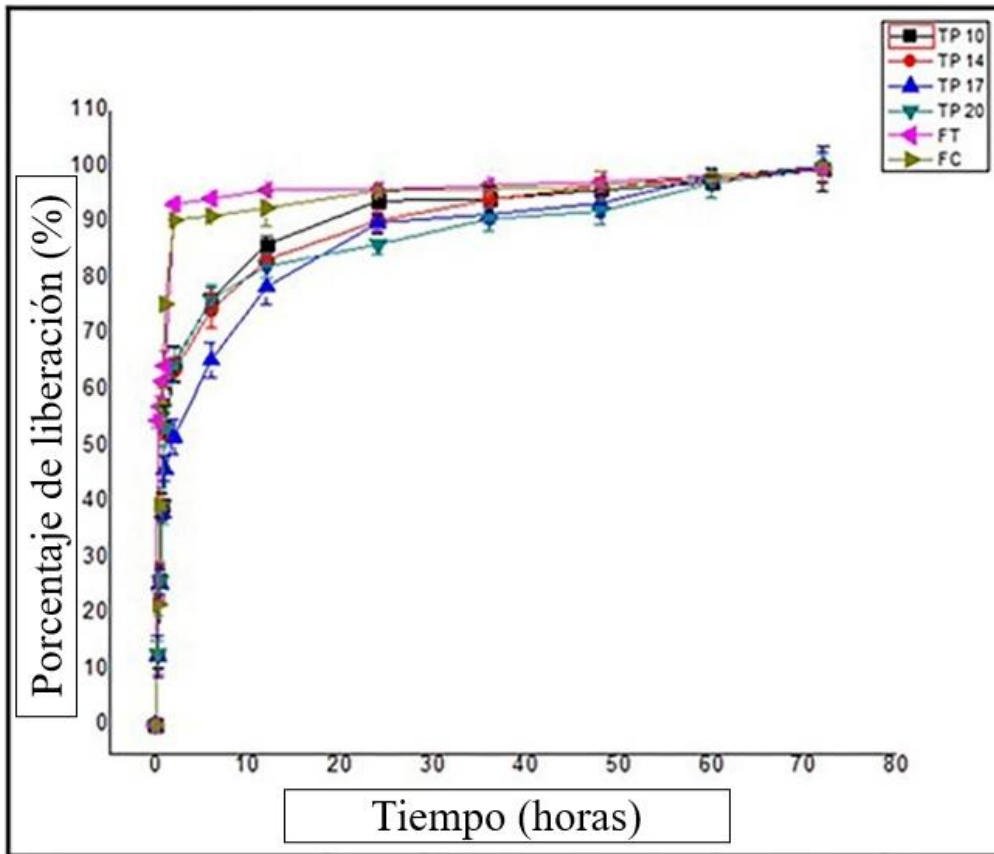
**Cuadro 3: Análisis estadístico a través de las pruebas de liberación con el uso de membranas de diálisis de 50 kDa.**

TRATAMIENTO	Comparación entre grupos
CF	A
TF	A
TP10	B
TP14	C
TP17	D
TP20	D

En el análisis estadístico se determinó el porcentaje liberado del clorhidrato de tramadol es reportado a través del promedio y la desviación estándar de las formulaciones TP10, TP14, TP17 y TP20. Mientras que a través de una prueba de Tukey las diferencias entre los valores promedio de las diferentes concentraciones del poloxámero en las formulaciones del tramadol, 10%, 14%, 17%, 20%, FT y FC, donde se utilizó una membrana de diálisis de 50 kDa con una diferencia significativa de  $P < 0.05$  a través del programa JMP ®.

En la gráfica 4 se muestran los resultados de la liberación del tramadol, esta vez no se utilizaron membranas de diálisis, fue a través de la obtención de la superficie, estas muestras fueron tomadas de la misma manera que con el uso de membranas de diálisis de 50 kDa, de las mismas formulaciones: TP10, TP14, TP17, TP20, FT Y FC los mismos tiempos que se han mencionado anteriormente, siendo del 10%, 14%, 17% y 20%, formulación de tramadol sin adición del poloxámero y la formulación del producto comercial.

Basándose en los resultados de la gráfica 4, la concentración liberada del clorhidrato de tramadol en porcentajes sin el uso de las membranas de diálisis nos muestra que la concentración del poloxámero es inversamente proporcional al porcentaje de liberación de cada formulación. TP10, TP14, TP17 y TP20 mostraron una liberación del 98%, 50%, 23% y 16% respectivamente a las 72 h en comparación con las formulaciones del tramadol sin adición del poloxámero y la formulación comercial, mismas que representaron en los resultados, una liberación cercana al 99% a las 24 h de muestreo.



**Gráfica 4: Liberación del clorhidrato de tramadol en porcentaje sin el uso de membranas.** Se representa el promedio con su respectiva desviación estándar de la liberación de las formulaciones del clorhidrato de tramadol con poloxámero 407, siendo estas representadas como TP10, TP14, TP17, TP20, FT y FC.

En el cuadro 4 se muestra el análisis estadístico a través de la prueba de ANOVA con prueba de Tukey-Kramer. Las diferencias entre el promedio de las diferentes concentraciones de poloxámero 407 mezclado con las diferentes concentraciones del clorhidrato de tramadol en concentraciones del 10%, 14%, 17% y 20% sin utilizar la membrana de diálisis comparados con la formulación de tramadol y la formulación comercial con una diferencia significativa de  $P < 0.05$  con el programa JMP®.

Siguiendo con los resultados del cuadro 4, se refiere que el grupo A como la formulación control (FT) y la formulación comercial no tuvieron diferencia significativa, lo mismo ocurre con el grupo C, el cual incluye la formulación de tramadol con concentraciones del poloxámero al 14%, 17% y 20%, mismas formulaciones que no tienen diferencia significativa entre ellas, mientras tanto, la única formulación con diferencia significativa comparada con el resto de las formulaciones es la que contiene la concentración del poloxámero al 10%, referida como el grupo B.

**Cuadro 4: Análisis estadístico a través de las pruebas de liberación sin el uso de membranas de diálisis.**

Reportado a través del promedio y la desviación estándar de las formulaciones TP10, TP14, TP17 y TP20. Mientras que a través de una prueba de Tukey las diferencias entre los valores promedio de las diferentes concentraciones del poloxámero en las formulaciones del tramadol, 10%, 14%, 17%, 20%, FT y FC, donde no se utilizó una membrana de diálisis con una diferencia significativa de  $P < 0.05$  a través del programa JMP®.

TRATAMIENTO	Comparación entre grupos
FC	A
FT	A
TP10	B
TP14	C
TP17	C
TP20	C

**Cuadro 5: Liberación modificada del tramadol, excipientes usados y resultados obtenidos con la membrana de diálisis de 50 kDa.**

NOMBRE DE LA FORMULACIÓN	PORCENTAJE DE TRAMADOL	PORCENTAJE DEL POLOXAMERO 407	C <sub>MAX</sub>	T <sub>MAX</sub>
FC	5%	---	47.5 mg/mL	1 hora
FT	5%	---	45 mg/mL	1 hora
TP10	5%	10%	35 mg/mL	10 h
TP14	5%	14%	15 mg/mL	10 h
TP17	5%	17%	5 mg/mL	10 h
TP20	5%	20%	2.5 mg/mL	10 h

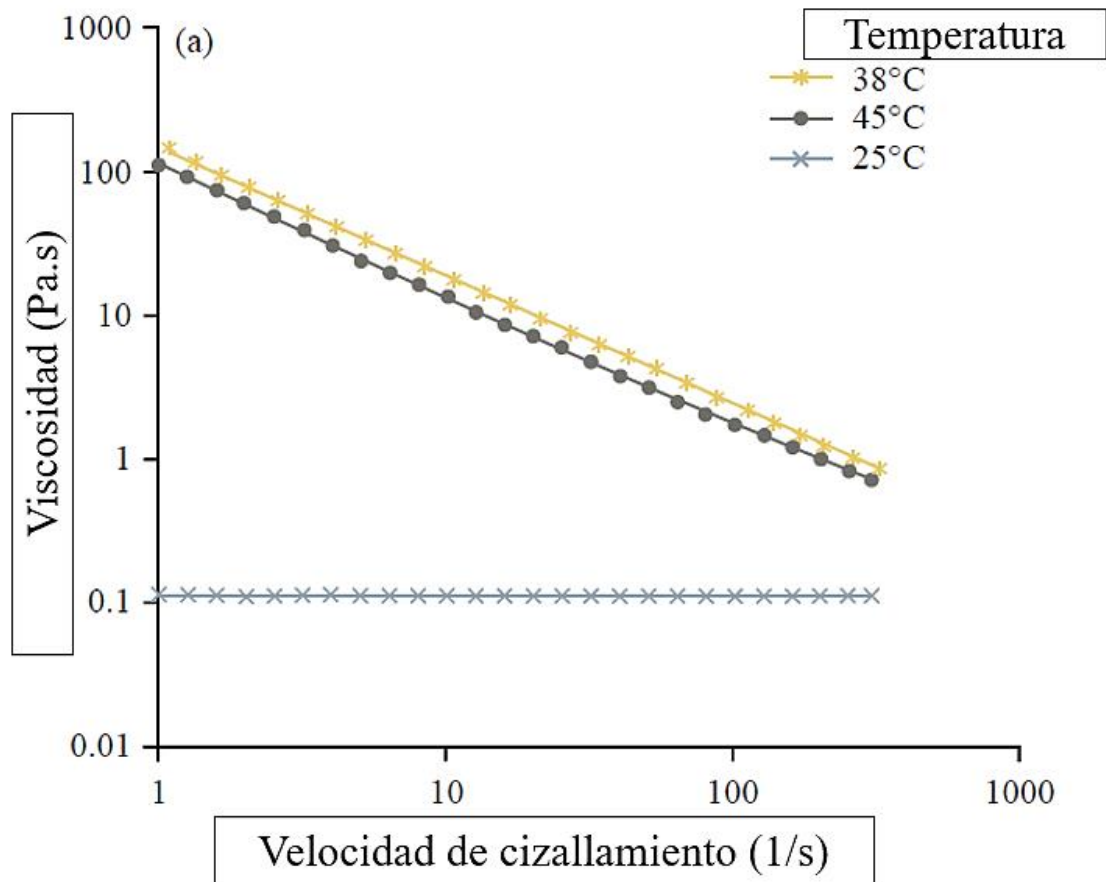
**Cuadro 6: Liberación modificada del tramadol, excipientes usados y resultados obtenidos sin la membrana de diálisis**

NOMBRE DE LA FORMULACIÓN	PORCENTAJE DE TRAMADOL	PORCENTAJE DEL POLOXAMERO 407	C <sub>MAX</sub>	T <sub>MAX</sub>
FC	5%	---	45 mg/mL	1 hora
FT	5%	---	45 mg/mL	1 hora
TP10	5%	10%	45 mg/mL	24 h
TP14	5%	14%	45 mg/mL	36 h
TP17	5%	17%	42.5 mg/mL	24 h
TP20	5%	20%	40 mg/mL	24 h

## 7.2 RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE REOLOGÍA

Considerando los resultados de reología, la gráfica 5 y gráfica 6 muestran la viscosidad a diferentes temperaturas en relación con dos concentraciones de las formulaciones del clorhidrato de tramadol, siendo este caso, formulación TP17 y TP20.

En la gráfica 5, no hay relación con la deformación de cizalla y la viscosidad por la concentración a diferentes temperaturas manejadas, de 25°C, 38°C y 45°C con las formulaciones de clorhidrato de tramadol que tiene concentración del poloxámero con 17% y 20%, se muestra el comportamiento del flujo con cizalla simple, que muestra que la formulación con la concentración del poloxámero al 17% a una temperatura de 38°C y 45°C, da un resultado de un fluido no-newtoniano, indicando así, que la viscosidad disminuye cuando la velocidad de deformación aumenta a la temperatura de 38°C y 45 °C. Este comportamiento ocurre de manera diferente a la temperatura de 25°C, que presenta un comportamiento de fluido newtoniano, el cual es un fluido donde la representación de esfuerzo cortante va en función a la velocidad, creando una línea recta.

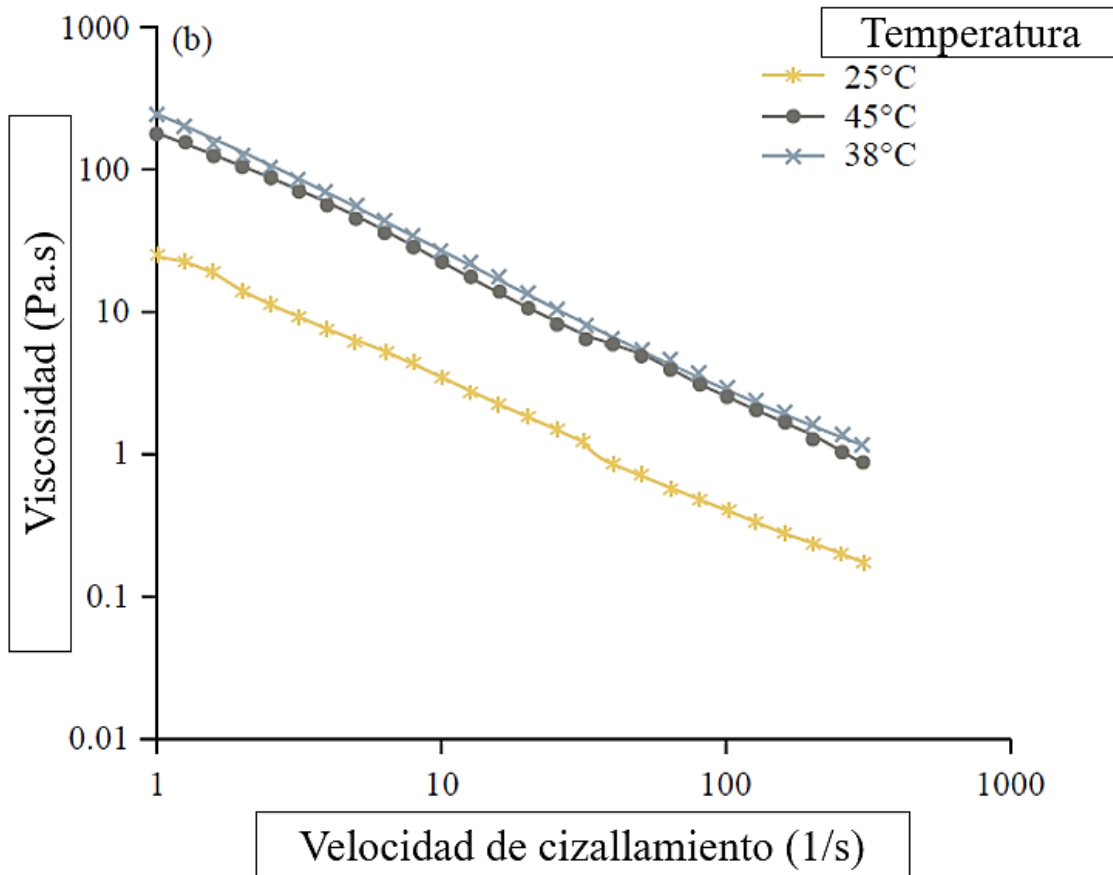


**Gráfica 5: Viscosidad a diferentes temperaturas de la concentración del poloxámero al 17%**

Estudio que se realizó a 3 diferentes temperaturas, 25°C, 38°C y 45 °C. Viscosidad del poloxámero al 17% a 3 temperaturas: 25°C, 38°C y 45°C.

En la gráfica 6, se representa la concentración del poloxámero al 20%, donde hay una relación de la velocidad de deformación con la viscosidad, el cual indica que la formulación del tramadol con la concentración del poloxámero al 20% da lugar a la transición de líquido a sol-gel. Por lo tanto, a una concentración más alta e incluso a temperaturas más bajas por debajo de la temperatura corporal normal <38°C, se produce la transición sol-gel, lo cual nos muestra la relación que hay entre la viscosidad de la formulación diseñada (Pascal por segundo) y la velocidad de corte (1/s) a tres niveles diferentes, siendo estos, las diferentes temperaturas de 25°C, 38°C y 45 °C con una concentración de poloxámero del 20%. En este caso el comportamiento del flujo de cizalla simple nos muestra que la formulación con

concentración del poloxámero al 20% a tres temperaturas (25°C, 38°C y 45 °C) adquiere el comportamiento de un fluido no-newtoniano.



**Gráfica 6: Comportamiento viscoelástico a diferentes temperaturas de la concentración del poloxámero al 20 %**

Estudio que se realizó a 3 diferentes temperaturas, 25°C, 38°C y 45 °C. Estudio de viscosidad al 20%

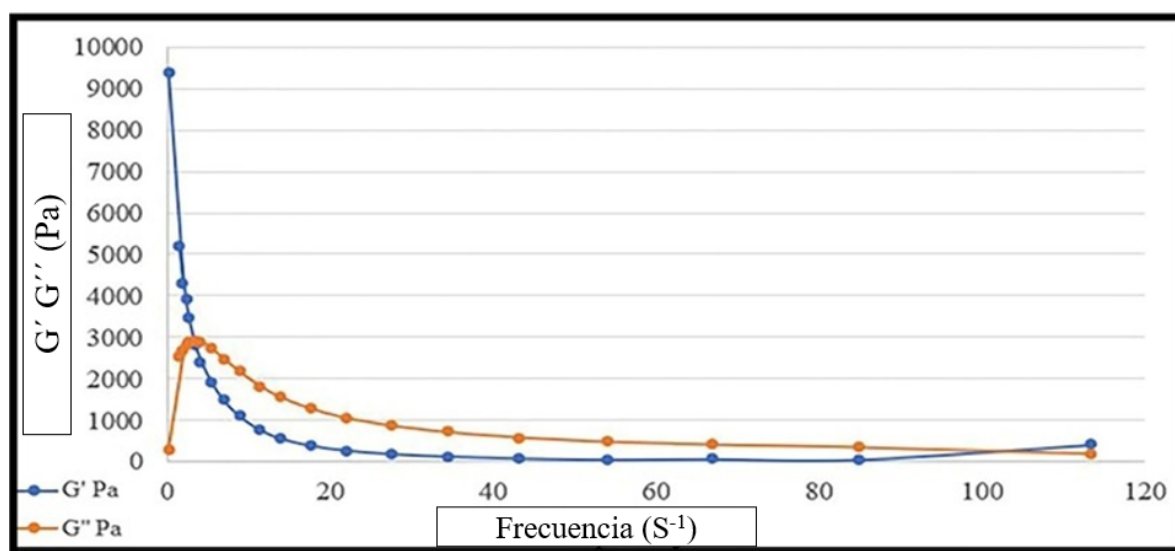
En las gráficas 7 y 8 se mostró el análisis reológico y el flujo oscilatorio de la formulación TP17 a la temperatura de 25°C, 38°C y 45 °C, donde se observa que precisamente a la temperatura de 38°C, donde el módulo elástico ( $G'$ ) en comparación con el módulo viscoso ( $G''$ ), resultando  $G'' > G'$ , que indica un comportamiento viscoso.

Los estudios de reología con mediciones de viscosidad y temperatura óptima de sol-gel demostraron que los geles de poloxámero 407 son pseudoplásticos; por lo tanto, cuando se deforma por el flujo de barrido de deformación su velocidad disminuye.

En resumen, en las gráficas 6 y 7 el comportamiento viscoso predomina al comienzo del ensayo con modulo viscoso ( $G''$ ) dominando sobre el módulo elástico ( $G'$ ), como se esperaba para un líquido viscoso.

El gel resultante se caracterizó mediante barridos de frecuencia oscilatoria lineal y pruebas de esfuerzos a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Un reómetro de esfuerzos controlado (AR-1000 TA Instruments).

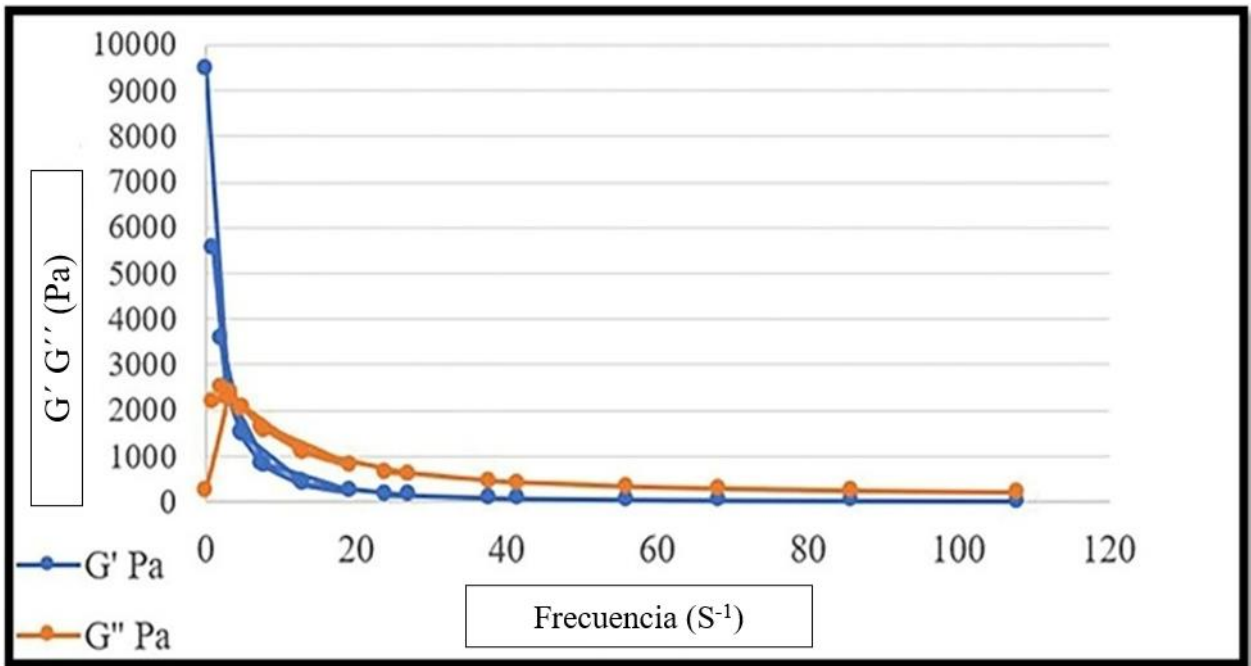
Los barridos de tiempo se realizaron con soluciones en blanco con y sin agente activo (tramadol), registrando el módulo de elasticidad en función del tiempo.



**Gráfica 7: Curvas de viscoelasticidad de las formulaciones del clorhidrato de tramadol y poloxámero con una concentración del 17% a  $38^{\circ}\text{C}$ .**

El análisis reológico de la formulación TP17 a la temperatura de  $38^{\circ}\text{C}$ , donde el módulo elástico ( $G'$ ) comparado con el módulo viscoso ( $G''$ ), resulto ser  $G'' > G'$ . Esto indica un comportamiento viscoso a la concentración de 17% a la temperatura de  $38^{\circ}\text{C}$ .





**Gráfica 8: Curvas de viscoelasticidad de las formulaciones del clorhidrato de tramadol y poloxámero con una concentración del 20% a 38°C.**

El análisis reológico de la formulación TP20 a la temperatura de 38°C, donde el módulo elástico ( $G'$ ) comparado con el módulo viscoso ( $G''$ ), resultó ser  $G'' > G'$ . Esto indica un comportamiento viscoso a la concentración de 20% a la temperatura de 38°C.

### 7.3 CORRELACIÓN *IN VIVO-IN VITRO*

#### ÁREA BAJO LA CURVA (AUC)

Cuando la concentración del fármaco es medida en el medio de disolución HEPES Buffer, se utiliza área bajo la curva (AUC) a través del método trapezoidal.

Está es una técnica geométrica que divide el AUC en trapezoides correspondientes según el número de muestras analizadas.

El área terminal más allá del último punto de datos (un triángulo), se estima y se junta con las áreas trapezoidales anteriores (Papich *et al.*, 2004).

También se obtuvieron resultados a través de las fórmulas que se presentan a continuación (Vadivelu *et al.*, Gustavvson *et al.*, 2012, Brayfield *et al.*, 2014 y Raffa *et al.*, 2012).

### **Tiempo Medio de Disolución:**

Fue determinado por el resultado de Área bajo la Curva (AUC) obtenido en el tiempo en que se realizó la prueba, multiplicando por cien y dividido entre la dosis contenida en la presentación farmacéutica, multiplicada por el tiempo de la prueba y el tiempo promedio de la liberación obtenida para cada formulación, a través de la fórmula:

$$MDT = \frac{\sum it_i \Delta Q(t_i)}{Q_{\infty}}$$

### **Porcentaje de la eficiencia liberada (%):**

Como enfoque integral por la aplicación de la fórmula, donde:

Q = Dosis concentrada en la presentación farmacéutica

t = Es el tiempo

dt = Es el diferencial del tiempo [59].

El porcentaje de eficiencia liberada se obtuvo mediante la fórmula:

$$EF(\%) = \frac{ABC_0^t * 100}{Q_{\infty} t}$$

### **Factor de Diferencia (f1) Factor de Similitud (f2):**

El modelo simple usa un factor de diferencia (f1) y un factor de similitud (f2) para comparar los perfiles de disolución. El factor de diferencia f1 calcula la diferencia porcentual (%) entre las dos curvas en cada punto de tiempo y es una medida del error relativo entre las dos curvas (Reiman *et al.*, 1998 y Stoelting *et al.*, 1999).

$$f1 = \{[\sum_{t=1}^n (Rt - Tt) / \sum_{t=1}^n Rt]\} \times 100$$

El factor de similitud ( $f_2$ ) es una transformación de raíz cuadrada recíproca logarítmica de la suma del error al cuadrado y es una medida de la similitud en porcentaje de disolución entre las dos curvas (Reiman *et al.*, 1998 y Stoelting *et al.*, 1999).

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

### **Correlación *in vivo-in vitro* (IVIVC):**

La correlación *in vivo-in vitro* (IVIVC) es una herramienta biofarmacéutica recomendada para ser usada en el desarrollo de la formulación. Una vez valida puede acelerar el desarrollo de la formulación, utilizarse para fijar límites de disolución y como sustituto de un estudio *in vivo* (Vadivelu *et al.*, 2010 y Gustavsson *et al.*, 2012).

El valor de la disolución como herramienta de control de calidad para predecir el rendimiento *in vivo* de un medicamento mejora significativamente si una relación (correlación) es *in vitro-in vivo*.

$$A\% = \frac{C_t + K_{el}AUC_0^t}{K_{el}AUC_\infty^0} \times 100$$

### **Comparación de perfiles de disoluciones *in vitro*:**

#### **Análisis del perfil de disolución:**

Las muestras fueron obtenidas a los tiempos de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h de las formulaciones diseñadas en el presente trabajo fueron determinadas, por el cálculo subsecuente de los parámetros.

Los resultados y comparaciones de valores se muestran en el cuadro 4 y cuadro 5, refiriendo así las formulaciones mencionadas anteriormente: TP10, TP14, TP17, TP20, FT y FC en un

medio de disolución de HEPES Buffer usando un dispositivo Float-A-Lizer para diálisis con un tamaño de poro de 50 kDa y sin el uso de estas membranas, con una concentración inicial de 50 mg/mL, el tiempo de concentración máxima (Tmax), Área bajo la curva (AUC) fueron obtenidos a través del programa PKAnalyst, Micromat Scientific, Salt Lake City, UT, USA (Gustavsson *et al.*, Bravfield *et al.*, 2014 y Raffa *et al.*, 2012).

Los métodos para comparar el perfil de disolución *in vitro* son clasificados dentro de tres modalidades:

Modelo de análisis de varianza (ANOVA) basándose en un modelo matemático, el cual fue usado en este trabajo, se utilizó un modelo matemático predictivo a través del método de Wagner-Nelson (A%), calculando la fracción absorbida de la concentración como una función de tiempo (Ct), constante de eliminación (Kel), Área bajo la curva (AUC) expresados en porcentaje [56-58, 62]; y la comparación de valores de la fracción absorbida calculada a través del medio de concentración de la liberación de las muestras del clorhidrato de tramadol a diferentes tiempos con una concentración inicial de 50 mg/mL.

**Cuadro 7. Valores farmacocinéticos usando un dispositivo Float-A-Lizer para diálisis con un tamaño de poro de 50 kDa para las formulaciones de tramadol.**

VALORES FARMACOCINÉTICOS	FC	FT	TP10	TP14	TP17	TP20
MDT (h)	1 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>	54 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	65 <sup>b</sup>	75 <sup>c</sup>
AUC (µg * hora / mL)	285.22 <sup>a</sup>	340.73 <sup>d</sup>	308.78 <sup>a</sup>	240.88 <sup>c</sup>	200.81 <sup>c</sup>	193.20 <sup>e</sup>
EF (%)	98 <sup>a</sup>	96 <sup>a</sup>	80 <sup>b</sup>	50 <sup>c</sup>	18 <sup>d</sup>	15 <sup>d</sup>
Difference factor f1 (%)		59.42 <sup>a</sup>	71.30 <sup>a</sup>	87.65 <sup>b</sup>	81.63 <sup>b</sup>	84.69 <sup>b</sup>
Similarity factor f2 (%)		11.94 <sup>a</sup>	10.82 <sup>a</sup>	8.44 <sup>b</sup>	7.0 <sup>b</sup>	6.77 <sup>b</sup>
IVIVC (%)	60.70 <sup>a</sup>	65.82 <sup>a</sup>	61.80 <sup>a</sup>	62.20 <sup>a</sup>	60.81 <sup>a</sup>	71.21 <sup>b</sup>

Los valores sin la letra suscrita en común tienen una diferencia significativa (P < 0.05), para este análisis se utilizaron membranas de diálisis de 50 kDa con una concentración inicial de 50mg/mL. F1 y F2 son los valores comparados entre la Formulación Comercial y las formulaciones diseñadas en este estudio IVIVC (%).

**Cuadro 8. Valores farmacocinéticos sin el uso de una membrana de diálisis para las formulaciones de tramadol.**

<b>VALORES FARMACOCINÉTICOS</b>	<b>FC</b>	<b>FT</b>	<b>TP10</b>	<b>TP14</b>	<b>TP17</b>	<b>TP20</b>
MDT (hours)	1.8 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	70 <sup>b</sup>	70 <sup>b</sup>	70 <sup>b</sup>	75 <sup>b</sup>
AUC (µg * hour / mL)	316.10 <sup>a</sup>	336.40 <sup>b</sup>	347.21 <sup>b</sup>	319.89 <sup>a</sup>	315.87 <sup>a</sup>	322.10 <sup>a</sup>
ER (%)	98.4 <sup>a</sup>	96.4 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	88.6 <sup>b</sup>	92 <sup>a</sup>	80.6 <sup>c</sup>
Difference factor f1 (%)		97.36 <sup>a</sup>	92.47 <sup>b</sup>	90.04 <sup>b</sup>	93.49 <sup>b</sup>	81.91 <sup>c</sup>
Similarity factor f2 (%)		10.64 <sup>a</sup>	10.98 <sup>a</sup>	10.11 <sup>a</sup>	9.99 <sup>a</sup>	10.18 <sup>a</sup>
IVIVC (%)	87.02 <sup>a</sup>	89.78 <sup>a</sup>	82.52 <sup>b</sup>	88.01 <sup>a</sup>	82.45 <sup>b</sup>	80.24 <sup>b</sup>

Los valores sin la letra suscrita en común tienen una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), para este análisis no se utilizaron membranas de diálisis con una concentración inicial de 50mg/mL. F1 y F2 son los valores comparados entre la Formulación Comercial y las formulaciones diseñadas en este estudio IVIVC (%).

## 8. DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos durante el presente estudio, el clorhidrato de tramadol en adición con el poloxámero 407 se formaron micelas debido a la transición de la formulación líquida a sol-gel, para esto, varió la concentración y la temperatura que tenía cada formulación [30-31]. Esto se confirma con los resultados de viscosidad obtenidos con la formulación del tramadol a la concentración del 17% a las temperaturas de 38°C y 42°C, así mismo con la formulación de tramadol con poloxámero al 20% a partir de una temperatura de 25°C (gráfica 7).

En el estudio de Gaitán se menciona que la formulación comercial de tramadol usada para perros tiene un efecto analgésico extremadamente corto, aproximado de 4 h (Gaitán, 2010). En cuanto a las preparaciones experimentales realizadas en el proyecto de Gaitán, al utilizar y comparar diferentes formulaciones, se concluyó que el carbopol y el chitosan no obtuvieron un efecto de acción prolongada del tramadol en comparación con el poloxámero 407 (Gaitán, 2010).

Al comparar las concentraciones de carbopol, chitosan y poloxámero se observó que las concentraciones séricas del clorhidrato de tramadol en una formulación con poloxámero al 10% generó concentraciones en un rango terapéutico, manteniéndolo por más de 24 h, que conduce a una verdadera farmacocinética de liberación prolongada (Gaitán, 2010).

Basado en los resultados analizados, se registró la siguiente información:

En el estudio de Gaitán se utilizó la concentración con poloxámero del 10% y liberó un 100% a las 24 h. Por tal motivo, se decidió utilizar poloxámero en el presente estudio pero con concentraciones al 14%, 17% y 20%, aunque también se evaluó la liberación de tramadol con una formulación con la concentración de poloxámero al 10% (Gaitán, 2010).

Mientras tanto, en el estudio de Mendonca, en la formulación con poloxámero al 20%, se liberó un 60% de tramadol; en la formulación con poloxámero al 30% liberó un 30% de tramadol y en la formulación con poloxámero al 35% se liberó un 24% de tramadol, ocurrido en un lapso de 24 h.

En el estudio de Mendonca solo fue posible medir a las 24 h pero en el presente estudio, con el uso de un dispositivo Float-A-Lizer para diálisis con un tamaño de poro de 50 kDa se cuantificó la liberación de los formulados diseñados, por 72 h, obteniendo los siguientes resultados:

Las formulaciones TP20 y TP17 liberaron tramadol alrededor del 10-20% a las 72 h. La formulación TP14 liberó el 40% de tramadol a las 72 h y la formulación TP10 liberó alrededor del 70-80% a las 72 h en comparaciones con las formulaciones FT y FC que alcanzaron del 90-100% después de 4 h.

Mientras tanto, las formulaciones en las que no se utilizaron membranas de diálisis, como TP20 y TP17, liberaron alrededor de 95-100 % a las 72 h. Las formulaciones TP10 y TP14 alcanzaron una liberación a las 48 h en comparación con FT y FC que alcanzaron el 90% después de 2 h. Por tanto, los resultados de este estudio confirman con lo establecido por Gaitán y Mendonca [18,30,31]. (Gaitán, 2010, Mendonca *et al.*, 2015 y Guzmán *et al.*, 2009).

Así como evaluamos los resultados de nuestro estudio y lo comparamos con los resultados del estudio de Gaitán y Mendonca, el efecto de relacionar las formulaciones se debe a la temperatura y concentración del poloxámero, ya que a bajas temperaturas tanto el OXIDO DE POLIPROPILENO (PPO) como el OXIDO DE POLIETILENO (PEO) son solubles en agua. Cuando la temperatura aumenta, las unidades de OXIDO DE POLIPROPILENO (PPO) se deshidratan y se añaden así, creando un núcleo micelar mientras que las unidades de OXIDO DE POLIETILENO (PEO) son hidrófilas, formando el núcleo micelar y

permaneciendo hidratadas (Gaitán, 2010, Mendonca *et al.*, 2015, Guzmán *et al.*, 2009, Klouda *et al.*, 2008).

La micelización ocurre en soluciones diluidas de copolímeros de bloque en solventes seleccionados por encima de la concentración crítica de micelas a una cierta temperatura. A concentraciones más altas, por encima de una concentración de gel crítica, las micelas se pueden ordenar en una red (Guzmán *et al.*, 1994).

Se puede decir que la concentración del poloxámero es inversamente proporcional a la liberación del fármaco en el medio, lo que resulta en una liberación de casi 70% a las 72 h para la formulación que contiene poloxámero al 17%, por lo que para los próximos estudios *in vivo*, esta formulación debe usarse ya que se elimina en su mayoría y se espera encontrar concentraciones plasmáticas terapéuticas alrededor de este período.

En las gráficas 4 y 5 se exhibió el flujo de las formulaciones con concentraciones de poloxámero 17% y 20%, el resultado es fluido no newtoniano, lo que indicó que la viscosidad a 38°C y 45°C disminuye cuando aumenta la velocidad de deformación, sin embargo, al tener una formulación a 25°C, dicho fluido se comporta como un fluido newtoniano, es decir, que un fluido con un esfuerzo de corte representativo trabaja en función de la velocidad de cizalla, formando una línea recta, como se observa en la figura 4, comparando el comportamiento general observado, de esta manera se coincide con los estudios de Wszolek, Rubio-Hernández y Wang obtuvieron (Ho *et al.*, 1999, Sha *et al.*, 2005 y Hartung *et al.*, 2018) lo que significa que la viscosidad aparente disminuye al aumentar el flujo de cizalla de deformación.

Este resultado es debido a la ruptura de la estructura interna del fluido, es decir, se refiere a que la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizalla y muestra que la viscosidad de la formulación de tramadol disminuye y permanece líquida a una temperatura de 25°C, la cual no corresponde con la temperatura corporal del paciente en futuros estudios (caninos domésticos).

Considerando los resultados del estudio de Ricci, muestra sus resultados reológicos con mediciones de viscosidad y temperatura óptima de sol-gel y se muestra que los geles de poloxámero 407 son pseudoplásticos; por lo tanto, cuando se deforma por el flujo de barrido

la viscosidad disminuye. Además, tomando en cuenta la información en el trabajo de Ricci trabaja en conjunto con los resultados de la misma investigación, se determinó que la temperatura de transición sol-gel se reduce al aumentar la concentración de polímero, en este caso la concentración de poloxámero 407 con 17% y 20% (Scott *et al.*, 1998 y Navarra *et al.*, 2005).

## 9. CONCLUSIONES

El objetivo de este estudio fue diseñar un sistema *in vitro* previo a la administración subcutánea en perros, para asegurar un comportamiento de liberación prolongada del clorhidrato de tramadol (Klouda *et al.*, 2008).

Se obtuvo una formulación de liberación modificada de tramadol a partir de una matriz polimérica (poloxámero 407) que logra una liberación prolongada del ingrediente activo en comparación con la formulación diseñada y también con la formulación del producto comercial, lo que podría permitirlo con una sola dosis del formulado, las concentraciones terapéuticas del analgésico pueden permanecer durante más de 72 h.

Incluso pueden durar hasta 100 h (4 días), lo que reduce el manejo del paciente y permite que se cumpla el tratamiento estando dentro del margen terapéutico.

Las concentraciones de poloxámero de 17% y 20% a temperaturas de 38°C y 45°C mostraron alteración de la viscosidad, debido a la ruptura de la estructura interna del fluido, siendo óptima esta temperatura para la transición de la formulación a un sol-gel, según los estudios de reología y liberación, ya que coincide con la temperatura corporal de los perros es >38°C.

La alteración de la viscosidad determina que la transición de la formulación de líquido a sol-gel cumpla con el objetivo establecido de ser un gel termo-reversible para la formación de micelas relacionadas con temperaturas y concentraciones críticas, mismos resultados se observaron en la prueba *in vitro* de liberación y reología.

También se presentaron los resultados de liberación y sus propiedades reológicas de las formulaciones del clorhidrato de tramadol a diferentes concentraciones con el poloxámero



407, los cuales fueron necesarios utilizar para predecir sus propiedades de uso final (Guzmán *et al.*, 1994 y Calderas *et al.*, 2016).

Se realizarán estudios *in vivo* en investigaciones posteriores para conocer la farmacocinética de las formulaciones diseñadas en este proyecto, se trabajará con animales de laboratorio y pequeñas especies.

## 10. REFERENCIAS

Allen, L.V., Popovich, N.G., Ansel, H. 2011. Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, 9 ed. Wolters Kluber. Philadelphia, USA.

Alvarez-Lorenzo, J.; Gonzalez-Lopez, M.; Fernandez-Tarrio.; Sandez-Macho, I.; Cocheiro, A. 2007. Tetronic micellization, gelation and drug solubilization: Influence of pH and ionic strength. *Eur. J. Pharm. Sci.* 66, 244-252.

Arjunan, V.; Santhanam, R.; Marchewka, M.K.; Mohan, S. 2014. Comprehensive quantum chemical and spectroscopic (FTIR, FT-Raman,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR) investigation of O-desmethyltramadol hydrochloride an active metabolite in tramadol – An analgesic drug. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 122, 315-330.

Baker, B.B.; Sladky, K.K.; Johnson, S.M. 2011. Evaluation of the analgesic effects of oral and subcutaneous tramadol administration in red-eared slider turtles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 238(2); 220-227.

Balakrishnan P.; Park, E-K.; Song, K.C.; Ko, H.J.; *et al.* 2015. Carbopol-Incorporated Thermoreversible Gel for Intranasal. *Molecules.* 20(3), 4124-4135.

Barnes, H.A. 2000. A Handbook of elementary rheology. University of Wales. 55-60, 141-149.

Barter LS. 2011. Rabbit analgesia. *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.*, 14:93-104.

Bhattacharjee, G.; Verma, G.; Aswal, V.K.; Patravale, V.; Hassan, P.A. 2013. Microstructure, drug binding and cytotoxicity of Pluronic P123-aerosol OT mixed micelles, *RSC Adv.* 3, 23080-23089.

- Black, P.A.; Cox, S.K.; Macek, M. 2010. Pharmacokinetics of tramadol hydrochloride and its metabolite o-desmethyl tramadol in peafowl (*Pavo cristatus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 1(4):671-676.
- Brayfield, A. 2014. Tramadol hydrochloride. In: Brayfield A (ed): Martindale: The complete drug reference. Pharmaceutical Press. London, pp: 4688.
- Calderas, F.; Medina-Torres, L.; Linares-Alba, M.A.; Urbano-López, H.E.; Bernad-Bernad, M.J.; Manero, O. 2016. Rheology of the ultrasound-induced gelation in poloxamer aqueous solutions. *Rheologic Acta.* 55-781-787.
- Cardot JM, Beyssac. E. 1993. *In vivo/in vitro* correlations: Scientific implications and standardisation. *Eur J of Drug Metab Pharmacokinet.* 18 (1):113-120
- Carrion, R.D.; González, D. C.A.; Olivera, R.A.; *et al.* 1999. Bioequivalencia. Introducción a la correlación *in vivo-in vitro*. Parte 1. *Rev. Cubana. Farm.* 33 (2):137-142.
- De Larrad, F. 1999. Concrete mixture proportioning a scientific approach in: S. Mindess, A. Bentur (Eds.). *Modern Concrete Technology Series No. 7, E FN S PON*, London 421.
- Deore, R.; Kavitha, K.; Tamizhmani, T. 2010. Preparation and evaluation of sustained release matrix tablets of tramadol hydrochloride using glycerylpalmitostrate. *Trop. J. Pharm. Res.* 9(3), 275-281.
- Derakhshanden, K.; Fashi, M.; Seifoleslami, S. 2010. Thermosensitive pluronic hydrogel: prolonged injectable: prolonged injectable formulation for drug abuse. *Drug Des. Devel. Ther.* 4, 255-262.
- Dighe SV. 1995. Development of dissolution test for immediate release and modified release oral dosage forms. Report Pre-Conference Bio-International'94. Pre-Conference Satellite Symposium on *in vitro-in vivo correlation; 1994 June 14; Munich: International Pharmaceutical Federation.* 247-55.
- Emami, *et al.*, 2006. In vitro – in vivo correlation: from theory to applications. *J Pharm Pharm Sci*; 9(2): 169-189
- Emmerson, R.W., Poppe, A. 1999. Editorial II tramadol revisited. *Br. J. Anaesth.* 82, 493-495.

Escobar-Chávez, J.J.; López-Cervántes, M.; Naik, A.; Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanar, A. 2006. Application of thermo-reversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 9(3): 339-358.

Gaitán, T. I. Diseño, desarrollo y evaluación farmacocinética de un preparado subcutáneo de liberación modificada de clorhidrato de tramadol en perros. UNAM, FMVZ, 2010.

Galgatte, U.C.; Chaudhari, P.D. 2014. Preformulation study of poloxamer 407 gels: effect of additives. *Int. J. Pharm.* 6, 130-133.

García-Quetglas, E., Anzana, J.R., Sádaba, B., *et al.* 2007. Pharmacokinetics of tramadol enantiomers and their respective phase I metabolites in relation to CYP2D6 phenotype. *Pharmacol. Res.* 55, 122-130.

Giorgi, M.; Saccomanni, G.; Lebkowska-Wieruszewska.; Kowalski, C. 2009.,. Pharmacokinetic evaluation of tramadol and its major metabolites after single oral sustained tablet administration in the dog: a pilot study. *Vet. J.* 180 (2), 253–255.

Giral, M.; García-Olmo, D.C.; Gómez-Juárez, M. 2014. Anaesthetic effects in the ferret of alfaxalone alone and in combination with medetomidine or tramadol: A pilot study. *Lab Anim.* 48(4):313-320.

González, M. N.; Trinidad, N. 2007. Desarrollo farmacéutico de un gel con poloxámero para aplicación tópica con ibuprofeno. Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM.

Goodwyn, I. W. y Hudhes, R. W. *Rheology for Chemist.* 2008. An introduction. 2<sup>nd</sup> edition, RSC Publishing.

Grundy, J.S. Anderson KE, Rogers JA. 1997. Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. I. Description of a two-phase *in vitro* dissolution test. *J. Controll Release.* 48: 1-8.

Grundy JS, Anderson KE, Rogers JA. 1997. Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. II. Improved *in vivo/in vitro* correlation using a two-phase dissolution test. *J. Controll Release.* 48:9-17.

Gustavsson, A.; Bjorkman, J.; Ljungcrantz, C.; *et al.* 2012. Pharmaceutical treatment patterns for patients with a diagnosis related to chronic pain initiating a slow-release

strong opioid treatment in Sweden. International Association for the study of pain. 153, 2325-2331.

Guzmán, M., Aberturas, M. R., García, F., and Molpeceres, J. 2009. Gelatine gels and polyoxyethylene-polyoxypropylene gels: Comparative study of their properties, Drug Dev. Ind. Phar., 2041-2048.

Guzmán, M., Aberturas, M.M., García, F., and Molpeceres, J. 1994. Gelatine gels and polyoxyethylene-polyoxypropylene gels: Comparative study of their properties, Drug Dev, Ind, Pharm.20, 2041-2048.

Hartung, T. 2018. Perspectives on *In vitro* to *In vivo* Extrapolations. Applied In vitro Toxicology. 4, 4.

Ho, S.; Wang, J-T.; Liaw, W-J.; Ho, C-M.; Li, H-M. 1999. Determination of tramadol by capillary gas chromatography with flame ionization detection. Application to human and rabbit pharmacokinetics studies. Journal of Chromatography B. 736, 89-96.

Katzung, B.G; Masters, F.B; Trevor, A.J. Farmacología básica y clínica, 12<sup>a</sup> ed.; McGraw Hill: México, 2013.

Khosrojerdi, H.; Talesh, G.A.; Danaei, G.H.; *et al.* 2015. Tramadol half life is dose dependent in overdose. DARU. Journal of pharmaceutical sciences. 23:22

Kilburn, J.J.; Cox, S.K.; Kottyan, J. 2014. Pharmacokinetics of tramadol and its primary metabolite o-desmethyltramadol in African penguins (*Spheniscus demersus*). J. Zoo. Wildl. Med.45(1):93-99.

Klouda, L.; Mikos, A.G. 2008. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. Eur. J. Pharm. Biopharm. 68 (1), 34-45.

Kögel, B.; Terlinden, R.; Schneider, J. 2014. Characterisation of tramadol, morphine and tapentadol in an acute pain model in beagle dogs. Vet. Anaest. Analg. 41, 3, 297-304.

Lagard, C.; Chevillard, L.; Malissin, I., *et al.* 2016. Mechanisms of tramadol-related neurotoxicity in the rat: Does diazepam/tramadol combination play a worsening role in overdose?. Toxicology and applied pharmacology. 108-119.

Liang, M.; Zheng N.; Xiangyang, C.; Liang L.; Yan, L.; Ming, J. 2011. Determination of tramadol by capillary GC-FID and a study of postmortem distributions in rats. *Rom. J. Leg Med.* 201, 19, 45-50.

Liu, C.B. 2007. Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermo-sensitive. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects.*

Mabrouk, M.; Beherei, H, H.; ElShebiney, S.; Tanaka, M. 2018. Newly developed controlled release subcutaneous formulation for tramadol hydrochloride. *Saudi. Pharm J.*

Maderuelo, C.; Zarzuelo, A.; Lanao, J.M. 2011. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *J Control. Release.* 154, 2-19.

Marcos, B.X.E. 2016. Caracterización fisicoquímica de mezclas pluronic-polímeros derivados de la celulosa para su uso en formulaciones farmacéuticas, Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencia, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico.

Mathwes, K.; Kronen, P. W.; Lascelles D.; *et al.* 2014. Guidelines for recognition, assessment, and treatment of pain. *Journal of Small Animal Practice.*

Matthew, J.E.; Nazario, Y.L.; Roberts, S.C.; Bhatia, S.R.. 2002. Effect of mammalian cell culture medium on the gelation properties of Pluronic PF127. *Biomaterials.*, 23, 4615-4619.

Mayol, L.; Biondi, M.; Quaglia, S.; Fusco, S.; Borzacchiolo, A.; Ambrosio, L.; La Rotonda, M.I. 2010. Injectable thermally responsive mucoadhesive gel for sustained protein delivery. *Biomacromolecules.* 12, 28-33.

Mendonca, D. A.C.; Akkari, A.C.; Ferreria, I.R.; Maruyama, C.R.; Pascoli, M.; Guilherme, V.A.; de Paula, E.; Fraceto, L.F.; de Lima, R.; Melo Pda.S.; de Araujo, D.R. 2015. Poloxamer-based binary hydrogels for delivering tramadol hydrochloride: sol-gel transition studies, dissolution-release kinetics, in vitro toxicity, and pharmacological evaluation. *Int. J. Nanomedicine.* 10, 2391–2401

Formas farmacéuticas de liberación modificada y estereoisómeros. *Boletín de información Farmacoterapéutica de Navarra.* 2005, 13 (1).

Papich, M.G.; Kukanich, B. 2004. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyltramadol in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 27, 239-246.

Peng, S.; Lin, Y.J.; Cheng, M.H.; Wu, C.W.; Chu, I.M. 2016. A cell compatible OXIDO DE POLIETILENO (PEO) -OXIDO DE POLIPROPILENO (PPO) -OXIDO DE POLIETILENO (PEO) (Pluronic ®) – based hydrogel stabilized through secondary structures. *Mater. Sci. Eng. C.* 421-428

Pereira, G.G.; Dimer, F.A.; Guterres, S.S.; Kechinski, C.P.; Granada, J.E.; Cardozo, N.S.M. 2013. Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermorreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. *Quim. Nova.* 36, 1121-1225.

Plumb's, D.C. *Handbook Drug Veterinary*, 6th ed; PharmaVet Inc: Stockholm, Wisconsin, 2008.

Raffa, R.B. 2008. Basic pharmacology relevant to drug abuse assessment: tramadol as example. *J. Clin. Pharm. Ther.* 33, 101-108.

Raffa, R.B.; Buschman H.; Christoph, T.; *et al.* 2012. Mechanistic and functional differentiation of tapentadol and tramadol. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 13, 1437-1449.

Reiman, W.; Schneider, F. 1998. Induction of 5-hydroxy-tryptamine release by tramadol, fenfluramine and reserpine. *European Journal of Pharmacology.* 349, 199-203.

Riviere, J. E.; Papich, M.G. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10<sup>th</sup> ed.; Willey Blacwell: USA, 2017.

Rojas, G.R., Restrepo, V.P. 2015. Modelo de correlación farmacocinético *in vitro-in vivo* para el aseguramiento de la calidad de medicamentos antirretrovirales. *Colomb. Med.* 46(3): 109-116

Scott, R.; Perry, J. *Introduction to analytical gas chromatography chromatographic sciences*, 2<sup>nd</sup> ed; Marcel Dekker Inc: 6th ed; PharmaVet Inc: New York, 1998.

Sha, Y.F.; Shen, S.; Duan, G.L. 2005. Rapid determination of tramadol in human plasma by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 37, 143-147.

Shah V.P., Skelly JP, Barr WH, Malinowski H, Amidon GL. 1992. Scale-up of controlled-release products. Preliminary considerations. Pharm Technol. (May):35-40.

Siewert, M. 1995. *In vivo* validation of *in vitro* dissolution test and specifications: applications for controlled/modified release products. Report Pre-Conference Bio-International '94. Pre-Conference Satellite Symposium on *in vitro-in vivo* correlation; 1994 June 14; Munich: International Pharmaceutical Federation. 293-9.

Silberberg, A. 1977. Basic Rheological Concepts. In Mucus in Health and Disease, Ed. M. Elstein, DV. Podke, New York: Plenum, 181-190.

Skelly JP, Amidon GL, Barr WH, Benet LZ, Carter JE, Robinson JR, *et al.* 1990. *In vitro* and *in vivo* testing and correlation for oral controlled/modified release dosage forms. J Controll Release. 14:95-106.

Souza, M.J.; Guzman, D.S.M.; Paul-Murphy, J.R. 2012. Pharmacokinetics after oral and intravenous administration of a single dose of tramadol hydrochloride to Hispaniolan Amazon Parrots (*Amazona ventralis*). Am. J. Vet. Res. 73(8):1142-1147.

Stoelting, R.K. 1999. Opioid agonists and antagonists. In: Stoelting RK (ed.): Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice. Lippincott W & W, Philadelphia. 77-112.

Subedi, M.; Shalini, Bajaj., Maushmi S.K.; Mayur, Y.C. 2018. An overview of tramadol and its usage in pain management and future perspective. Biomed Pharmacother. 111, 443-451.

Subramanian, K.G.; Vijayakumar V. 2012. Synthesis and evaluation of chitosan-graft-poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-itaconic acid) as a drug carrier for controlled release of tramadol hydrochloride. Saudi. Pharm. J. 20, 263-271.

Sumano, L. H.; Ocampo, C. L.; Gutiérrez, O.L. Farmacología Veterinaria, 4ª ed.; McGraw Hill: México, 2005.

Tao, Q; Dennis, J.; Stone, J.; Michael, R. Jean-Bart, V.; Codd, E.; Coogan, T.; Desai-Krieger, D.; Liao, S.; Raffa, R.B. 2001. Gas chromatographic method using nitrogen-phosphorus detection for the measurement of tramadol and its *O*-desmethyl metabolite in plasma and brain tissue of mice and rats. Journal of Chromatography B. 763, 165-171.

- Taylor, B.F.; Ramirez, H. E. Battles, A.H. 2016. Analgesic activity of tramadol and buprenorphine after voluntary ingestion by rats(*Rattus norvegicus*). J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 55(1): 74-82.
- Vadivelu, N.; Mitra, S.; Narayan, D. 2010. Recent advances in postoperative pain management. Yale Journal of Biology and Medicine.. 83, 11-25.
- Vazzana, M.; Andreani, T.; Fangueiro, J.; Faggio, C.; Silva, C.; Santini, A.; García, M.L.; Silva, A.M.; Souto, E.B. 2015. Tramadol hydrochloride: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, adverse side effects, co-administration of drugs and new drug delivery systems. Biomed Pharmacother. J. 70, 234-238.
- Villarejo, M.; Murillo J.; Alvarado H. 2000. Farmacología de los agonistas y de los antagonistas de los receptores opioides. REIC. 1(2), 106-137.
- Volkmer, E.; Leicht, U.; Moritz, M.; Schwarz, C.; Wiese, H.; Milz, S.; Matthias, P.; Scholoeagl, W.; Friess, W.; Goettlinger, M.; Augat, P.; Schieker. 2013. Poloxamer-based hydrogels hardening at body core temperature carriers for cell based therapies: in vitro and in vivo analysis. J. Mater. Sci. J. 24. 2223-2234.
- Wang, J.; Zhang L.; Q., Chi,H.; Wang, S. 2016. An alternative choice of lidocaine-loaded liposomes: lidocaine-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for local anesthetic therapy, Drug Deliv. 23(4): 1254-1260
- Wolfe, A.M.; Kennedy, L.H. 2015. Efficacy of tramadol as a sole analgesic for postoperative pain in male and female mice. J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 54(4):411-419.
- WSAVA. Global Veterinary Community, Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain. Journal of Small Animal Practice. 2014. 1-59.
- Wu, W.N., McKown, L.A., Liao, S. 2002. Metabolism of the analgesic drug ULTRAM (tramadol hydrochloride) in humans: API-MS and MS/MS characterization of metabolites. Xenobiotica. 32, 411-425.
- Xu, X.; Khan, M.A.; Burgess, D.J. 2012. A two-stage reverse dialysis *in vitro* dissolution testing method for passive targeted liposomes. Int. J. Pharm. 426, 211-218.



Yap, L-S.; Yang, M.C. 2016. Evaluation of hydrogel composing of Pluronic F127 and carboxymethyl hexanoyl chitosan as injectable scaffold for tissue engineering applications. *Colloid. Surface B.* 204-211.

Yu, L.; Di, J. 2008. Injectable hydrogels as unique biomedical material. *Chem. Soc. Rev.* 37, 1473-1481.

## 11. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Publicado:

1. Ortega E; Bernad MJ; Gracia J; Vargas D; Ocampo L. In vitro release of new modified-release tramadol HCl designs and their rheological characterization. *International Journal of Pharmacology*. 17 (1): 28-37, 2021. DOI: 10.3923/ijp.2021 ISSN 1811-7775
2. Ortega E.; Bernad MJ; Gracia J; Vargas D; Ocampo L. *In vitro* release of new designs of modified-release tramadol hydrochloride included in a polymer matrix. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Research*. 34, 5, 1783-1790. 2021. DOI: 10.36721/PJPS.2021.34.5. REG.1783-1790.1



# International Journal of Pharmacology

ISSN 1811-7775

**science**  
alert

**ansinet**  
Asian Network for Scientific Information



## Research Article

# *In vitro* Release of New Modified-Release Tramadol HCl Designs and Their Rheological Characterization

<sup>1</sup>Elizabeth Ortega, <sup>2</sup>Maria J. Bernad, <sup>3</sup>Jesus Gracia, <sup>1</sup>Dinorah Vargas and <sup>1</sup>Luis Ocampo

<sup>1</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Veterinary Medicine School, National Autonomous University of Mexico, Mexico

<sup>2</sup>Pharmaceutical Technology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico

<sup>3</sup>Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico

## Abstract

**Background and Objectives:** Tramadol is a widely used analgesic due to its efficacy and lower incidence of adverse effects, but it has a short time of action. In this study, various formulations of 5% tramadol HCl in a poloxamer 407-based matrix system were designed at different concentrations (10, 14, 17 and 20%) to achieve a modified release formulation. **Materials and Methods:** Rheological-characterization and release *in vitro* using an Ultraviolet (UV) spectrophotometer. The results were compared with tramadol salts without excipients (T) and reference medicine (R). The follow-up time was 72 hrs and the use or absence of a dialysis membrane with a porosity of 50 kDa was also compared. **Results:** When the membrane was used, the formulations name TP<sub>10</sub>, TP<sub>14</sub>, TP<sub>17</sub> and TP<sub>20</sub> had a release of 98, 50, 23 and 16% each at 72 hrs, exceeding 3 times the release time of T and R. When membranes are not used, the TP<sub>17</sub> and TP<sub>20</sub> formulations achieved this in 48 hrs instead of the 2 hrs required by the T and R formulations. The use of the 50 kD dialysis membrane was more discriminating as it allowed to differentiate both the quantity and the speed of the tramadol release process. **Conclusion:** Modified-release formulations were obtained, which retain and prolong tramadol hydrochloride release to the reference medicine, which could reduce the daily dose frequency and help to comply with the analgesic treatment in patients with pain.

**Key words:** Opioids, analgesic, rheology, spectrophotometer, dialysis membrane, pain, poloxamer

**Citation:** Ortega, E., M.J. Bernad, J. Gracia, D. Vargas and L. Ocampo, 2021. *In vitro* release of new modified-release tramadol HCl designs and their rheological characterization. Int. J. Pharmacol., 17: 28-37.

**Corresponding Author:** Dinorah Vargas, Department of Physiology and Pharmacology, Veterinary Medicine School, National Autonomous University of Mexico, Mexico

**Copyright:** © 2021 Elizabeth Ortega *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the creative commons attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Competing Interest:** The authors have declared that no competing interest exists.

**Data Availability:** All relevant data are within the paper and its supporting information files.

## INTRODUCTION

One of the responsibilities of a veterinarian specialized in dogs and cats, besides attacking the origin of the disease, is to preserve the patient's quality of life, controlling pain<sup>1,2</sup>. Pain is defined as an unpleasant sensory experience for the animal indicating that there is damage or alteration to the integrity of the tissues and is administered with the purpose to obtain analgesia in several species, both domestic<sup>3,4</sup> and zoo<sup>5-8</sup>.

Within the analgesics, the tramadol has recently been used in clinics and hospitals of dogs and cats due to the safety it generates to manage mild pain to severe pain with minimal adverse effects<sup>9</sup>. Tramadol is characterized by being a bitter white crystalline powder, which has a solubility of 0.75 mg mL<sup>-1</sup>, is soluble in water and ethanol, has a molecular weight of 263.19 g mol<sup>-1</sup> and a visible detection of 272-279 nm<sup>10</sup>.

Papich and Kukanich<sup>11</sup> refer to therapeutic concentrations of tramadol hydrochloride in the blood of 0.5-1.7 hrs in plasma samples in dogs, being that at 6 hrs maximum therapeutic concentrations are obtained, so it is necessary to re-dose 3 or 4 times a day to cover overtime in the therapeutic window<sup>12</sup>. For this reason, the approach of this work is to obtain a formulation that maintains therapeutic plasma concentrations for a longer time compared to those formulations of conventional and immediate release and thus once again used in the clinic of dogs and cats that pain management in patients do not persist and patients have a favourable quality of life<sup>13,14</sup>.

Opioids are potent painkillers, such as morphine, fentanyl, buprenorphine and butorphanol, to name a few, but they have some adverse effects: Constipation, nausea, vomiting, sedation, itching and respiratory depression<sup>15</sup>. The advantage of tramadol is that its damaging effects are minimal or zero compared to other opioids. In this way, tramadol's long-acting is justified for clinical cases in small species<sup>10,16</sup>.

*In vitro*, modified-release studies have been published based on tramadol hydrochloride formulated with various polymers, including chitosan, carbopol, or poloxamer (407 or 188) added in different concentrations. In these studies, as the polymer concentration increases, the drug release time increases; however, it has only been possible to reach up to 24 hrs to release the active principle, compared to tramadol formulation without polymer<sup>17-20</sup>. Based on these published results, it was decided to work with poloxamer 407, increasing the percentage in the formulation ( $\geq 10\%$ ) to achieve a prolonged release of the drug at least two days, surpassing the predecessor and characterizing the formulations rheological viscosity analysis.

The poloxamer 407 (Pluronic F127) is a triblock copolymer of the type polyethylene oxide (hydrophobic portion), polypropylene oxide (hydrophobic portion) and polyethylene oxide (hydrophilic portion), which, when in contact with water, forms a gel<sup>18,21</sup>. They are non-ionic surfactants that are used in the pharmaceutical industry as excipients in various pharmaceutical formulations<sup>22</sup>. Poloxamer 407 provides an excellent drug delivery system to be used by different routes of administration and is compatible with other substances.

Poloxamer 407 is a negative thermosensitive hydrogel, which below a temperature is in the liquid state and its gelation occurs in the healing process when the so-called Critical Micellar Temperature is reached, it has been reported to be 24°C<sup>23</sup>, which allowed aqueous solutions at low concentrations to have the ability to self-organize in the form of micelles above the Critical Micellar Concentrations and Critical Micellar Temperature<sup>24-28</sup>.

This work's objective was to evaluate the *in vitro* release of a tramadol hydrochloride design that reaches a longer half-life compared to the commercial immediate-release formulation and then administer it in dogs in subsequent work. In this paper, the results of the rheological properties of tramadol formulations at different concentrations with poloxamer 407, which were carried out to predict their end-use properties, are also presented.

## MATERIALS AND METHODS

The release study was carried out at the Department of Physiology and Pharmacology, Veterinary Medicine Faculty, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico, from January-November, 2018.

The rheological study was carried out at the Department of Pharmacy, Chemistry Faculty, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico, from January-July, 2019.

**Materials:** Tramadol hydrochloride was donated from PISA Agropecuaria SA de CV (Mexico), poloxamer 407 commercially known as Pluronic F127 and the solution of HEPES from Sigma Aldrich® (St. Louis, MO) and Float-A-Lyzer (5 mL, 50 kDa MWCO cellulose ester) were obtained from Biotech (Mexico).

**Equipment:** An incubator with a shaker and programmed temperature (Hanchen, ES-60, Shanghai, China) was used in this study. This incubator was set to deliver a temperature of 38.0°C. The incubator's door was closed and samples were shaking to 100 rpm for 72 hrs (Fig. 1).

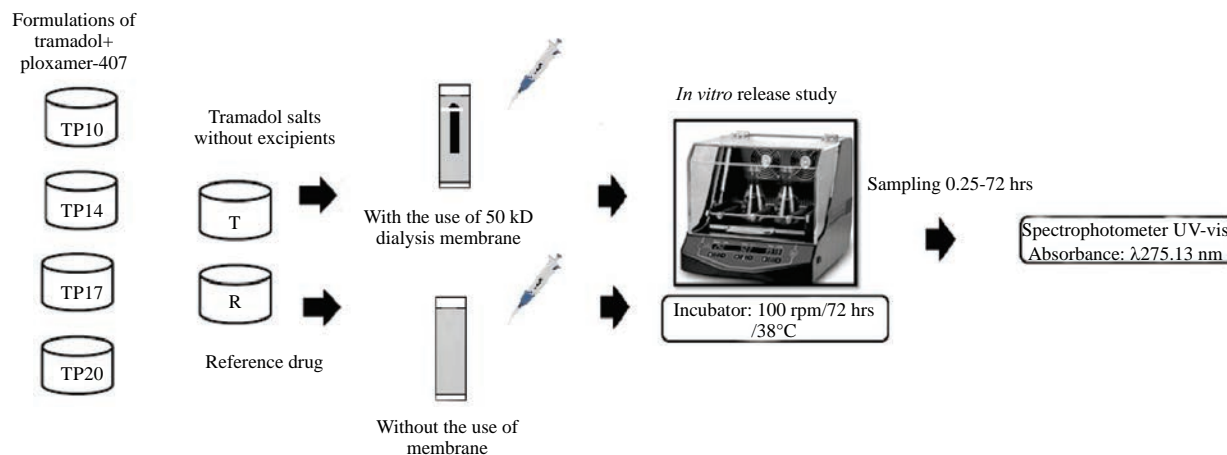


Fig. 1: *In vitro* release studies of tramadol formulations in the matrix system and compared with tramadol salts and reference drug

TP<sub>10</sub>, TP<sub>14</sub>, TP<sub>17</sub>, TP<sub>20</sub>: Formulations with poloxamer 407 at 10, 14, 17 and 20%, T: Without poloxamer, R: Reference drug

Equipment of Spectrophotometer S2000 (Ocean Optics, Inc., NY, USA) and a quartz cuvette with a 10 mm optical spectrophotometer. Obtaining a spectrum requires manually measuring the transmittance (see the Beer-Lambert Law) of the sample and solvent at each wavelength. The double-beam design greatly simplifies this process by measuring the transmittance of the sample and solvent simultaneously. The detection electronics can then manipulate the measurements to give the absorbance (Fig. 1).

A rheometer of controlled efforts Discovery HR-3 (TA-Instruments, DE, USA) Controlled efforts geometry: Concentric cylinders. Solutions were tested under linear viscoelastic time sweeps with simultaneous ultrasound application to monitor the gelation process. The resulting gel was characterized under linear oscillatory frequency sweeps and stress relaxation tests at room temperature (25, 38 and 45°C) (Fig. 1).

### Experimental method

#### Preparation of the formulation with pluronic 407 (F127):

The “cold method” was adopted for the preparation of thermo-reversible formulations of 5% tramadol hydrochloride and the required amount of poloxamer 407 (Pluronic F127, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO), according to the required formulation (10, 14, 17 and 20%) respectively, which was mixed according to Matthew's method for a final volume of 100 mL with deionized water<sup>29</sup>.

**A total of 6 formulations were prepared:** R is the Reference drug (Immediate Release 5% Tramadol Commercial Product). T (Tramadol without the addition of poloxamer), 5 g of tramadol was weighed on a precision

analytical balance PA124C (Ohaus, NJ, USA), then added to a 100 mL beaker in which 20 mL of deionized water was also added.

TP<sub>10</sub>, the above procedure was developed, then 10 g of poloxamer 407 (Plutonic F127) was weighed and carefully poured into the solution while stirring with a magnetic stirrer (IKA®, Staufen, Germany) deionized water was added to reach a 100 mL solution. The procedure was carried out in a cold room, using the “cold method”<sup>29</sup>.

For TP<sub>14</sub>, TP<sub>17</sub> and TP<sub>20</sub>, the same procedure was carried out; only the concentrations of poloxamer 407 (Pluronic F127) were varied at 14, 17 and 20% (Fig. 1).

#### ***In vitro* release using 50 kDa membranes:**

Based on the Xu *et al.*<sup>30</sup> technique, Float-A-Lyzer (5 mL, 50 kDa MWCO cellulose ester) were used and 0.5 mL of each formulation containing 5% of tramadol hydrochloride with 10% of poloxamer, 14, 17 and 20%, named: TP<sub>10</sub>, TP<sub>14</sub>, TP<sub>17</sub> and TP<sub>20</sub> respectively.

The release medium was into a baker with 333 mL of HEPES Buffer solution with a pH 7.4 at a temperature of 38°C with 100 rpm, then 3 mL of each of the formulations was taken at certain times that should be released in the solution with HEPES Buffer with a pH 7.4, the times of sampling were: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hrs, they have still incorporated 3 mL to HEPES Buffer solution again into the baker.

Dialysis membrane of 50 kDa was used for the release tests of each formulation with their three respective repetitions, considering the reference sample without the addition of the poloxamer (T) and the commercial product (R) presents an immediate or conventional release (Fig. 2a).

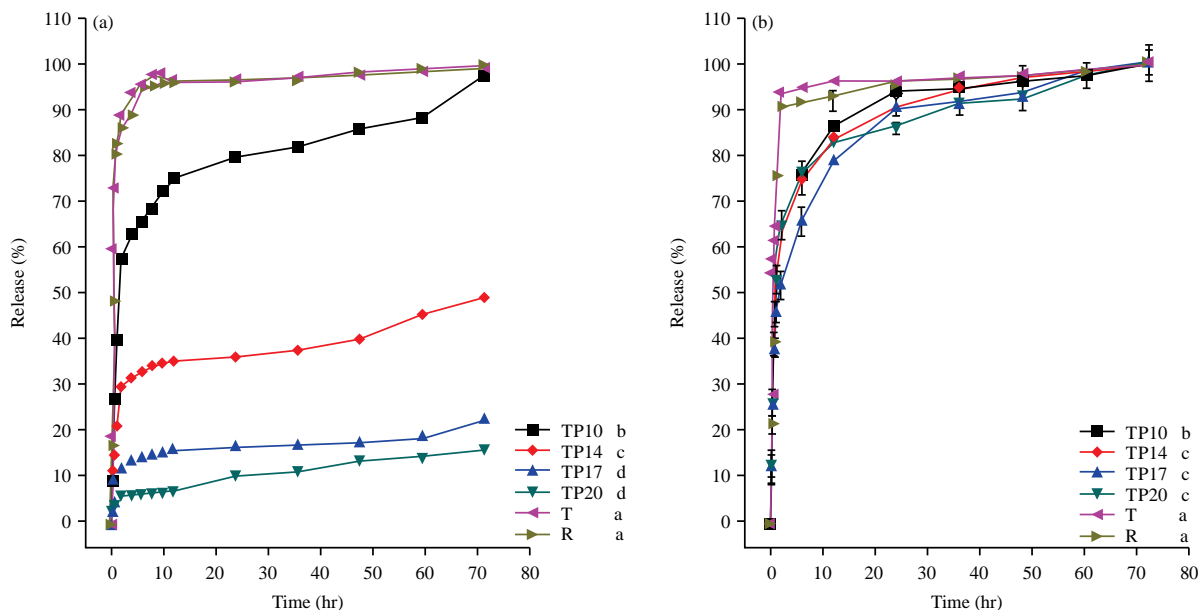


Fig. 2(a-b): Mean  $\pm$  SD release of tramadol HCL

(a) By using a Float-A-Lyzer (5 mL, 50 kDa MWCO cellulose ester and (b) Without using a membrane. The values (a-d) show the difference between groups, without a common letter, they differ significantly ( $p < 0.05$ ), obtained from the Tukey test

**In vitro release without uses of a membrane:** Based on the technique of Marcos *et al.*<sup>31</sup>, 0.5 mL of each formulation: TP<sub>10</sub>, TP<sub>14</sub>, TP<sub>17</sub> and TP<sub>20</sub> were placed in a 5 mL beaker, the release medium was 4 mL of HEPES Buffer Solution with a pH 7.4 at a temperature of 38 °C with 100 rpm, then 3 mL of each of the formulations were taken at certain times that must be released into the solution with HEPES Buffer, the sampling times were: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hrs.

As each of the samples was being obtained, 3 mL were added to the HEPES Buffer solution medium with a pH of 7.430 (Fig. 2b).

In this case, not a single dialysis membrane was used for the release tests of each of the formulations (Fig. 2b).

Note: The 3 mL sampling was carried out to recover the total concentration released from the formulation at each moment and to avoid supersaturation of the solvent. It was sought to control the Sink's conditions of the dissolution medium's volume and avoid that the concentration gradient controlled it<sup>20,28,32,33</sup>.

**Spectroscopic technique:** The tramadol calibration curve was prepared with concentrations of 0.001-0.15 mg mL<sup>-1</sup> in a HEPES buffer solution with a pH of 7.4.

Samples of each formulations TP<sub>10</sub>, TP<sub>14</sub>, TP<sub>17</sub>, TP<sub>20</sub>, T and R with and without membrane were analyzed through the Spectrophotometer S2000 (Ocean Optic, Inc, USA), the absorbance was measured at a wavelength of 273.13 nm (Fig. 1 and 2a-b).

Based on the study of Dos Santos *et al.*<sup>34</sup> to obtain the release efficiency concentration of tramadol, the next equation was considered:

$$\text{Release drug (\%)} = \frac{\text{Release group amount}}{\text{Actual drug content}} \times 100$$

**Rheology tests:** A rheological study was carried out using 6 formulations of tramadol at different temperatures: 25, 38 and 45 °C with a concentration of poloxamer at 17 and 20% named as TP<sub>17</sub> (25), TP<sub>17</sub> (38), TP<sub>17</sub> (45), TP<sub>20</sub> (25), TP<sub>20</sub> (38) and TP<sub>20</sub> (45 °C). Subsequently, samples of approximately 1 mL of the formula were collected at each of the referred temperatures (25, 38 and 45 °C), consecutively, they were stored in previously identified glass test tubes with a capacity of 10 mL, which were stored for later analysis. All rheological measurements were performed with controlled efforts geometry: Concentric cylinders, (Discovery HR-3. TA-Instruments) located in the Faculty of Chemistry, building F, area of Pharmaceutical Technology, National Autonomous University of Mexico, was used.

**Sample preparation for rheological analysis:** All formulations have 5% tramadol, as already mentioned. The drug's dosage was carried out individually according to the manufacturer's instructions and was calculated based on a proportional dose derived from what corresponds to a parenteral dose. in the dog (the target species): 5 mg kg<sup>-1</sup>.

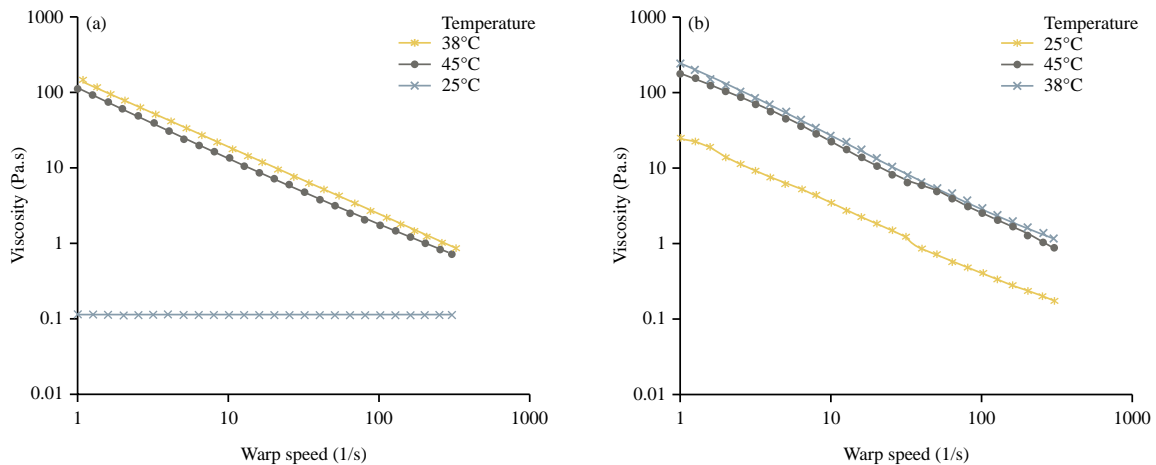


Fig. 3(a-b): Viscosity relationship at different temperatures for a poloxamer at different concentrations  
(a) Concentration at 17% and (b) Concentration at 20%

It was necessary to compare the analysis results with the temperatures of 25, 38 and 45°C because the tramadol formulation's viscosity is temperature-dependent. It is necessary to determine if gel formation will occur from the poloxamer 407 in the dogs' temperature (the target species), 38-39.5°C<sup>1</sup>. What did not happen with the other formulations (TP<sub>10</sub> and TP<sub>14</sub>)?

**Simple shear test:** Simple shear measurements were determined at temperatures of 38°C, over a cutting speed range of 0.1-1000 s<sup>-1</sup>. For this, a geometry of concentric aluminium cylinders (double Gap, internal cylinders diameters, 20.38 mm; external cylinders diameters, 21.96 and 59.5 mm height) was used for samples of the different formulations. The viscosity was estimated as a function of the cutting speed,  $\eta$  ( $\gamma$ ). Only the results obtained from the formulations TP<sub>17</sub> and TP<sub>20</sub> are presented, which presented a more prolonged release of tramadol in the chromatographic analysis (Fig. 3a-b).

For the TP<sub>17</sub> and TP<sub>20</sub> formulations, which had a sol-gel transition at 38°C, which is the body temperature of the dog (the target species), Frequency sweeps of the gels, were performed with tramadol and poloxamer with a concentration of 17 and 20% at 38°C to know the behaviour of the elastic modulus ( $G'$ ) compared to the viscous modulus ( $G''$ ) (Fig. 4a-b).

**Statistical analysis:** The release percentage of tramadol hydrochloride is reported through the mean and the standard deviation of formulations TP<sub>10</sub>, TP<sub>14</sub>, TP<sub>17</sub>, TP<sub>20</sub>, T and R were calculated using ANOVA tests. The Tukey test obtained the differences among the groups. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant with the software JMP®.

Data are reported as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). The normality of the data was determined by the Shapiro-Wilks test and the Tukey test's homogeneity. Comparisons were made with the ANOVA test and the differences between means by the Tukey test.

## RESULTS

The data of Fig. 1 shows the design of the *in vitro* release study where 6 formulations of tramadol hydrochloride 5% were designed in a matrix system based on poloxamer 407 at different concentrations (10, 14, 17 and 20%, T: no poloxamer and R: immediate-release tramadol commercial product). The formulations were administered inside a Float-A-Lyzer (50 kDa MWCO cellulose ester), which must be compared with each other. The release study was also carried out without using dialysis membranes in the respective sampling hours to read their absorbance in the spectrophotometer later.

The calibration curve was used to determine tramadol concentration and verify the analytical instrument's correct functioning, with a correlation coefficient of 0.9995, after applying the linear regression by least-squares adjustment.

In Fig. 2a, the release percentages of the tramadol formulation without the addition of excipient (T) and with the different concentrations of poloxamer (TP<sub>10</sub>, TP<sub>14</sub>, TP<sub>17</sub> and TP<sub>20</sub>) and with the commercial product (R) were compared, using a 50 kDa membrane. With the use of dialysis membranes, TP<sub>20</sub> and TP<sub>17</sub> formulations released 10-20% tramadol in 72 hrs, while the TP<sub>14</sub> formulation released 40% tramadol at 72 hrs and the TP<sub>10</sub> formulation released 70-80% at 72 hrs in comparison with the T and R formulations that reached 90-100% after 4 hrs. The statistically significant



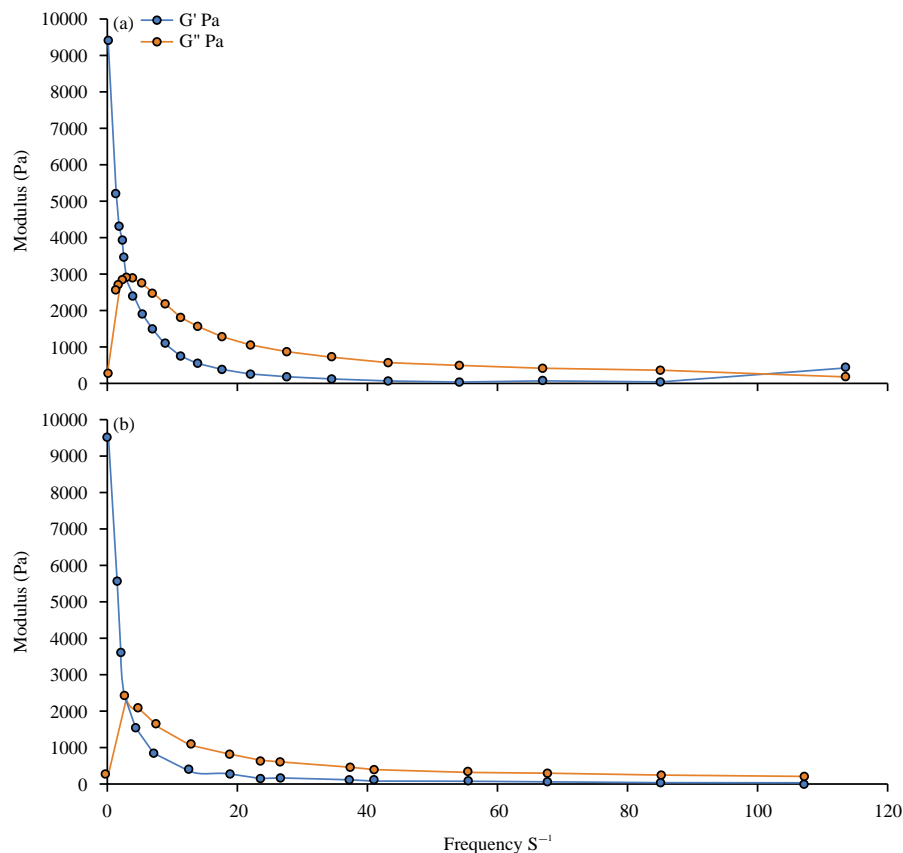


Fig. 4(a-b): Frequency sweeps of the gels with tramadol and poloxamer at 38 °C  
 (a) With a poloxamer concentration at 17% and (b) With a poloxamer concentration at 20%

difference between the groups is shown employing the Tukey test ( $p < 0.05$ ) through JMP Software® (Version 14. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2019): The four formulations with poloxamer 407 show a difference for T and R, they also offer a statistically significant difference between them, except for the TP<sub>17</sub> and TP<sub>20</sub>.

In Fig. 2b, the release study was performed without dialysis membrane, aliquots were only taken to check if the membrane material retained the release of tramadol hydrochloride in addition to poloxamer 407, the graph shows that the TP<sub>20</sub> and TP<sub>17</sub> formulations released 95-100% at 72 hrs and the TP<sub>14</sub> and TP<sub>10</sub> formulation achieved a release at 48 hrs in comparison with the T and R formulation that reached 98% after 2 hrs. Based on the results of Fig. 2b, the concentration of tramadol hydrochloride release in percentage shows that the concentration of poloxamer 407 is inversely proportional to the percentage release of each formulation. The figure shows the statistical analysis through the ANOVA test. The differences between means of the different concentrations of poloxamer 407 without dialysis membrane compared to tramadol hydrochloride without the addition of poloxamer and with the commercial formulation with a significant

difference of  $p < 0.05$ ; meanwhile, TP<sub>10</sub> is the only formulation with significant differences compared with the rest of formulations, using JMP Software®.

**Rheological results:** The result of Fig. 3a-b show the rheological analysis and the oscillatory flow of the formulations TP<sub>17</sub> and TP<sub>20</sub>, which occurred at the different manipulated temperatures (25, 37 and 45 °C).

The result of Fig. 3a shows the relationship with the deformation rate and viscosity for the concentration at the different temperatures managed for the 17% poloxamer concentration; the behaviour of the simple shear flow is shown, which the formulation sample exhibits, with a poloxamer concentration of 17% at a temperature of 38 and 45 °C, the sol-gel transition is formed, the result is a non-newtonian fluid, indicating that, the viscosity increases, when the temperature deformation rate increases, which does not occur with the formulation at a temperature of 25 °C, therefore the formulation with a poloxamer concentration of 17% at 25 °C behaves like a Newtonian fluid, which is a fluid where the representation of the shear stress is a function of the reaction rate, creating a straight line as shown.

In Fig. 3b, for the 20% poloxamer concentration, there is a relationship between the strain rate and the viscosity, which indicates that it increases and so does the sol-gel transition. Therefore, at a higher concentration and even at lower temperatures below average body temperature <math>38^{\circ}\text{C}</math>, the sol-gel transition occurs, it shows the relationship between the viscosity of the designed formulation (Pascals per second) and the cutting speed ( $1\text{ s}^{-1}$ ) at three different temperatures (25, 38 and  $45^{\circ}\text{C}$ ) with a poloxamer concentration of 20%. In this case, the simple shear flow behaviour exhibited by the formulation sample with a poloxamer concentration of 20% at the three temperatures: 25, 38 and  $45^{\circ}\text{C}$  are non-Newtonian.

Rheological results with sol-gel optimum temperature and viscosity measurements demonstrated that poloxamer 407 gels are pseudoplastic; therefore, when the strain sweep flow deforms it, its viscosity decreases.

Time sweeps were performed with blank solutions with and without an active agent (tramadol), recording the elastic modulus as a function of time. The resulting gel was characterized under linear oscillatory frequency sweeps and stress relaxation tests at room temperature ( $25^{\circ}\text{C}$ ) with a controlled-stress rheometer (AR-1000 TA Instruments).

The result of Fig. 4a-b show the oscillatory flow analyzes at a temperature of  $38^{\circ}\text{C}$  of the TP<sub>17</sub> and TP<sub>20</sub> formulations, respectively, recording the modulus of elasticity as a function of time.

The result of Fig. 4a shows a predominant viscous behaviour at the start of the test, with the viscous modulus ( $G''$ ) dominating the elastic modulus ( $G'$ ), as expected for a viscous liquid.

The concentration of poloxamer 407 with 17% shows that the sol-gel transition temperature is the point where the dynamic modules  $G'$  and  $G''$  intersect, unlike Fig. 4b, which presents the TP<sub>20</sub>, where it is not possible to observe the intersection.

## DISCUSSION

According to the results obtained during this study, tramadol hydrochloride, in addition to poloxamer 407, forms micelles that are due to the sol-gel transition, depending on the concentration and temperature of each formulation<sup>33</sup>. This is confirmed with the viscosity results obtained with the 17% formulation at temperatures of 38 and  $42^{\circ}\text{C}$  and with the 20% formulation at a temperature of  $25^{\circ}\text{C}$  (Fig. 3a-b).

The commercial formulation of tramadol for dogs is known to have a concise analgesic effect, around 4-6 hrs. Researchers have tried to reformulate tramadol to find a prolonged-release. In studies published by Papini and Barati,

they used 10% tramadol, when it used carbopol and chitosan for its formulation, it did not achieve the prolonged release of the active principle; however, when using poloxamer 407 at a 10% concentration, it was able to maintain therapeutic concentrations for 24 hrs<sup>17,18</sup>.

On the other hand, in the study by Mendonca, who formulated tramadol with 20% poloxamer, 60% of the active principle was released; in the 30% poloxamer formulation, it released 30% tramadol and in the 35% poloxamer formulation, it released 24% tramadol. All of the above was achieved at 24 hrs<sup>34</sup>.

Considering these published results, in this project, it was decided to use poloxamer but with concentrations of 10, 14, 17 and 20% to find prolongation of the release of tramadol to 5% since it is the required dose for dogs that is the target species.

In the present *in vitro* release study, a 50 kDa dialysis membrane was used, with which the release was quantified up to 72 hrs, obtaining the following results: Formulations TP<sub>20</sub> and TP<sub>17</sub> released about 10-20% tramadol at 72 hrs. The TP<sub>14</sub> formulation released 40% of tramadol at 72 hrs and the TP<sub>10</sub> formulation released about 70-80% at 72 hrs compared to the T and R formulations, which reached about 90-100% after 4 hrs (Fig. 2a).

Meanwhile, formulations in which dialysis membranes were not used, such as TP<sub>20</sub> and TP<sub>17</sub>, released around 95-100% at 72 hrs. The TP<sub>14</sub> and TP<sub>10</sub> formulations achieved a release at 48 hrs compared to T and R, which reached 90% after 2 hrs. Therefore, this study's results are in agreement with those established by Papini and Mendonca<sup>18,34</sup> (Fig. 2b).

The positive results found in the present work can be explained because a prolonged release of tramadol was achieved by varying the concentrations of poloxamer and exposing them to different temperatures; the poloxamer is thermoreversible since at low temperatures, both the polymer fractions, called: PPO like PEO are soluble in water. When the temperature is increased, the PPO units dehydrate and add, creating a micellar nucleus while the PEO units are hydrophilic, forming the micellar nucleus and remaining hydrated<sup>14,35,36</sup>.

Micellization occurs in dilute solutions of block copolymers in selected solvents above the critical micellar concentration at a given temperature. At higher concentrations, above a critical gel concentration, micelles can be arranged in a network<sup>23,37</sup>.

It can be said that the poloxamer concentration is inversely proportional to the release of the drug in the medium, resulting in a release of almost 70% at 72 hrs for the formulation containing 17% poloxamer, so for future studies *in vivo*, this formulation should be used as prolonged-release was achieved.

The data of Fig. 3a-b show the formulations' deformation sweep flow with poloxamer concentration of 17 and 20%. The result is a non-Newtonian fluid, which indicated that the viscosity at 38 and 45°C decreases when the deformation speed increases. However, having a formulation at 25°C said fluid behaves like a Newtonian fluid. A fluid with representative shear stress works as a function of the deformation sweep speed, developing a straight line, as indicated in Fig. 4, comparing the generally observed behaviour. Coincide with that published by Wszolek<sup>38</sup> and Wang<sup>22</sup> means that the apparent viscosity decreases with increasing strain sweep flow.

On the other hand, taking into account Ricci's research, which shows his rheological results with measurements of viscosity and optimum sol-gel temperature and it is shown that poloxamer 407 gels are pseudoplastic; therefore, when the strain sweep flow deforms it, its viscosity decreases. Furthermore, taking into account Ricci's work in conjunction with the results of the same investigation, it was determined that the sol-gel transition temperature decreases with increasing polymer concentration, in this case, the concentration of poloxamer 407 with 17 and 20%<sup>39,40</sup>.

Poloxamer concentrations of 17 and 20% at temperatures of 38 and 45°C showed changes in viscosity, due to the rupture of the internal structure of the fluid, so the viscosity is affected from 38°C, which is an optimal temperature for the transition from the formulation to sol-gel, according to rheology and release studies, the body temperature of the dogs (>38°C).

The viscosity alteration determines that the transition of the formulation from liquid to sol-gel meets the established objective of being a thermo-reversible gel to form micelles related to temperatures and citric concentrations. The same results were observed in the *in vitro* release and rheology<sup>41,42</sup>. (Fig. 3a-b).

With the present study, it was possible to predict, through *in vitro* release studies, to find a prolonged-release formulation of tramadol hydrochloride before conducting *in vivo* tests.

A modified-release formulation of tramadol was obtained from a polymeric matrix that achieved a prolonged release of the active ingredient compared to the formulation designed without poloxamer and the reference formulation. The release profiles of all the test formulations obtained in the present work were not considered similar to the reference drug profile and the formulation without excipient ( $p < 0.05$ ). With the administration of a single dose of the designed prototype, the analgesic's therapeutic concentrations are expected to remain for 72-100 hrs, which reduces the animal's assistance and allows compliance with the treatment.

This project involved the performance of characterization tests of new formulations of modified release tramadol, the release results and rheological properties of the formulations were also presented. The applications of the studies developed are to predict the end-use properties of the designed formulations. This study contributed to discovering new modified-release opioid formulations that will help the researcher discover critical areas in the design, development and characterization of small pet pain relievers that many researchers have failed to explore.

The authors recommend that it is convenient to carry out *in vivo* studies to establish the proposed release methodology's predictive capacity. In further research, selected formulations can be evaluated in the target species, which could confirm and overcome the limitations that *in vitro* results have.

## CONCLUSION

This study's objective was to design an *in vitro* system before conducting *in vivo* tests on the target species to ensure the sustained release behaviour of tramadol hydrochloride.

According to the results obtained, a modified-release formulation of tramadol was achieved from a polymeric matrix that performs a prolonged release of the active ingredient compared with the formulation designed without poloxamer and the formulation of the commercial product, which could allow with a single dose of the formula. The therapeutic concentrations of the analgesic remain for more than 72 hrs and it can even last up to 100 hrs (4 days), which reduces the handling of the animal and allows compliance with the treatment.

## SIGNIFICANCE STATEMENT

This study reveals that the 5% tramadol HCl formulations incorporated into poloxamer 407, in concentrations of 17 and 20%, allowed a prolonged release of the drug up to 72 hrs, exceeding 3 times the release time of tramadol without excipient (T) and the reference drug (R). ( $p < 0.05$ ). This study will help researchers to discover critical areas in the formulation of drugs with associated excipients.

## ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank Erik Bautista Quintero Student of the Faculty of Chemistry at the National Autonomous University of Mexico for their support in performing the rheology tests during the progress of this study as well as

María Josefa Bernad Bernad (PhD) for allowing us to use her Laboratory and its equipment. Additionally, we would like to thank Sara del Carmen Caballero Chacón (PhD) for allowing us the use of the laboratory equipment under her responsibility in the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, National Autonomous University of Mexico. We would also like to thank PISA Agropecuaria SA de CV for contributing to the donation of the drug.

## REFERENCES

1. Subedi, M., S. Bajaj, M.S. Kumar and Y.C. Mayur, 2019. An overview of tramadol and its usage in pain management and future perspective. *Biomed. Pharmacother.*, 111: 443-451.
2. Kukanich, B. and M.G. Papich, 2011. Pharmacokinetics and antinociceptive effects of oral tramadol hydrochloride administration in Greyhounds. *Am. J. Vet. Res.*, 72: 256-262.
3. Savadkoobi, H. and N. Vesal, 2019. The analgesic interaction of tramadol and morphine in rats: An isobolographic study. *Vet. Res. Forum.*, 10: 31-36.
4. Evangelista-Vaz, R., A. Bergadano, M. Arras and P.D. Jirkof, 2018. Analgesic efficacy of subcutaneous-oral dosage of tramadol after surgery in C57BL/6J mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 57: 368-375.
5. Black, P.A., S.K. Cox, M. Macek, A. Tieber and R.E. Junge, 2010. Pharmacokinetics of tramadol hydrochloride and its metabolite o-desmethyl tramadol in peafowl (*Pavo cristatus*). *J. Zoo. Wildl. Med.*, 41: 671-676.
6. Kilburn, J.J., S.K. Cox, J. Kottyan, A.N. Wack and E. Bronson, 2014. Pharmacokinetics of tramadol and its primary metabolite o-desmethyltramadol in African penguins (*Spheniscus demersus*). *J. Zoo. Wildl. Med.*, 45: 93-99.
7. Souza, M.J., D.S.M. Guzman, J.R. Paul-Murphy and S.K. Cox, 2012. Pharmacokinetics after oral and intravenous administration of a single dose of tramadol hydrochloride to hispaniolan Amazon parrots (*Amazona ventralis*). *Am. J. Vet. Res.*, 73: 1142-1147.
8. Baker, B.B., K.K. Sladky and S.M. Johnson, 2011. Evaluation of the analgesic effects of oral and subcutaneous tramadol administration in red-eared slider turtles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 238: 220-227.
9. Kögel, B., R. Terlinden and J. Schneider, 2014. Characterisation of tramadol, morphine and tapentadol in an acute pain model in Beagle dogs. *Vet. Anaest. Analg.*, 41: 297-304.
10. Riviere, J.E. and M.G. Papich, 2017. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 10th Edn., John Wiley & Sons, USA, ISBN: 9781118855829, Pages: 281-323.
11. Kukanich, B. and M.G. Papich, 2004. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyl tramadol in dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 27: 239-246.
12. Vettorato, E., A. Zonca, M. Isola, R. Villa and M. Gallo *et al.*, 2010. Pharmacokinetics and efficacy of intravenous and extradural tramadol in dogs. *Vet. J.*, 183: 310-315.
13. Barter, L.S., 2011. Rabbit analgesia. *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.*, 14: 93-104.
14. Giral, M., D.C. García-Olmo, M. Gómez-Juárez and I.A.G. de Segura, 2014. Anaesthetic effects in the ferret of alfaxalone alone and in combination with medetomidine or tramadol: A pilot study. *Lab. Anim.*, 48: 313-320.
15. Vazzana, M., T. Andreani, J. Fangueiro, C. Faggio and C. Silva *et al.*, 2015. Tramadol hydrochloride: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, adverse side effects, co-administration of drugs and new drug delivery systems. *Biomed. Pharmacother. J.*, 70: 234-238.
16. Epstein, M., I. Rodan, G. Griffenhagen, J. Kadrlík, M. Petty, S. Robertson and W. Simpson, 2015. AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 51: 67-84.
17. Barati, M., S.M. Samani, L.P. Jahromi, H. Ashrafi and A. Azadi, 2018. Controlled-release in-situ gel forming formulation of tramadol containing chitosan-based pro-nanogels. *Int. J. Biol. Macromol.*, 118: 1449-1454.
18. Papini, J.Z.B., C.M.S. Cereda, J.P. Júnior, S.A. Calafatti, D.R. de Araújo and G.R. Tofoli, 2017. Pharmacokinetics and pharmacodynamics evaluation of tramadol in thermoreversible Gels. *Bio. Med. Res. Int.*, 2017: 1-7.
19. Balakrishnan, P., E.K. Park, C.K. Song, H.J. Ko, T.W. Hahn, K.W. Song and H.J. Cho, 2015. Carbopol-incorporated thermoreversible gel for intranasal drug delivery. *Molecules*, 20: 4124-4135.
20. Liu, Y., W.L. Lu, J.C. Wang, X. Zhang and H. Zhang *et al.*, 2007. Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermosensitive Pluronic F127 hydrogel for subcutaneous administration: *In vitro* and *in vivo* characterization. *J. Controlled Release*, 117: 387-395.
21. Yu, L. and J. Ding, 2008. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chem. Soc. Rev.*, 37: 1473-1481.
22. Wang, J., L.Q. Zhang, H. Chi and S. Wang, 2016. An alternative choice of lidocaine-loaded liposomes: Lidocaine-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for local anesthetic therapy. *Drug. Deliv.*, 23: 1254-1260.
23. Deore, R.K., K. Kavitha and T.G. Tamizhmani, 2010. Preparation and evaluation of sustained release matrix tablets of tramadol hydrochloride using glyceryl palmitostearate. *Trop. J. Pharmaceut. Res.*, 9: 275-281.
24. Subramanian, K.G. and V. Vijayakumar, 2012. Synthesis and evaluation of chitosan-graft-poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-itaconic acid) as a drug carrier for controlled release of tramadol hydrochloride. *Saudi. Pharm. J.*, 20: 263-271.
25. Arjunan, V., R. Santhanam, M.K. Marchewka and S. Mohan, 2014. Comprehensive quantum chemical and spectroscopic (FTIR, FT-Raman, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR) investigations of O-desmethyltramadol hydrochloride an active metabolite in tramadol-An analgesic drug. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 122: 315-330.

26. Mayol, L., M. Biondi, S. Quaglia, S. Fusco, A. Borzacchiolo, L. Ambrosio and M.I. La Rotonda, 2011. Injectable thermally responsive mucoadhesive gel for sustained protein delivery. *Biomacromolecules*, 12: 28-33.
27. Klouda, L. and A.G. Mikos, 2008. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 68: 34-45.
28. Nascimento, M.H.M., M.K.K.D. Franco, F. Yokaichyia, E. de Paula, C.B. Lombello and D.R. de Araujo 2018. Hyaluronic acid in Pluronic F-127/F-108 hydrogels for postoperative pain in arthroplasties: Influence on psycho-chemical properties an structural requirements for sustained drug-release. *Int. J. Biol. Macrol.*, 111: 1245-1254.
29. Matthew, J.E., Y.L. Nazario, S.C. Roberts and S.R. Bhatia, 2002. Effect of mammalian cell culture medium on the gelation properties of Pluronic F127. *Biomaterials*, 23: 4615-4619.
30. Xu, X., M.A. Khan and D.J. Burgess, 2012. A two-stage reverse dialysis *in vitro* dissolution testing method for passive targeted liposomes. *Int. J. Pharm.*, 426: 211-218.
31. Marcos, X., S. Pérez-Casas, J. Llovo, A. Concheiro and C. Alvarez-Lorenzo, 2016. Poloxamer-hydroxyethyl cellulose- $\alpha$ -cyclodextrin supramolecular gels for sustained release of griseofulvin. *Int. J. Pharm.*, 500: 11-19.
32. Akkari, A.C.S., J.Z.B. Papini, G.K. Garcia, M.K.K.D. Franco and L.P. Cavalcanti *et al.*, 2016. Poloxamer 407/188 binary thermosensitive hydrogels as delivery systems for infiltrative local anesthesia: Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation. *Mater. Sci. Eng. C*, 68: 299-307.
33. Guzálin, M., M.R. Aberturas, F. Garcia and J. Molpeceres, 1994. Gelatine gels and polyoxyethylene-polyoxypropylene gels: Comparative study of their properties. *Drug. Dev. Ind. Phar.*, 20: 2041-2048.
34. dos Santos, A.C., A.C. Akkari, I.R. Ferreria, C.R. Maruyama and M. Pascoli *et al.*, 2015. Poloxamer-based binary hydrogels for delivering tramadol hydrochloride: Sol-gel transition studies, dissolution-release kinetics, *in vitro* toxicity and pharmacological evaluation. *Int. J. Nanomedicine.*, 10: 2391-2401.
35. Bhattacharjee, G., G. Verma, V.K. Aswal, V. Patravale and P.A. Hassan, 2013. Microstructure, drug binding and cytotoxicity of Pluronic P123-aerosol OT mixed micelles. *RSC Adv.*, 3: 23080-23089.
36. Alvarez-Lorenzo, C., J. Gonzalez-Lopez, M. Fernandez-Tarrio, I. Sandez-Macho and A. Concheiro, 2007. Tetronic micellization, gelation and drug solubilization: Influence of pH and ionic strength. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 66: 244-252.
37. Peng, S., Y.J. Lin, M.H. Cheng, C.W. Wu and I.M. Chu, 2016. A cell-compatible PEO-PPO-PEO (Pluronic®)-based hydrogel stabilized through secondary structures. *Mater. Sci. Eng. C*, 69: 421-428.
38. Wszolek, M., A.Y. Tamime, D.D. Muir and M.N.I. Barclay, 2001. Properties of kefir made in scotland and poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. *LWT-Food Sci. Technol.*, 34: 251-261.
39. Ricci, E.J., M.V. Bentley, M. Farah, R.E. Bretas and J.M. Marchetti, 2002. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 17: 161-167.
40. Derakhshandeh, K., M. Fashi and S. Seifoleslami, 2010. Thermosensitive pluronic hydrogel: Prolonges injectable: Prolonged injectable formulation for drug abuse. *Drug. Des. Devel. Ther.*, 4: 255-262.
41. Maderuelo, C., A. Zaruelo and J.M. Lanao, 2011. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *J. Controlled Release*, 154: 2-19.
42. Mabrouk, M., H.H. Beherei, S. ElShebiny and M. Tanaka, 2018. Newly developed controlled release subcutaneous formulation for tramadol hydrochloride. *Saudi. Pharm. J.*, 26: 585-592.

# ***In vitro* release of new designs of modified-release tramadol hydrochloride included in a polymer matrix**

**Elizabeth Ortega Molina<sup>1</sup>, Maria Josefa Bernad Bernad<sup>2</sup>, Jesus Gracia Mora<sup>3</sup>, Dinorah Vargas Estrada<sup>1\*</sup> and Luis Ocampo Camberos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Physiology and Pharmacology department, Veterinary Medicine School, National Autonomous University of Mexico, Universidad 3000, Circuito Exterior S/N Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad Universitaria. CD.MX. México

<sup>2</sup>Pharmaceutical Technology, Chemistry Faculty, National Autonomous University of Mexico, Universidad 3000, Circuito Exterior S/N Coyoacán, C.P. 04510. Ciudad Universitaria. CD.MX. México

<sup>3</sup>Inorganic Chemistry Department, Chemistry Faculty. National Autonomous University of Mexico, Mexico Universidad 3000, Circuito Exterior S/N, Coyoacán, C.P. 04510. Ciudad Universitaria. CD.MX. Mexico

**Abstract:** Tramadol reaches therapeutic plasma concentrations in a time interval of 0.5 to 1.7 hours, so it is necessary to dose 4 times/day, which reduces compliance with the dose and the effectiveness of the treatment. Design formulations of tramadol that allow the release time to be prolonged, surpassing those obtained with the commercial product and tramadol without excipients. Several formulations of 5% tramadol hydrochloride were designed in a matrix system based on poloxamer 407 at different concentrations (10%, 14%, 17%, and 20%). *In vitro* release studies were performed, using a spectrophotometer at a wavelength of 273.15 nm; were compared the results with tramadol without polymeric supplements and with the commercial formulation samples were taken in a period of time from 0.25 to 72 hours, and also compared the use or absence of dialysis membrane with a porosity of 50 kilodaltons was. With the use of the membrane, the designed formulations had a release of 98%, 50%, 23%, 16% at 72 hours, respectively, different from the commercial product and the tramadol formulation without excipients released the 24 hours. Without using dialysis membranes, a 90-100% release was achieved in the 10% and 14% formulation at 36 hours. The 17% and 20% formulation at 48 hours and the commercial formulation and tramadol without excipient were released within 2 hours. Modified release formulations were obtained, which retain and prolong the release of tramadol compared to the commercial product. Therefore, we propose to conduct further *in vivo* model experiments to confirm our conclusion.

**Keywords:** Tramadol, release, polymer matrix, *in vitro*, spectrophotometer, membrane, concentrations.

## **INTRODUCTION**

A veterinarian specialized in dogs and cats, as part of his responsibilities besides attacking the origin of the disease, controls pain to preserve the patient's quality of life (Subedi *et al.*, 2018, Giudice *et al.*, 2017). Pain is defined as an unpleasant sensory experience for the animal indicating that there is damage or alteration to the integrity of the tissues and is administered with the purpose to obtain analgesia in several species, both domestic (Taylor *et al.*, 2016; Wolfe and Kennedy, 2015) and zoo (Black *et al.*, 2010; Kilburn *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2012, Baker *et al.*, 2011).

Recently, among the analgesics available on the market, tramadol has been used in clinics and hospitals for dogs and cats due to the safety it generates to manage mild to severe pain with minimal adverse effects (Kögel *et al.*, 2014). Tramadol is characterized by being a bitter white crystalline white powder, which has a solubility of 0.75 mg/mL, is soluble in water and ethanol, has a molecular weight of 263.19 g/mol and a visible detection of 272-279 nm (KuKanich and Papich, 2017).

Papich and Kukanich (2004) refer to therapeutic

\*Corresponding author: e-mail: dinorah.vestrada@gmail.com

concentrations of tramadol hydrochloride in the blood of 0.5-1.7 hours in plasma's samples in dogs, being that at 6 hours maximum therapeutic concentrations are obtained, so it is necessary to re-dose 3 or 4 times a day to cover over time in the therapeutic window (Schütter *et al.*, 2017). For this reason, the approach of this work is to obtain a formulation that maintains therapeutic plasma concentrations for a longer time compared to those formulations of conventional and immediate release and thus once again used in the clinic of dogs and cats that pain management in patients do not persist and patients have a favorable quality of life (Barter, 2011; Giral *et al.*, 2014).

The advantage of tramadol is that its adverse effects are minimal or zero compared to other opioids (Vazzana *et al.*, 2015). In this way a long-acting tramadol is justified for clinical cases in small species (KuKanich and Papich 2017; Schütter *et al.*, 2017).

Studies of modified release have been published, based on tramadol hydrochloride with 0.5% chitosan, with carbopol 934-P at 0.7% and with poloxamer 407 at 10%, which reached plasma concentrations up to 12 hours in the formulation by using chitosan and carbopol and 24 hours

within poloxamer 407 (Gaitán, 2010). Based on these results, it was decided to work with poloxamer 407, increasing the percentage in the formulation in order to achieve a prolonged release of the drug, which exceeds the predecessor.

The poloxamer 407 (Pluronic F127) is a triblock copolymer of the type polyethylene oxide (hydrophobic portion), polypropylene oxide (hydrophobic portion) and polyethylene oxide (hydrophilic portion) which when in contact with water forms a gel (Balakrishnan *et al.*, 2015; Youn, *et al.*, 2021; Yu and Di, 2008). They are non-ionic surfactants that are used in the pharmaceutical industry as excipients in various pharmaceutical formulations (Wang *et al.*, 2016). Poloxamer 407 provides an excellent drug delivery system to be used by different routes of administration and is compatible with different substances.

The poloxamer at higher concentrations results in a multimolecular aggregate consisting of a hydrophobic core with polypropylene oxide chains and a hydrophilic crown (Peng *et al.*, 2016; Derakhshanden *et al.*, 2010; Maderuelo *et al.*, 2011). Micellization occurs only in dilute solutions of copolymer blocks above the Critical Micellar Concentrations. At higher concentrations above the Critical Micellar Concentration of the gel the micelles can be added within a network (Mabrouk *et al.*, 2018; Yap and Yang, 2016; Volkmer *et al.*, 2013). The P-407 polymer aggregation process is promoted by increasing the temperature and its concentrations. The micellization is presented above the Critical Micellar Concentration and the Critical Micellar Temperature thus having a slow release favorable to the pharmaceutical industry (Dos Santos *et al.*, 2015; Gao, *et al.*, 2016).

Considering that the short half-life of tramadol can be modified by increasing the exposure of the drug and avoiding re-dose 4 times a day, for cases of mild or moderate pain in patients who require it, it is necessary to design a modified release system while maintaining treatment within the therapeutic margin (Escobar-Chávez *et al.*, 2006; Galgatte and Chaudhari, 2014; Arranja *et al.*, 2016). Recently, among the analgesics available on the market, tramadol has been used in clinics and hospitals for dogs and cats due to the safety it generates to manage mild to severe pain with minimal adverse effects. (Dos Santos *et al.*, 2015; Guzálin *et al.*, 2009; Giorgi *et al.*, 2009).

Poloxamer 407 is a negative thermosensitive hydrogel, which below a temperature is in the liquid state and its gelation occurs in the heating process when the so-called Critical Micellar Temperature is reached, it has been reported to be 24°C (Deore *et al.*, 2010), which allowed aqueous solutions at low concentrations to have the ability to self-organize in the form of micelles above the Critical

Micellar Concentrations and Critical Micellar Temperature (Subramanian and Vijayakumar, 2012; Arjunan *et al.*, 2014; Dumortier *et al.*, 2006; Klouda and Mikos, 2008; Al-Soufi *et al.*, 2012).

The objective of this work was to evaluate the *in vitro* release of a tramadol hydrochloride design that achieves a longer half-life compared to the commercial formulation. The results of the rheological properties of the designed formulations are also presented.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Tramadol hydrochloride was donated from PISA Agropecuaria SA de CV (Mexico), poloxamer 407 commercially known as Pluronic F127 from Sigma Aldrich (Mexico) and 50 kDa dialysis were obtained through an IBI Scientific distributor, ® the solution of HEPES by Sigma Aldrich.

### Equipment

An incubator with shaker and programmed temperature, model: ES-60/ES-60 + /ES-60E, serial number: MU36SM, located in the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, National Autonomous University of Mexico.

A rheometer of controlled efforts Discovery HR-3 (TA-Instruments) Controlled efforts geometry: concentric cylinders, located in the Faculty of Chemistry, building F, area of Pharmaceutical Technology, National Autonomous University of Mexico.

Equipment of Spectrophotometer S2000, DT-1000CE-BT tungsten light source (Ocean Optics, Inc., USA) and a quartz cuvette with a 10 mm optical spectrophotometer, located in the Faculty of Chemistry, building F, area of Pharmaceutical Technology, National Autonomous University of Mexico.

### Experimental method, release tests

#### Formulation preparation with Pluronic 407 (F127)

The “cold method” (Gao, *et al.*, 2016) was adopted for the preparation of the 5 % tramadol hydrochloride thermo-reversible formulations, the required amount of poloxamer 407 (Pluronic F127, Sigma Aldrich ®) for the formulation was 10%, 14%, 17% and 20% respectively, which was mixing according to Matthew’s method (Matthew *et al.*, 2002) for a final volume of 100 mL with deionized water in the laboratory of Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico city.

#### *In vitro* release using of 50 kDa membranes

Based on the Xu *et al.*, (2012) technique, 50 kDa membranes (Sigma Aldrich ®) were used and 0.5 mL of each formulation containing 5% of tramadol

hydrochloride with 10% of poloxamer, 14%, 17% and 20%, named: TP10, TP14, TP17 and TP20 respectively, and were compared the results with tramadol without polymeric supplements (T) and with the commercial formulation samples (TC)

The release medium was into a baker with 333 mL of HEPES Buffer solution with a pH 7.4 at a temperature of 38°C with 100 rpm, then 3 mL of each of the formulations was taken at certain times that should be released in the solution with HEPES Buffer with a pH 7.4, the times of sampling were: 0.25 hours, 0.5 hours, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 10 hours, 12 hours, 24 hours, 36 hours, 48 hours, 60 hours and 72 hours, they were still incorporated 3 mL to HEPES Buffer solution again into the baker (fig. 1).

Dialysis membrane of 50 kDa was used for the release tests of each of the formulations with their three respective repetitions, also considering the reference sample without the addition of the poloxamer (T) and the commercial product (TC) that presents an immediate or conventional release.

#### ***In vitro* release without use of a membrane**

Based on the Marcos technique, 0.5 mL of each formulation: TP10, TP14, TP17 were placed in a 5 mL baker (Marcos, 2016), the release medium were 4 mL of HEPES Buffer solution with a pH 7.4 at a temperature of 38°C with 100 rpm, then 4 mL of each of the formulations was taken at certain times that should be released in the solution with HEPES Buffer with a pH 7.4, the times of sampling were: 0.25 hours, 0.5 hours, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 10 hours, 12 hours, 24 hours, 36 hours, 48 hours, 60 hours and 72 hours, they were still incorporated 4 mL to HEPES Buffer solution again into the baker.

In this case no one membrane of dialysis was used for the release tests of each of the formulations, for this case we compared both types of formulations.

#### ***Spectroscopic technique***

Samples of each of the formulations TP10, TP14, TP17, TP20, T and TC with and without membrane were analyzed through the Spectrophotometer S2000 (Ocean Optic, Inc, USA), the absorbance was measured in a wavelength of 273.13 nm. (fig. 2-3)

### **STATISTICAL ANALYSIS**

The percentage of release of tramadol hydrochloride is reported with the average plus the standard deviation of the formulation of TP10, TP14, TP17, TP20, T and TC were calculated using one way ANOVA tests. The differences between the groups were obtained by the Tukey test. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant with the software JMP® (Version 14. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2019).

Data are reported as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). The normality of the data was determined by the Shapiro-wilks test and the homogeneity of the variations by the Tukey test comparisons were made with the ANOVA test and the differences between means by the Tukey test.

#### ***Experimental method, rheology tests***

##### *Simple shear test*

Simple shear measurements were determined at temperatures of 38°C, over a cutting speed range of 0.1 to 1000  $s^{-1}$ . For this, a geometry of concentric aluminum cylinders (double Gap, internal cylinders diameters, 20.38 mm; external cylinders diameters, 21.96 mm and 59.5 mm height) was used for samples of the different formulations. The viscosity was estimated as a function of the cutting speed,  $\eta$  ( $\gamma$ ).

### **RESULTS**

Table 1, shows the statistical analysis of the different concentrations of the poloxamer: TP10, TP14, TP17 and TP20 in comparison with the formulation containing tramadol hydrochloride without the addition of the poloxamer (T) and the commercial formulation of tramadol hydrochloride (TC) in the different sampling hours, using or not a 50 kDa membrane.

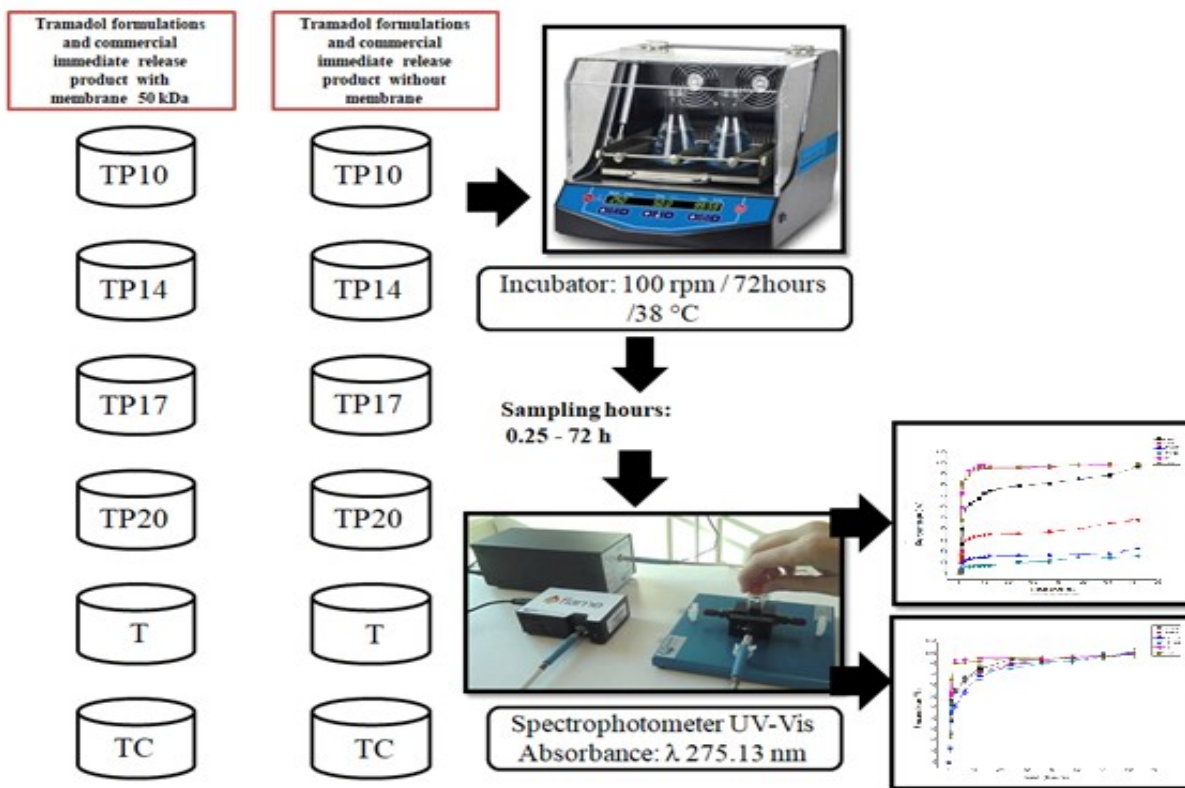
Fig. 2, shows the calibration curve of tramadol hydrochloride in HEPES Buffer solution with pH 7.

**Table 1:** Statistical analysis through the ANOVA test to determine the differences between means of the different concentrations of poloxamer 407 in concentration 10%, 14%; 17% and 20% contained in a dialysis membrane of 50 kDa and without the use of the membrane, compared to the tramadol hydrochloride without addition of the poloxamer (T) and with the commercial formulation (TC) with a significant difference of  $P < 0.05$  by means of JMP Software. The literals (a-c) within the column, without a common letter, differ significantly ( $P < 0.05$ ).

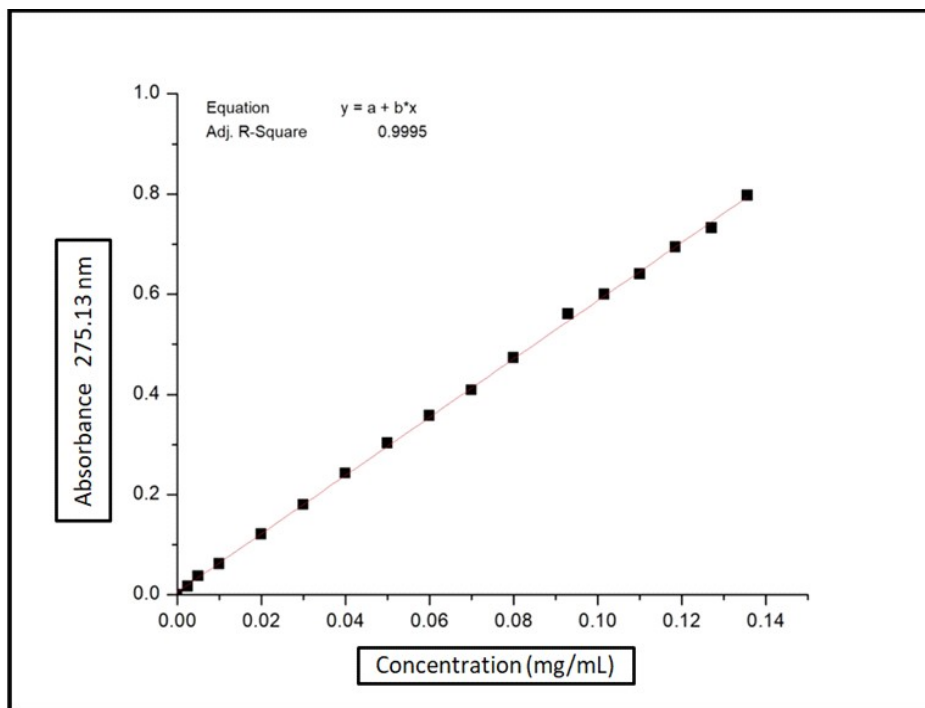
Differences between means of the release time of tramadol			
With the use of a dialysis membrane of 50 kDa		Without the use of dialysis membrane	
TC	a	TC	a
T	a	T	a
TP10	b	TP10	b
TP14	c	TP14	c
TP17	d	TP17	c
TP20	d	TP20	c

In Fig. 3, the release percentages of the formulations of tramadol with poloxamer 407 (TP10, TP14, TP17 and, TP20) were compared with the formulation of tramadol without the addition of excipient (T) and with the commercial product (TC), using or not a 50 kDa membrane.

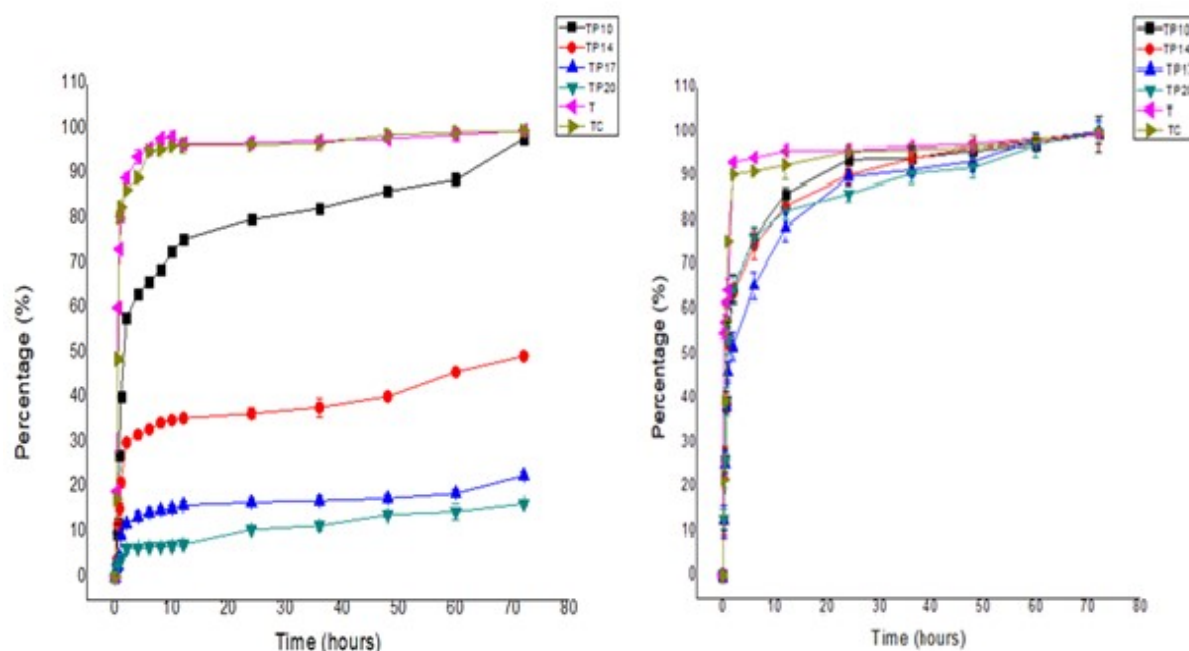




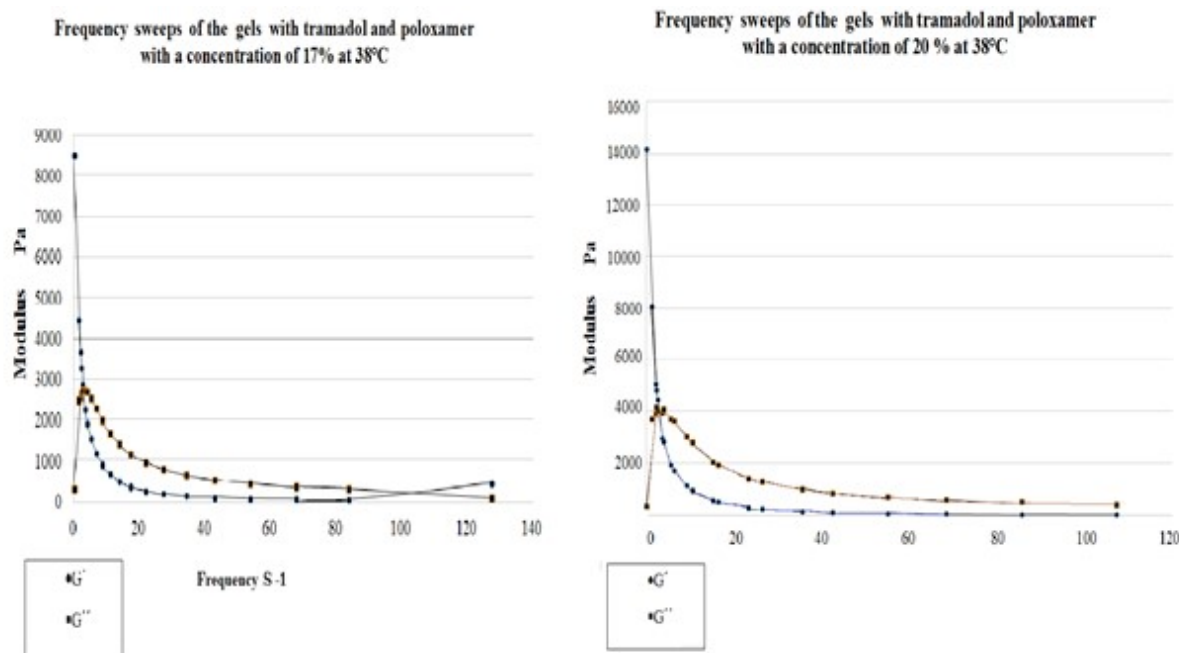
**Fig. 1:** Design of the *in vitro* release study where 6 formulations were administered within a 50 kDa dialysis membrane at different concentrations of the poloxamer in addition to tramadol, which have to be compared with each other and the same concentrations were also designed without using dialysis membranes at the respective sampling hours to later read its absorbance in the spectrophotometer.



**Fig. 2:** Calibration curve of tramadol hydrochloride in HEPES Buffer solution with pH 7.4



**Fig. 3:** Release concentration of tramadol hydrochloride in percent of a 50 kDa membrane (left) and without membrane (right) of the tramadol hydrochloride formulations with poloxamer 407 at the concentrations of TP10, TP14, TP17, TP20, T and TC plus the standards deviations.



**Fig. 4:** Rheological analysis of the formulations TP17 (Left) and TP20 (Right) is observed at a temperature of 38 °C where the modulus of elasticity ( $G'$ ) is compared with the viscous modulus ( $G''$ ), where  $G' > G''$ , this indicates a viscous behavior, that is, the material flows at that concentration and temperature.

The rheology results of the TP17 and TP20 formulations are shown in figure 4. The oscillatory flow analyzes are appreciated at a temperature of 38°C

## DISCUSSION

In agreement with the results obtained during this study, that tramadol hydrochloride in addition to poloxamer 407

forms micelles that are due to the sol-gel transition depending on the concentration and temperature of respective formulation (Dos Santos *et al.*, 2015; Guzálin *et al.*, 2009), which is confirmed with the viscosity results obtained with the 17% formulation at a temperature of 37°C and 42°C and with the 20% formulation at a temperature from 25 °C (fig. 4-5).

Gaitan's study mentions that commercial formulation used for dogs have an extremely short analgesic effect, being 4 to 6 hours (Gaitan, 2010). Regarding to the experimental preparations made in Gaitan's project when they were using and comparing different formulations, it were concluded that carbopol and chitosan don't obtained a long-action effect of tramadol .

While comparing the concentrations of carbopol and chitosan, it is observed that serum concentrations of tramadol hydrochloride in the preparation based on the poloxamer at concentration of 10% generate concentrations within the therapeutic range, maintaining the concentrations for more than 24 hours, leading to a true long-acting pharmacokinetics (Gaitán, 2010).

***Based on the results analyzed, we write the following information:***

In the Gaitan's study the concentration with 10% poloxamer with was used and 100% was released at 24 hours, for this reason it was decided to use poloxamer in the present study but with a concentration of 14%, 17% and 20%, although the release of tramadol was also evaluated with a concentration of 10% poloxamer (Gaitán, 2010).

While in the Dos Santos's study were used the formulations of 20% poloxamer a 60% of tramadol was released after 24 hours, in the formulation with 30% poloxamer a 30% of tramadol was released at 24 hours and for the formulation of 35% poloxamer was released 24% at 24 hours (Dos Santos *et al.*, 2015).

In the Dos Santos's study it was only possible to measure at 24 hours but in the present study for formulations in a dialysis membrane of 50 kDa the release was quantified until 72 hours, obtaining the following results:

TP20 and TP17 formulations released tramadol from 10-20% in 72 hours, being that the TP14 formulation released 40% of tramadol at 72 hours and the TP10% formulation releases 70-80% at 72 hours compared to the T and TC formulations that reach the 90-100% after 4 hours.

While in the formulations where dialysis membranes weren't used, the TP20 and TP17 formulation released 95-100% at 72 hours and the TP14 and TP10 formulation reached a release at 48 hours compared to T and TC

formulation that reached 90% after 2 hours, it can be corroborated that the results of our study are in accordance to the established by Gaitan and Dos Santos (Gaitán, 2010; Dos Santos *et al.*, 2015).

Just as we evaluated results of our study and compare it with the studies of Gaitan and Dos Santos, the effect of assembling the formulations is due to the temperature and the concentration of the poloxamer, since at low temperatures, both PEO and PPO units are soluble in water, likewise when the temperature increases the PPO units are dehydrated and added thus creating a micellar core while PEO units are hydrophilic forming the micellar crown remain hydrates (Gaitán, 2010; Dos Santos *et al.*, 2015; Escobar-Chávez *et al.*, 2006).

Micellization occurs in dilute solutions of block copolymers in selected solvents above the critical micellar concentration, at a certain temperature. At higher concentration, above a critical gel concentration, micelles can be ordered in a network (Guzálin *et al.*, 2009).

It can be said the concentration of the poloxamer is inversely proportional to the release of the drug in the medium, thus resulting in a release of almost 70% in 72 hours for the formulation containing the 17% poloxamer, therefore for subsequent *in vivo* studies will use this formulation as it is mostly eliminated and therapeutic plasma concentrations are expected to be found around this time.

The sol-gel transition temperature for gels containing 5% P-407 of tramadol and as mentioned periodically the gelation temperature is the point where the dynamic modules  $G'$  and  $G''$  intersect as we saw it in figure 5 with the concentration of 17%, while in concentration with 20% of poloxamer we can not saw the intersection (Zhao and Zhang, 2017; Alvarez-Lorenzo *et al.*, 2007).

## CONCLUSION

A modified release formulation of tramadol was achieved, from a polymer matrix that achieves a prolonged release of the active ingredient compared to the formulation designed without poloxamer and also with the formulation of the commercial product, which could allow with a single dose of the formulated the therapeutic concentrations of the analgesic remain for more than 72 hours, it can even last up to 100 hours (4 days), which reduces the handling of the animal and allows compliance with the treatment.

## REFERENCES

Al-Soufi W, Pineiro L and Novo M (2012). A model for monomer and micellar concentrations in surfactant solutions: Application to conductivity, NMR, diffusion,

- and surface tension data, *J. Colloid Interface Sci.* **370**(1): 102-110
- Alvarez-Lorenzo J, Gonzalez-Lopez M, Fernandez-Tarrio M, Sandez-Macho I and Cocheiro A (2007). Tetriconic micellization, gelation and drug solubilization: Influence of pH and ionic strength. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **66**(2): 244-252.
- Arjunan V, Santhanam R, Marchewka MK and Mohan S (2014). Comprehensive quantum chemical and spectroscopic (FTIR, FT-Raman, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR) investigation of O-desmethyltramadol hydrochloride an active metabolite in tramadol-An analgesic drug. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **122**(Mar 25): 315-330.
- Arranja A, Denkova AG, Morawska K, Waton G, van Vlierberghe S, Dubruel P, Schosseler F and Mendes E (2016). Interactions of pluronic nanocarriers with 2D and 3D cell cultures: Effects of PEO block length and aggregation state, *J. Control. Release*, **224**:126-135.
- Baker BB, Sladky KK and Johnson SM (2011). Evaluation of the analgesic effects of oral and subcutaneous tramadol administration in red-eared slider turtles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **238**(2): 220-227.
- Balakrishnan P, Park EK, Song KC and Ko HJ, Hahn TW 5, Song KW and Cho HJ (2015). Carbopol-Incorporated Thermoreversible Gel for Intranasal. *Molecules* **20**(3): 4124-4135.
- Barter LS (2011). Rabbit analgesia. *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.* **14**(1): 93-104.
- Bernad MJ and Manero O (2016). Rheology of the ultrasound-induced gelation in poloxamer aqueous solutions. *Rheol. Acta.* **55**: 781-787.
- Black PA, Cox SK and Macek M (2010). Pharmacokinetics of tramadol hydrochloride and its metabolite o-desmethyl tramadol in peafowl (*Pavo cristatus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* **1**(4): 671-676.
- Deore R, Kavitha K and Tamizhmani T (2010). Preparation and evaluation of sustained release matrix tablets of tramadol hydrochloride using glyceryl-palmitostrate. *Trop. J. Pharm. Res.* **9**(3): 275-281.
- Derakhshanden K, Fashi M and Seifoleslami S (2010). Thermosensitive pluronic hydrogel: prolonged injectable: prolonged injectable formulation for drug abuse. *Drug. Des. Devel. Ther.* **4**(Sep 24): 255-262.
- dos Santos AC, Akkari AC, Ferreira IR, Maruyama CR, Pascoli M, Guilherme VA, de Paula E, Fraceto LF, de Lima R, Melo Pda S and de Araujo DR (2015). Poloxamer-based binary hydrogels for delivering tramadol hydrochloride: sol-gel transition studies, dissolution-release kinetics, *in vitro* toxicity, and pharmacological evaluation. *Int. J. Nanomedicine.* **10**: 2391-2401.
- Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F and Chaumeil JC (2006). A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm. Res. Dec.* **23**(12): 2709-2728.
- Escobar-Chavez JJ, Lopez-Cervantes M, Naik A, Quintanar-Guerrero D and Ganem-Quintanar A (2006). Application of thermo-reversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **9**(3): 339-358.
- Gaitan TI (2010). Diseño, desarrollo y evaluación farmacocinética de un preparado subcutáneo de liberación modificada de clorhidrato de tramadol en perros. PhD Dissertation, México National Autonomous University of Mexico. Mexico.
- Galgatte UC and Chaudhari PD (2014). Preformulation study of poloxamer 407 gels: effect of additives. *Int. J. Pharm.* **6**(1): 130-133.
- Gao L, Wang X, Ma J, Hao D, Wei P, Zhou L and Liu G (2016). Evaluation of TPGS-modified thermo-sensitive Pluronic PF127 hydrogel as a potential carrier to reverse the resistance of P-gp-overexpressing SMMC-7721 cell lines. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.* **140**: 307-316.
- Giorgi M, Saccomanni G, Lebkowska-Wieruszewska and Kowalski C (2009). Pharmacokinetic evaluation of tramadol and its major metabolites after single oral sustained tablet administration in the dog: a pilot study. *Vet. J.* **18**(2): 253-255.
- Giral M, Garcia-Olmo DC and Gomez-Juarez M (2014). Anaesthetic effects in the ferret of alfaxalone alone and in combination with medetomidine or tramadol: A pilot study. *Lab. Anim.* **48**(4): 313-320.
- Giudice E, Barillaro G, Crino C, Alaimo A, Macri F and Pietro SD (2017) Postoperative pain in dogs undergoing hemilaminectomy: comparison of the analgesic activity of buprenorphine and tramadol. *J. Vet. Behav. Clin. Applic. Res.* **19**: 45-49.
- Guzalin M, Aberturas MR, Garcia F and Molpeceres J (2009). Gelatine gels and polyoxyethylene-polyoxypropylene gels: Comparative study of their properties, *Drug. Dev. Ind. Phar.* **20**(12): 2041-2048.
- Kilburn JJ, Cox SK and Kottyan, J (2014). Pharmacokinetics of tramadol and its primary metabolite o-desmethyltramadol in African penguins (*Spheniscus demersus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* **45**(1): 93-99.
- Klouda L and Mikos AG (2008). Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68**(1): 34-45.
- Kogel B, Terlinden R and Schneider J (2014). Characterisation of tramadol, morphine and tapentadol in an acute pain model in beagle dogs. *Vet. Anaest. Analg.* **41**(3): 297-304.
- Mabrouk M, Beherei HH, ElShebiny S and Tanaka M (2018). Newly developed controlled release subcutaneous formulation for tramadol hydrochloride. *Saudi. Pharm. J.* **26**(4): 585-592
- Maderuelo C, Zarzuelo A and Lanao JM (2011). Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *J. Control. Release.* **154**(1): 2-19.

- Matthew JE, Nazario YL, Roberts SC and Bhatia SR (2002). Effect of mammalian cell culture medium on the gelation properties of Pluronic PF127. *Biomaterials* **23**(23): 4615-4619.
- Papich MG and Kukanich B (2004). Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyltramadol in dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **27**(4): 239-246.
- Peng S, Lin YJ, Cheng MH, Wu CW and Chu IM (2016). A cell compatible PEO-PPO-PEO (Pluronic®) – based hydrogel stabilized through secondary structures. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **69**: 421-8.
- Kukanich B and Papich MG. (2017). Opioid Analgesic Drugs. In Riviere JE, Papich MG editors. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10<sup>th</sup> ed., Willey Blackwell., USA. **4**: 281-323.
- Schutter AF, Tümsmeyer J and Kastner SBR (2017). Influence of tramadol on acute thermal and mechanical cutaneous nociception in dogs. *Vet. Anaesth. Analg.* **44**(4): 309-316
- Souza MJ, Guzman DSM and Paul-Murphy JR (2012). Pharmacokinetics after oral and intravenous administration of a single dose of tramadol hydrochloride to Hispaniolan Amazon Parrots (*Amazona ventralis*). *Am. J. Vet. Res.* **73**(8): 1142-1147.
- Subedi M, Shalini Bajaj, Maushmi SK and Mayur YC (2018). An overview of tramadol and its usage in pain management and future perspective. *Biomed. Pharmacother.* **111**: 443-451.
- Taylor BF, Ramirez HE and Battles AH (2016). Analgesic activity of tramadol and buprenorphine after voluntary ingestion by rats (*Rattus norvegicus*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **55**(1): 74-82.
- Vazzana M, Andreani T, Fangueiro J, Faggio C, Silva C, Santini A, García ML, Silva AM and Souto EB (2015). Tramadol hydrochloride: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, adverse side effects, co-administration of drugs and new drug delivery systems. *Biomed. Pharmacother. J.* **70**(8): 234-238.
- Subramanian KG and Vijayakumar V (2012). Synthesis and evaluation of chitosan-graft-poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-itaconic acid) as a drug carrier for controlled release of tramadol hydrochloride. *Saudi Pharm. J.* **20**(3): 263-271.
- Volkmer E, Leicht U, Moritz M, Schwarz C, Wiese H, Milz S, Matthias P, Scholoege W, Friess W, Goettlinger M, Augat P and Schieker M (2013). Poloxamer-based hydrogels hardening at body core temperature carriers for cell based therapies: *in vitro* and *in vivo* analysis. *J. Mater. Sci. J.* **24**(9): 2223-2234.
- Wang J, Zhang LQ, Chi H and Wang S (2016). An alternative choice of lidocaine-loaded liposomes: lidocaine-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for local anesthetic therapy, *Drug. Deliv.* **23**(4): 1254-1260.
- Wolfe AM and Kennedy LH (2015). Efficacy of tramadol as a sole analgesic for postoperative pain in male and female mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **54**(4): 411-419.
- Xu X, Khan MA and Burgess DJ (2012). A two-stage reverse dialysis *in vitro* dissolution testing method for passive targeted liposomes. *Int. J. Pharm.* **426**(1-2): 211-218.
- Yap LS and Yang MC (2016). Evaluation of hydrogel composing of Pluronic F127 and carboxymethyl hexanoyl chitosan as injectable scaffold for tissue engineering applications. *Colloid.s Surf. B. Biointerfaces.* **146**: 204-211.
- Youn J, Choi JH, Lee S, Lee SW, Moon BK, Song JE and Khang G. (2021). Pluronic F-127/Silk fibroin for enhanced mechanical property and sustained release drug for tissue engineering biomaterial. *Materials, (Basel).* **14**(5): 1287.
- Yu L and Di J (2008). Injectable hydrogels as unique biomedical material. *Chem. Soc. Rev.* **37**(8): 1473-1481.
- Zhao LY and Zhang WM (2017) Recent progress in drug delivery of pluronic P123: pharmaceutical perspectives. *J. Drug. Target,* **25**(6): 471-484.