



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE UNA FORMULACIÓN
COMERCIAL DE FLORFENICOL EN VAQUILLAS HEREFORD”**

Francisco Andrés Rubilar Baeza

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: DRA. DANIELA IRAGÜEN CONTRERAS

SANTIAGO – CHILE

2013

FINANCIAMIENTO: LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA VETERINARIA



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS



ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE UNA FORMULACIÓN COMERCIAL DE FLORFENICOL EN VAQUILLAS HEREFORD

FRANCISCO ANDRES RUBILAR BAEZA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

NOTA FIRMA

PROFESOR GUÍA : DRA. DANIELA IRAGÜEN C.

PROFESOR CONSEJERO: DR. MARCO GALLEGUILLOS C.

PROFESOR CONSEJERO: DR. CARLOS NÚÑEZ P.

SANTIAGO, CHILE

2013

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser mi luz, mi fuerza y mi razón de ser.

A mis padres, por ser las personas más maravillosas del mundo, quienes han inculcado en mí los más nobles valores, me han entregado el invaluable tesoro de la educación, y quienes con su inagotable amor, han hecho de mí un hombre de bien, lleno de buenos sentimientos y fiel reflejo de su entrega y dedicación.

A Paula, mi pareja y gran amor, por ser el constante, fiel e incondicional apoyo en mi vida, por ser la mujer que amo con todo mi corazón, y por ser la persona con quién quiero pasar el resto de mis días. A ti, mi amor, va dedicado este logro, que dará paso a una vida nueva llena de oportunidades para ambos.

A Felipe, mi hermano, quién siempre ha sido mi leal y honesto compañero, y quién ha motivado en mí, continuar por la senda del bien y ser un ejemplo a seguir.

A mi abuelita Lela, por ser uno de los pilares más esenciales durante todo mi proceso educativo, y por ser una de las personas a quién más amo en este mundo.

Al Tata, Juan, Daniza y Maximiliano, por formar parte de la más linda familia en la que pude nacer.

A todos mis tíos y primos Rubilar Gutiérrez, por ser la esencia misma del apoyo familiar incondicional.

A la Doctora Daniela Iragüen Contreras, por ser una excelente formadora en la sala de clases, por permitirme acercarme al mundo de la farmacología veterinaria durante mi tutoría, por darme la oportunidad de iniciar el último gran paso antes de mi vida profesional, y por ser un apoyo infranqueable en todo mi proceso de titulación, siendo guía, líder y formadora, además de cercana, presta, solidaria y amiga en circunstancias adversas. Gracias Doctora, porque en definitiva, usted siempre ha confiado en mí. Le estaré eternamente agradecido.

A mis grandes amigos Diego Araya, Rodrigo Egaña, Rubén Gómez, Marco Mancilla, Diego Carvacho, Daniel Arias y Diego Rodríguez, compañeros de batalla, honestos consejeros, y con quienes he compartido los más bonitos momentos de mi vida. Muchachos, profundamente les digo, los quiero de todo corazón.

A todos los amigos que la vida Universitaria me entregó.

A Don Felipe Serrano, quién de muy buena fe me brindó su apoyo logístico y técnico para poder culminar de mejor manera ésta etapa de mi formación profesional.

A mis colegas Felipe Albornoz, Cristian Concha, Cristian Cortés, Óscar Araneda y Marcos Aybar, por alentarme en esta última batalla universitaria.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, con especial mención a los señores Francisco Muñoz, Peter Núñez y Francesco Palacios, quienes gratuitamente entregaron sus conocimientos en pos del desarrollo de mi memoria, además de toda su amistad y alegría. Así también, quiero agradecer sentidamente a la señorita Ximena Matta, por toda la invaluable cooperación que me entregó, y cuyo apoyo fue fundamental para llevar a cabo mi proyecto.

A todos los profesores que durante años confiaron en mis capacidades como alumno y futuro profesional, y entregaron cariñosamente sus conocimientos en beneficio de mi desarrollo.

A los compañeros de clases con quienes compartí buenos y malos momentos.

Al Centro de Estudiantes de Veterinaria 2008, a la Asociación de Ayuda al Animal Abandonado, a los futboleros y rockeros de siempre, y a los funcionarios de FAVET.

A todo aquel que dentro de estos largos años de carrera, me entregó su amor, confianza, alegría, solidaridad, honestidad, comprensión, apoyo y buena onda. A todos ellos les digo, gracias por haber estado ahí.

A la vida misma por permitirme vivirla.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Materiales y métodos	6
Animales experimentales	6
Diseño experimental	6
Estándares de antimicrobianos	6
Método de extracción de florfenicol desde las muestras de suero	7
Cuantificación de florfenicol en las muestras experimentales	7
Análisis farmacocinético	8
Resultados	9
Discusión	13
Conclusión	16
Referencias	17

ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE UNA FORMULACIÓN COMERCIAL DE FLORFENICOL EN VAQUILLAS HEREFORD

Francisco Rubilar Baeza

Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la
Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile. Correo 2, Casilla
15, La Granja. Fono 56-02-9785638. Fax: 56-02-9785613.

En el mercado chileno existen numerosas formulaciones comerciales de florfenicol, para las cuales existen pocos estudios farmacocinéticos. Se desarrolló un estudio de la farmacocinética de una formulación de florfenicol al 30% inyectable en vaquillas hereford, tras la administración de una dosis única de 40 mg/Kg de peso vivo vía subcutánea. Las concentraciones séricas de florfenicol fueron determinadas usando curvas de calibración, tras un ensayo de cromatografía líquida de alta definición con detección ultravioleta (HPLC-UV), validado según la normativa en vigencia de la Food and Drug Administration (FDA). Los parámetros farmacocinéticos obtenidos fueron la concentración sérica máxima (C_{max}) $4.496,6 \pm 1.438,7$ $\mu\text{g/L}$, el tiempo que demoró en alcanzar la concentración máxima (T_{max}) 7 ± 2 h, tasa constante de eliminación (kel) $0,02 \pm 0,007$ L/h, tiempo de vida media ($t_{1/2}$) $31 \pm 9,2$ h, área bajo la curva (AUC_{final}) $102.428,14 \pm 27.676,35$ $\mu\text{g h/L}$, área bajo la curva extrapolada al infinito (AUC_{∞}) $158.875 \pm 47.840,51$ $\mu\text{g h/L}$, *clearance* (CL) $0,076 \pm 0,03$ L/Kg/h y volumen de distribución (Vd) $3,562 \pm 1,6$ L/Kg. El método de extracción y cuantificación de florfenicol utilizado permitió visualizar concentraciones séricas de florfenicol inferiores a las concentraciones mínimas inhibitorias de bacterias sensibles, y determinó que para obtener un perfil farmacocinético completo es necesario un tiempo de muestreo de 7 días post administración.

Palabras clave: florfenicol, farmacocinética, vaquillas.

PHARMACOKINETICS OF A COMMERCIAL FORMULATION OF FLORFENICOL IN
HEREFORD HEIFERS

Francisco Rubilar Baeza

Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la
Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile. Correo 2, Casilla
15, La Granja. Fono 56-02-9785638. Fax: 56-02-9785613.

There are numerous commercial formulations of florfenicol in the Chilean pharmaceutical market, for which there are a few pharmacokinetics studies available. A study of the pharmacokinetics of a formulation of florfenicol 30% injectable in Hereford heifers after a single subcutaneous administration at 40 mg/Kg bodyweight was performed. Serum concentrations of florfenicol were determined by a high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) method, validated according to the Food and Drug Administration (FDA) recommendations. Pharmacokinetics parameters obtained were the serum peak concentration (C_{max}) $4,496.6 \pm 1,438.7 \mu\text{g/L}$, time of maximum observed concentration (T_{max}) $7 \pm 2 \text{ h}$, elimination rate constant (K_{el}) $0.02 \pm 0.007 \text{ 1/h}$, terminal half-life ($t_{1/2}$) $31 \pm 9.2 \text{ h}$, area under curve (AUC_{final}) $102,428.14 \pm 27,676.35 \mu\text{g h/L}$, area under curve extrapolated to infinite (AUC_{∞}) $158,875 \pm 47,840.51 \mu\text{g h/L}$, clearance (CL) $0.076 \pm 0.03 \text{ L/Kg/h}$ and steady-state volume of distribution (V_d) $3.562 \pm 1.6 \text{ L/Kg}$. The extraction and quantification method used allowed display serum concentrations of florfenicol below minimum inhibitory concentrations of sensitive bacteria, and determined that in order to obtain a full pharmacokinetic profile, a seven-day after drug administration sampling period is required.

Keywords: florfenicol, pharmacokinetics, heifers.

INTRODUCCIÓN

Florfenicol es un antimicrobiano bacteriostático con actividad sobre bacterias gramnegativas (Byung *et al.*, 2007). Pertenece a la familia de los anfenicoles, la que incluye también al tianfenicol y cloranfenicol (Himelfarb *et al.*, 2007). Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas, al unirse a la subunidad ribosomal 50 S, para abolir la actividad de la enzima peptidiltransferasa (Cannon *et al.*, 1990).

El principal mecanismo de resistencia bacteriana a cloranfenicol y tianfenicol radica en la existencia de cloranfenicol acetiltransferasas (CAT) en organismos resistentes. La modificación estructural en el diseño de florfenicol, que sustituye un grupo hidroxilo por un átomo de flúor en el sitio del carbono 3, previene la acetilación por CAT (Sams, 1995). Consecuentemente, florfenicol tiene mayor actividad *in vitro* a menores concentraciones que sus análogos estructurales, tianfenicol y cloranfenicol, y es efectivo contra organismos resistentes a cloranfenicol y tianfenicol, involucrados en infecciones comunes en animales domésticos (Neu y Fu, 1980; Syriopoulou *et al.*, 1981; Graham *et al.*, 1988; Ueda y Suenaga, 1995), tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella entérica* Serotipo Typhi, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida* y *Proteus vulgaris* (Cannon *et al.*, 1990; Marshall *et al.*, 1996; Ayling *et al.*, 2000).

Esta droga se caracteriza por poseer una alta biodisponibilidad, buena penetración tisular y rápida eliminación, lo cual es importante para el tratamiento sistémico en animales domésticos (Byung *et al.*, 2007). Al ser un compuesto neutro liposoluble, florfenicol atraviesa fácilmente las barreras celulares, alcanzando tejidos y fluidos como cerebro, líquido cefalorraquídeo y estructuras internas del ojo que son inaccesibles para otros fármacos antibacterianos. Su volumen

de distribución aparente es alto, permitiéndole una buena llegada a los tejidos poco irrigados. (Chang *et al.*, 2009).

Florfenicol no produce los efectos adversos que produce el cloranfenicol en medicina humana y veterinaria, tales como la anemia aplásica no relacionada a la dosis en humanos con potenciales efectos fatales, y el extensivo desarrollo de resistencia bacteriana (Murray y Shaw, 1997). Debido a su amplio espectro antibacteriano, efectividad terapéutica y bajo riesgo de toxicidad, florfenicol se ha transformado en una importante droga en medicina veterinaria con probado valor en el tratamiento de infecciones respiratorias y entéricas en animales de abasto (Nordmo *et al.*, 1994; Ueda y Suenaga, 1995; Booker *et al.*, 1997; Sheldon, 1997).

La farmacocinética de florfenicol ha sido ampliamente investigada en terneros de engorda (Varma *et al.*, 1986; Adams *et al.*, 1987), vacas (Bretzlaff *et al.*, 1987; Soback *et al.*, 1995), caballos (McKeller y Varma, 1996), cabras (Lavy *et al.*, 1991; Atef *et al.*, 2001), cerdos (Voorspoels *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2001) y pollos broiler (Afifi y El-Sooud, 1997; Shen *et al.*, 2002), pues el conocimiento de las variables farmacocinéticas de las drogas antimicrobianas es crítico para conocer su eficacia (Peyrou *et al.*, 2006). No obstante, todos estos estudios han sido desarrollados utilizando la formulación innovadora o de referencia, y no las múltiples copias desarrolladas posteriormente y que se utilizan indistintamente en medicina veterinaria sin contar con estudios de bioequivalencia de respaldo. Dos formulaciones son bioequivalentes cuando no presentan diferencias en la magnitud y velocidad de absorción del principio activo. Esta comparación generalmente se realiza entre una formulación de referencia y otras formulaciones que contienen el mismo principio activo. En caso que sean bioequivalentes las formulaciones se denominan genéricas. En caso contrario, copias o similares (EMEA, 2010).

El comportamiento farmacocinético de los principios activos contenidos en las formulaciones copia puede variar en relación a las innovadoras por varios factores, siendo uno de ellos el excipiente. El uso de estas formulaciones implica riesgos en la eficacia terapéutica, lo que también aplica a formulaciones con otros principios activos. Como ejemplo de ello, Lifschitz *et al.* (2004) evidenció diferencias farmacocinéticas en la absorción de ivermectina tras la administración de cuatro formulaciones de distintos laboratorios, a terneros libres de parásitos con diferencias estadísticamente significativas en concentración máxima (C_{max}), tiempo que demora en alcanzar la concentración máxima (T_{max}) y área bajo la curva (ABC) entre las formulaciones. Sumano *et al.* (2001), realizó un estudio de bioequivalencia de cuatro formulaciones farmacéuticas de enrofloxacino en pollos, reportando que las tres formulaciones comerciales en estudio, tenían valores de C_{max} más bajos que la formulación de referencia. Adicionalmente, la biodisponibilidad de enrofloxacino en el producto de referencia fue mayor a las otras tres formulaciones ($p < 0,05$).

El objetivo del presente estudio fue determinar el comportamiento farmacocinético de una formulación comercial de florfenicol 30% inyectable disponible en el mercado nacional, diferente a la de referencia, administrada vía subcutánea (s.c.) en dosis terapéuticas en vaquillas hereford, y de ese modo obtener información que podría ser utilizada en la elaboración de futuros estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales experimentales

Se utilizaron 10 vaquillas hereford, con pesos entre 250 y 300 kg, sanas al examen clínico. Todos los animales en estudio se mantuvieron en condiciones de estabulación, siendo alimentados con heno de alfalfa, y con libre acceso al agua. No recibieron tratamiento con antimicrobianos a lo menos durante un mes antes de iniciar el estudio y fueron observados durante todo el experimento por un médico veterinario especialista en medicina de bovinos. Este estudio fue aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y fue realizado en un predio ubicado en la provincia de Melipilla, Región Metropolitana.

Diseño experimental

Se administró una dosis única de 40 mg/kg p.v. de una formulación comercial de florfenicol 30% inyectable, por vía subcutánea a cada individuo. Se obtuvo una muestra control antes de iniciar el estudio (T₀) y a las 2, 4, 7, 10, 12, 24, 36 y 48 horas post administración. La extracción de sangre se realizó utilizando agujas de 21G, 1,5 pulgadas y tubos de 10 mL con vacío (Vacutainer, sin anticoagulante). Luego de una hora de obtenidas las muestras, se centrifugaron a 1.500 g durante 20 minutos, para la obtención de suero sanguíneo el que fue almacenado a -20° C, hasta la realización del método de extracción de florfenicol.

Estándares de antimicrobianos

Para el análisis de las muestras en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, se utilizó un estándar de florfenicol de 96% de pureza (Sigma[®]), con el que se preparó una solución madre de 1 mg/mL

de concentración. A partir de ésta, se prepararon soluciones de florfenicol en metanol a diluciones necesarias para obtener suero fortificado con concentraciones de 25, 50, 80, 100 y 150 ng/mL.

Método de extracción de florfenicol desde las muestras de suero

Se utilizó el método previamente validado por el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. A cada muestra de 1 mL de suero se adicionó 900 µL de agua ultra pura y 4 mL de acetona. Luego de ser centrifugadas a una velocidad de 1.500 g, la fase superior fue extraída con diclorometano. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas y la fase inferior secada bajo flujo de nitrógeno a 50° C. Posteriormente fue reconstituida con una solución de fosfato de sodio/metanol pH 2,8. Se agregó 1 mL de hexano, se agitó durante 10 seg, y se centrifugó durante 10 minutos a 1.200 g. La fase inferior fue transferida a un vial rotulado para el análisis de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV). La fase móvil fue solución de acetonitrilo:agua/25:75, a un flujo de 0,7 mL/minuto. La separación cromatográfica se realizó en una columna C18 Xterra RP18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), con temperatura controlada a 35 °C, en una corrida cromatográfica de 40 minutos a 220 nm. Los datos fueron procesados con el programa *EZChron Elite* Versión 3.2.1.

Cuantificación de florfenicol en las muestras experimentales

Se realizó a partir de curvas de calibración que se elaboraron a partir de muestras de suero blanco (sin florfenicol) fortificado con diferentes concentraciones de antibiótico, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración: } (a - y) / b$$

Donde **a** corresponde al área cromatográfica de la muestra; **y** corresponde al intercepto en el eje y de la curva de calibración; **b** corresponde a la pendiente de la misma curva.

Análisis farmacocinético

La concentración sérica máxima (C_{max}) y el tiempo en alcanzar esta concentración (T_{max}) se obtuvieron observando el perfil concentración vs tiempo para cada individuo. El área bajo la curva (ABC_{final}) desde el tiempo cero (T_0) hasta el tiempo donde se encuentra la última concentración cuantificable se calculó por una regla trapezoidal lineal. La extrapolación de ABC_{final} desde el tiempo cero al infinito (ABC_{∞}) se calculó por la fórmula $ABC_{\infty} = (ABC_{final} + C_{final})/Kel$, donde C_{final} es la última concentración cuantificable observada. El volumen de distribución (Vd) se estimó asociado a la fase de eliminación a partir del *clearance* y de la constante de eliminación: $Vd = CL/Kel$. La constante de eliminación (Kel) se estimó por una regresión lineal de la concentración transformada a logaritmo *versus* tiempo en la fase final de eliminación. La Kel se calculó por la siguiente fórmula: pendiente x $-2,303$. La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) se calculó por la fórmula: $t_{1/2} = Ln2/ Kel$, donde $Ln2$ equivale a 0,693 y finalmente el *clearance* (CL) se calculó por la fórmula $CL = Dosis/ABC_{\infty}$.

RESULTADOS

Durante la realización del experimento, no se presentaron reacciones adversas al fármaco en ninguno de los animales tratados. En la Tabla 1 se presentan las concentraciones de florfenicol en cada uno de los animales tratados y para cada tiempo de muestreo. En la Figura 1 se presentan los promedios de las concentraciones de florfenicol para cada tiempo de muestreo. Se puede observar que la máxima concentración sérica (6.772 ng/mL) se obtuvo antes de las 10 horas post administración del fármaco en todos los animales. A las 48 horas post administración aún se observan concentraciones detectables del fármaco, cercanas al 50% de las concentraciones iniciales. Al observar la Figura 1, los promedios de las concentraciones para cada tiempo de muestreo revelan una eliminación en dos etapas, distinguiéndose claramente una fase de distribución inicial del medicamento (hasta 10 horas) y luego una fase de eliminación del organismo, más lenta. Esto responde a un modelo bicompartimental de distribución del fármaco en el organismo.

Tabla 1: Concentraciones de florfenicol en suero sanguíneo en 10 vaquillas hereford, tratadas con una dosis de 40 mg/Kg de peso vivo vía subcutánea de una formulación comercial de florfenicol 30%, y promedio de las concentraciones para cada tiempo \pm DE.

Concentración sérica de florfenicol/mL	Tiempo post administración 2 horas	Tiempo post administración 4 horas	Tiempo post administración 7 horas	Tiempo post administración 10 horas	Tiempo post administración 12 horas	Tiempo post administración 24 horas	Tiempo post administración 36 horas	Tiempo post administración 48 horas
Individuo 1	2092 2220 \pm 998	3042 3498 \pm 1557	4531 4239 \pm 1222	3841 3962 \pm 1332	2826 2922 \pm 907	1511 1855 \pm 569	1424 1510 \pm 365	1078 1144 \pm 262
Individuo 2	2075 2220 \pm 998	1864 3498 \pm 1557	2934 4239 \pm 1222	3209 3962 \pm 1332	2759 2922 \pm 907	1921 1855 \pm 569	1665 1510 \pm 365	1435 1144 \pm 262
Individuo 3	2898 2220 \pm 998	3912 3498 \pm 1557	5829 4239 \pm 1222	4684 3962 \pm 1332	4212 2922 \pm 907	2602 1855 \pm 569	1884 1510 \pm 365	1294 1144 \pm 262
Individuo 4	1614 2220 \pm 998	2679 3498 \pm 1557	4102 4239 \pm 1222	4062 3962 \pm 1332	3095 2922 \pm 907	1945 1855 \pm 569	1433 1510 \pm 365	1079 1144 \pm 262
Individuo 5	868 2220 \pm 998	1415 3498 \pm 1557	2254 4239 \pm 1222	1959 3962 \pm 1332	1267 2922 \pm 907	711 1855 \pm 569	682 1510 \pm 365	579 1144 \pm 262
Individuo 6	2400 2220 \pm 998	5306 3498 \pm 1557	5938 4239 \pm 1222	6772 3962 \pm 1332	3009 2922 \pm 907	1966 1855 \pm 569	1819 1510 \pm 365	1263 1144 \pm 262
Individuo 7	4553 2220 \pm 998	5864 3498 \pm 1557	4611 4239 \pm 1222	4371 3962 \pm 1332	4171 2922 \pm 907	2615 1855 \pm 569	1487 1510 \pm 365	1387 1144 \pm 262
Individuo 8	1774 2220 \pm 998	2943 3498 \pm 1557	3742 4239 \pm 1222	3300 3962 \pm 1332	2492 2922 \pm 907	2090 1855 \pm 569	1445 1510 \pm 365	1079 1144 \pm 262
Individuo 9	1475 2220 \pm 998	5413 3498 \pm 1557	5198 4239 \pm 1222	4766 3962 \pm 1332	3432 2922 \pm 907	1862 1855 \pm 569	1957 1510 \pm 365	1354 1144 \pm 262
Individuo 10	2450 2220 \pm 998	2541 3498 \pm 1557	3250 4239 \pm 1222	2652 3962 \pm 1332	1953 2922 \pm 907	1330 1855 \pm 569	1308 1510 \pm 365	891 1144 \pm 262

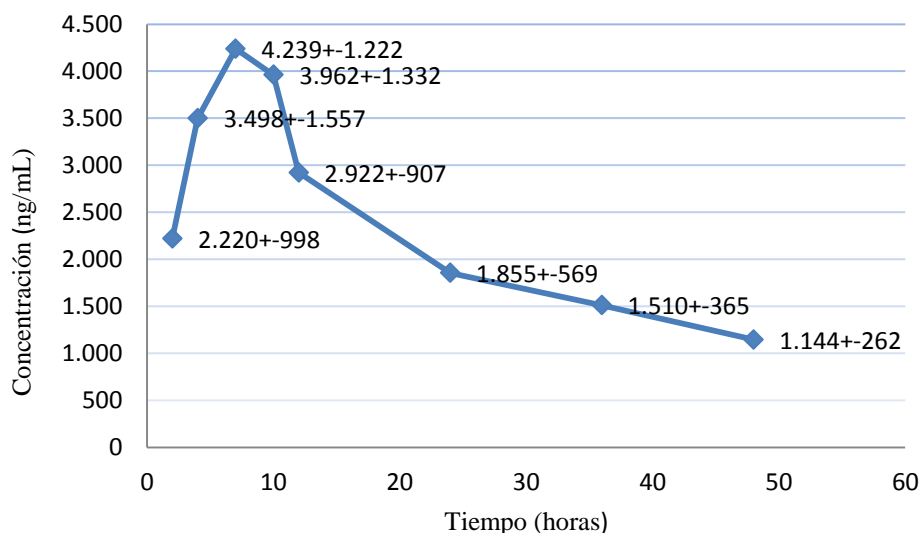


Figura 1. Curva de concentración (promedio \pm DE) vs tiempo de florfenicol en suero en vaquillas hereford tratadas con 40 mg/Kg de peso vivo vía subcutánea.

Los parámetros farmacocinéticos calculados para florfenicol se presentan en la Tabla 2. La máxima concentración del fármaco se detectó a las $7,00 \pm 2,00$ horas post administración. Se obtuvo un V_d elevado. La eliminación del fármaco del organismo fue lenta, obteniéndose un $t_{1/2}$ de $31,00 \pm 9,19$ horas. Al comparar el ABC_{final} vs el ABC_{∞} se evidencia que ésta última supera en más de un 20% a la primera.

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos (promedio \pm DE) de una formulación comercial de florfenicol 30% inyectable administrada por vía subcutánea en dosis de 40 mg/kg de peso vivo a 10 vaquillas hereford.

Parámetro farmacocinético	Valor obtenido
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	4.496,60 \pm 1.438,74
T_{max} (h)	7,0 \pm 2,0
ABC_{final} ($\mu\text{g h/L}$)	102.428,14 \pm 27.676,35
ABC_{∞} ($\mu\text{g h/L}$)	158.875,43 \pm 47.840,51
Vd (L/Kg)	3,56 \pm 1,60
Kel (L/h)	0,023 \pm 0,007
$t^{1/2}$ (h)	31,00 \pm 9,19
CL (L/Kg/h)	0,076 \pm 0,030

C_{max} : Concentración sérica máxima; T_{max} : Tiempo en alcanzar la concentración sérica máxima; ABC_{final} : Área bajo la curva desde el tiempo cero hasta el tiempo de la última concentración cuantificable; ABC_{∞} : Área bajo la curva extrapolada al infinito; Vd : Volumen de distribución. Kel : Constante de eliminación; $t^{1/2}$: Vida media de eliminación; CL : Clearance.

DISCUSIÓN

La disponibilidad en el mercado nacional de varias formulaciones farmacocinéticas para un mismo principio activo, determina la necesidad de desarrollar estudios del comportamiento farmacocinético para cada una de ellas. El presente estudio determinó el comportamiento farmacocinético de una formulación comercial de florfenicol 30% inyectable disponible en el mercado nacional. Los resultados obtenidos se discuten a continuación.

La concentración máxima (C_{max}) obtenida en este estudio fue de $4,49 \pm 1,43 \mu\text{g/mL}$, la cual califica como de alta eficacia en el tratamiento contra la mayoría de las bacterias causantes de cuadros respiratorios en bovinos (Bretzlaff *et al.*, 1987; Ueda y Suenaga, 1995; Ho *et al.*, 2000). Sin embargo, para todo tipo de antibiótico, el tiempo en que las concentraciones del fármaco se mantienen dentro de rangos eficaces, resulta ser el parámetro más importante (Bretzlaff *et al.*, 1987; Ueda y Suenaga, 1995; Ho *et al.*, 2000). En el presente estudio, el tiempo que la concentración sérica se mantuvo por sobre $2 \mu\text{g/mL}$ no superó las 24 horas, lo que no asegura la efectividad del producto hasta la siguiente administración, la que según la recomendación del fabricante debe ser a las 48 horas.

El T_{max} obtenido fue bastante elevado considerando la vía de administración utilizada. La vía subcutánea implica un retardo en el proceso de absorción (Maya, 2007), pero que no altera la efectividad del fármaco, ya que a las dos horas post administración se evidenciaron concentraciones terapéuticas.

El ABC_{∞} supera en más de un 20% al ABC_{final} , lo que indica que el tiempo de muestreo es insuficiente en pos de obtener un perfil farmacocinético completo de la formulación en estudio. Además, un eventual estudio de bioequivalencia respecto a la formulación de referencia debiese considerar en su diseño un tiempo de muestreo mayor, de al menos siete días post administración, correspondiendo esto a cinco veces la $t_{1/2}$ de la formulación de florfenicol utilizada (EMEA

2010). Del punto de vista de la eficacia antimicrobiana, hay un período que comienza cercano a las 24 horas post administración en que el principio activo no supera la CMI.

El V_d obtenido representa una prolongada permanencia del principio activo en el organismo. Si el V_d es alto ($V_d > 1 \text{ L/Kg}$), significa que el fármaco se encuentra preferentemente en los tejidos, siendo poco el fármaco disponible para ser eliminado. Así, la disminución de la concentración plasmática será gradual, con un $t_{1/2}$ prolongado (Maya, 2007), lo que se condice con los resultados obtenidos en este estudio ($t_{1/2}$ de $31,00 \pm 9,19 \text{ h}$). Esta prolongada permanencia de florfenicol en el organismo, implica una amplia distribución del principio activo en los compartimentos extravasculares (Anadón *et al.*, 2008). Estos resultados se condicen con lo citado por Chang *et al.* (2009), en referencia a la amplia distribución de florfenicol en el organismo, y su buena llegada a tejidos poco irrigados, lo que, sumado a las características estructurales de florfenicol que evitan la acetilación por CAT (Sams, 1995), definen a éste fármaco como una buena opción de tratamiento en animales de abasto. Paralelamente, muestra del amplio uso de este fármaco en estos animales, es la aprobación mundial de su uso contra infecciones bacterianas del tracto respiratorio en terneros y cerdos (Nordmo *et al.*, 1994; Soback *et al.*, 1995; Ueda y Suenaga, 1995; Booker *et al.*, 1997; Sheldon, 1997; Voorspoels *et al.*, 1999; Ali *et al.*, 2003), como también la posibilidad de ser utilizado en afecciones ubicadas en sitios donde tiene buena llegada, tales como el sistema nervioso central y el ojo (Chang *et al.*, 2009).

Del mismo modo, un alto V_d resulta útil contra cuadros cuyo tratamiento requiere concentraciones del fármaco prolongadas y sostenidas en tejidos, tales como infecciones por *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella entérica* Serotipo Typhi, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida* y *Proteus vulgaris* (Cannon *et al.*, 1990; Marshall *et al.*, 1996; Ayling *et al.*, 2000).

Tras la administración del fármaco se observó un modelo de cinética bicompartimental: El fármaco se distribuyó primero en los tejidos de más alto flujo; luego, cuando se alcanzó el

equilibrio entre la concentración plasmática y la concentración tisular, comenzó a predominar el fenómeno de eliminación, proceso mucho más lento pues hay poca droga en el plasma, de modo que la velocidad con que se eliminó el fármaco fue lenta. Esta fase no sólo incluyó la eliminación, sino también la distribución a los tejidos poco perfundidos (Maya, 2007), lo que se condice con los valores de Vd obtenidos que reflejaron una alta permanencia del principio activo en el organismo.

Finalmente, Bretzlaff *et al.* (1987) sugirieron que el bajo *clearance* corporal total (CL) de florfenicol se debía al reemplazo del grupo OH por un átomo de flúor en la estructura molecular de cloranfenicol y tianfenicol, lo cual prevendría su conjugación con ácido glucurónico y disminuiría su excreción. Se describe una relación alométrica para las funciones fisiológicas, en particular la irrigación hepática, correlacionado con el peso corporal de las distintas especies (Ings *et al.*, 1990). Si se aplican estos principios a los parámetros farmacocinéticos (Riviere *et al.*, 1997), se debiesen encontrar grandes valores de CL en animales con pequeños pesos corporales, y pequeños valores de CL en animales con grandes pesos corporales. Esto se condice con los bajos valores de CL $0,076 \pm 0,030$ L/Kg/h obtenidos en las vaquillas de éste estudio.

Los parámetros farmacocinéticos que reflejan la absorción (C_{max} , T_{max} , ABC_{final} , ABC_{∞}) presentan diferencias importantes respecto a los valores obtenidos por Matta (2012) en cuyo trabajo se estudió la formulación de referencia de florfenicol en las mismas condiciones que el presente trabajo, lo que sugiere la necesidad de realizar un estudio de bioequivalencia entre ambas formulaciones.

CONCLUSIÓN

El método de extracción y cuantificación de florfenicol utilizado permite visualizar concentraciones séricas de florfenicol inferiores a la CMI de las bacterias sensibles.

El estudio farmacocinético realizado entrega información de utilidad para futuros ensayos, específicamente en relación al tiempo de muestreo. En pos de determinar un perfil farmacocinético completo, este debiera cubrir siete días de muestreo post administración. Sólo así, podrían realizarse estudios de bioequivalencia.

REFERENCIAS

- Adams PE, Varma KJ, Powers TE y Lamendola JF. 1987. Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in male veal calves given repeated doses. *Am J Vet Res*, **12**, 1725–1732.
- Afifi NA y El-Sooud KA. 1997. Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.*, **38**, 425–428.
- Ali BH, Al-Qarawi AA y Hashaad M. 2003. Comparative plasma pharmacokinetics and tolerance of florfenicol following intramuscular and intravenous administration to camels, sheep and goats. *Vet. Res. Commun.*, **27**, 475–483.
- Anadón A, Aranzazu M, Martínez M, Ríos A, Caballero V, Ares I y Martínez-Larrañaga M. 2008. Plasma and Tissue Depletion of Florfenicol and Florfenicol-amine in Chickens. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 11049–11056.
- Atef M, El-genda YI, Amer AMM y El-aty AMA. 2001. Disposition kinetics of florfenicol in goats by using two analytical methods. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, **48**, 129–136.
- Ayling RD, Baker SE, Peek ML, Simon AJ, Nicholas RA. 2000. Comparison of *in vitro* activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Record.*, **146**, 745–747.
- Booker CW, Jim GK, Guichon PT, Schunicht OC, ThorlaksonBE y Lockwood PW. 1997. Evaluation of florfenicol for the treatment of undifferentiated fever in feedlot calves in western Canada. *Can. Vet. J.*, **38**, 555–560.

- Bretzlaff KN, Neff-Davis CA, Ott RS, Koritz GD, Gustafsson BK y Davis LE. 1987. Florfenicol in non-lactating dairy cows: pharmacokinetics, binding to plasma proteins, and effects on phagocytosis by blood neutrophils. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **10**, 233–240.
- Byung KP, Jong-Hwan L, Myoung-Seok, Youn-Hwan H, Hyo-In Y. 2007. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in dogs. *Res. Vet. Sci.*, **84**, 85–89.
- Cannon M, Harford S, Davies J. 1990. A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **26**, 307–317.
- Chang SK, Davis JL, Cheng CN, Shien RH, Hsieh MK, Koh BW, Chou CC. 2009. Pharmacokinetics and tissue depletion of florfenicol in Leghorn and Taiwan Native chickens. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **33**, 471–479.
- EMA. European agency for the evaluation of medicinal products. 2010. Guidelines for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products. EMA/CVMP/016/00-Rev.2-CONSULTATION.
- Graham R, Palmer D, Pratt BC y Hart CA. 1988. *In vitro* activity of florfenicol. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **7**, 691–694.
- Himelfarb MA, Lorenzutti AM, Espeche VM. 2007. Disposición plasmática y láctea de florfenicol en cabras. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, **1**, 108-112.
- Ho SP, Hsu TY, Che MH, Wang WS. 2000. Antibacterial effect of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol against aquatic animal bacteria. *J. Vet. Med. Sci*, **62**, 479–485.
- Ings RM, 1990. Interspecies scaling and comparisons in drug development and toxicokinetics. *Xenobiotica* **20**, 1201–1231.

- Jiang H, Feng Q, Zeng Z, Chen Z. 2001. Pharmacokinetics of florfenicol in pigs. *Chi. J. Vet. Sci.*, **21**, 86–89.
- LavyE, Ziv G, Soback S, Glickman A, Winkler M. 1991. Clinical pharmacology of florfenicol in lactating goats. *Acta Vet. Scand. (Supplement)*, **87**, 133–136.
- Lifschitz A, Sallovitz J, Imperiale F, Pis A, Jauregui LJ, Lanusse C. 2004. Pharmacokinetic evaluation of four ivermectin generic formulations in calves. *Vet. Parasitol.*, **119**, 247–257.
- Marshall SA, Jones RN, Wanger A, Washington JA, Doern GV, Leber AL, Haugen TH. 1996. Proposed MIC quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility tests using seven veterinary antimicrobial agents: ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol, penicillin G-novobiocin, pirlimycin, premafloxacin and spectinomycin. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2027–2029.
- Matta X. 2012. Determinación de bioequivalencia entre dos formulaciones farmacéuticas de florfenicol en bovinos de carne. Tesis para optar al título profesional de Médico Veterinario. 9-15.
- Maya JD. 2007. Farmacocinética: Absorción y Distribución [en línea] <http://www.medwave.cl/cursos/farmacologia/2/1.act?tpl=im_ficha_cursos.tpl> [consulta: 23-03-2013]
- McKeller QA, Varma KJ. 1996. Pharmacokinetics and tolerance of florfenicol in *Equidae*. *Equine Vet. J.*, **28**, 209–213.
- Murray IA, Shaw WVO. 1997. Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 1–6.
- Neu HC, Fu KP. 1980. *In vitro* activity of chloramphenicol and thiamphenicol analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 311–316.

- Nordmo R, Varma KJ, Sutherland IH y Brokken ES. 1994. Florfenicol in Atlantic salmon, *Salmosalar L.*: field evaluation of efficacy furunculosis in Norway. *J. Fish Dis.*, **17**, 239–244.
- Peyrou M, Bousquet-Melou A, Laroute V, Vrins A, Doucet MY. 2006. Enrofloxacin and marbofloxacin in horses: comparison of pharmacokinetic parameters, use of urinary and metabolite data to estimate first-pass effect and absorbed fraction. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **29**, 337–344.
- Riviere JE, Martin-Jimenez T, Sundlof SF, Craigmill AL. 1997. Interspecies allometric analysis of the comparative pharmacokinetics of 44 drugs across veterinary and laboratory animal species. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **20**, 453–463.
- Sams RA. 1995. Chemistry and metabolism of a novel-broad-spectrum antibiotic. *Tierarztl. Umsch.*, **50**, 703–707.
- Sheldon IM. 1997. A field trial of florfenicol for enteric disease in calves. *Cattle Practice*, **5**, 195–198.
- Shen J, Wu X, Hu D, Jiang H. 2002. Pharmacokinetics of florfenicol in healthy and *Escherichia coli*-infected broiler chickens. *Res. Vet. Sci.*, **73**, 137–140.
- Soback S, Paape MJ, Filep R y Varma KJ. 1995. Florfenicol pharmacokinetics in lactating cows after intravenous, intramuscular and intramammary administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **18**, 413–417.
- Sumano LH, Gutiérrez OL, Zamora MA. 2001. Bioequivalence of four preparations of enrofloxacin in poultry. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **24**, 309 – 313.
- Syriopoulou VP, Harding AL, Goldmann DA y Smith AL. 1981. *In vitro* antibacterial activity of fluorinated analogs of chloramphenicol and thiamphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **19**, 294–297.

- Ueda Y, Suenaga I. 1995. In vitro antibacterial activity of florfenicol against *Actinobacillus pleuropneumonia*. *J. Vet. Med. Sci.*, **57**, 364–365.
- Varma KJ, Adams PE, Powers TE, Powers JD y Lamendola JF. 1986. Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **9**, 412–425.
- Voorspoels J, D'Haese E, De Craene BA, Vervaeet C, De Riemaeker D, Deprez P, Nelis H, Remon JP. 1999. Pharmacokinetics of florfenicol after treatment of pigs with single oral or intramuscular doses or with medicated feed for three days. *Vet. Rec.*, **154**, 397–399.