



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

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

**DISEÑO, DESARROLLO Y EVALUACIÓN  
FARMACOCINÉTICA DE UN PREPARADO  
SUBCUTÁNEO DE LIBERACIÓN MODIFICADA  
DE CLORHIDRATO DE TRAMADOL EN PERROS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**IBETH MAYERLY GAITÁN TOLOSA**

**TUTORA: LILIA GUTIÉRREZ OLVERA**

**COMITÉ TUTORAL: MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD**

**HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ**

**México, D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## DEDICATORIA

**A Papito Dios;** hoy entrego a ti la culminación del proyecto más importante de mi vida profesional y te doy infinitas gracias por haberme dado esta oportunidad, por acompañarme en cada etapa, por haberme sostenido en los momentos más grises y oscuros, por ser esa luz cálida e intensa que ilumino cada idea y cada prueba. Sin ti nada en mi vida tendría sentido ni razón de ser y este hermoso trabajo jamás habría valido la pena. Tu hijita Colombiana que tanto te ama.

**A mi amada Familia Colombiana;** a mis raíces sagradas (MAMI, PAPI Y DANNI-MILO) que aún siguen sosteniéndome y llenándome de tanto amor. Les dedico con todo el respeto y admiración este trabajo al que le he puesto todo mi cariño, empeño y entendimiento; el cual deseo sea para ustedes un símbolo de gratitud, un homenaje a cada gota de esfuerzo y amor que siguen compartiéndome, y que es un regalo desde el fondo de mi corazón. A toda mi gente linda de Colombia (Toda mi familia: Tía Fulvi, Chepe, mis anhelados primos, tías y tíos. El grupo de las niñas, mi familia DOVER y mis verdaderos amigos: Fotocopia, Josma, Raquelita, Chiquilino y Waldo) que con una llamada, un correo, un pensamiento o una oración estuvieron presentes en mi vida en México para contagiarme de ánimo, de alegría y de esa pasión que nos caracteriza. A mi “Buelis blanquita”, el angelito más tierno y amado que tengo.

**A mi Colombia del alma,** es un orgullo que corra por mi sangre tu alegría, tu empuje y esa pasión que contagia al mundo.

**A mi Familia Mexicana;** a mi amado esposo (Mi príncipe Mexicano) y al fruto más hermoso de nuestro amor (Mi amada Zoe Sophia), solo puedo agradecer el apoyo incondicional que me brindaron cada día y cada noche para hacer uno de mis más bellos sueños realidad, el obtener mi grado de Maestría en la FMVZ UNAM. Sin ustedes no habría sido posible este gran logro, por eso creo que este título no es solo mío sino de la FAMILIA ALANIS GAITÁN y no me queda más que expresarles una vez más que son la razón más importante de mi vida y que los amo al infinito y más allá. Gracias Diosito porque nos permitiste estar juntos y siempre estaremos juntos y nunca nadie podrá separarnos, Amén. A mi segunda familia (Mami Mely, Rodri, Wicho, “La Bis”, Tía Lulú, Tía Laurita, Tío Enrique, Tía Elided, Tía Lety, Familia Takeda, Familia Yarto) gracias por darme un lugar en sus vidas y adoptarme como una hija, una hermana, una nieta o una sobrina; es algo que jamás podré olvidar y agradeceré eternamente; saben que mi cariño, respeto y admiración están con ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

**A mis grandes Maestros;** Dra. Lili, que decirle a una de las personas más inteligentes, generosas, divertidas, emprendedoras y maravillosas que he conocido; Gracias, gracias por haber creído en mí, por haberme guiado sabiamente en este camino y por apoyarme sin límites. Dra. María Josefa, como expresarle mi agradecimiento a una persona tan dulce, tan brillante y tan increíble, solo deseándole las cosas más bellas de la vida, gracias por ser una luz tan cálida. Dr. Sumano, reconozco que al principio tuve mucho miedo cuando aceptó ser mi tutor, ha sido una gran responsabilidad; pero con el tiempo ese miedo se convirtió en “respeto puro”; aunque usted no lo crea cuando apenas era una joven estudiante en mi querida U.D.C.A en Bogotá, Colombia; mi materia favorita fue farmacología; por supuesto conocía sus libros y soñaba con algún día conocerlo y aún más, tener el privilegio de ser su alumna. Y hoy ese sueño se hizo realidad, por ello solo puedo dar gracias a Papá Dios por haber permitido que usted moldeara mis conocimientos y me enseñara a investigar. Con todo el respeto que usted se merece, gracias mi apreciado Maestro.

**Un agradecimiento especial** a la Dra. Elba Rojas, una mujer ejemplar, correcta e impecable; que con su experiencia y apoyo incondicional me supo guiar en el mundo de la cromatografía y en el de la vida misma; gracias por la paciencia que me tuviste y por enseñarme de una forma tan bonita y puntual.

**A mis queridos profes de mis materias favoritas;** Dra. Sara Caballero, Dr. Carlos Gutiérrez, Dr. René Rosiles y Dr. Javier Rojo; gracias por llenarme de sus valiosos conocimientos y experiencias; pero sobre todo por su calidad humana. Un agradecimiento especial a la Dra. Dinorah Vargas por su apoyo constante y valioso (especialmente con el HPLC y el diseño del polxámero). A todas las personas del Departamento de Fisiología y Farmacología, al Departamento de Enseñanza quirúrgica de la FMVZ UNAM, que de alguna u otra forma me ofrecieron una colaboración valiosa. Al Bioterio de la Facultad de Medicina por su donación.

**A mi respetado comité tutorial:** Dra. Lilia Gutiérrez, Dra. Elba Rojas, Dra. Sara Caballero, Dr. Gabriel Ruíz y Dr. Jesús Gracia; les agradezco infinitamente sus valiosas y oportunas aportaciones para enriquecer este trabajo y por ser unos angelitos en los momentos más difíciles.

**A mi México lindo y querido;** a todos esos angelitos Mexicanos y Colombianos: Pá amarillo, Dra. Lulú, Dr. Paredes, Sam, Regis, Enrique, Beto y Mitch, Luchito y la monita querida, Lili y Enrique, Lili y Antonio, Lili Muñoz, Dra. Pati, Dra. Yuckie, Tani Tapia, Ale Ostos, Yolita, Kukis, los Jacobs, Manu, Gusanito, las mamitas del Cintrón, Marquito, Hernancín, Martica y Dani, y tantos más que me cuidaron desde el primer día que llegue y a lo largo de mis casi 8 años en estas hermosas tierras Mexicanas; “GRACIAS” por enseñarme que el corazón de un Mexicano es cálido, generoso y muy picante.

**A mi amada UNAM;** solo puedo decirte que es un honor pertenecer y forjarse en la mejor institución universitaria de América Latina y en una de las más prestigiadas academias del mundo.

## RESUMEN

El manejo del dolor es uno de los retos más importantes a los que se enfrentan los Médicos Veterinarios, debido a que los malos manejos terapéuticos pueden prolongar el sufrimiento de los pacientes y/o inducir efectos secundarios indeseables. Existen diferentes fármacos para controlar los distintos tipos de dolor (ligero, moderado, severo, agudo o crónico). En pequeñas especies es común el uso de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs); sin embargo sus efectos adversos imponen limitantes. Uno de los analgésicos que destaca por su nula capacidad para producir irritación gástrica y por su notable efecto analgésico basado en acciones centrales y relacionadas con receptores morfomiméticos, es el tramadol. Este fármaco es un análogo semisintético relacionado con los opioides. Se le ha usado con mucho éxito para el control de dolor en humanos, se ha reportado en pacientes con: dolor agudo, dolor crónico oncológico y no oncológico, dolor neuropático y dolor crónico; así como para analgesia pre y post-operatoria. Lo anterior abre una ventana importante para su uso en perros, en esta especie, el tramadol se metaboliza rápida y extensamente después de la administración oral y posee una eliminación renal muy rápida, haciendo que su intervalo de dosificación sea corto (<6 h). Por lo tanto, para adecuar este principio activo en perros se necesita una liberación modificada (larga acción). Esto se investigó mediante el diseño y evaluación de tres preparados de administración subcutánea de tramadol incluido en matrices poliméricas. Los preparados se administraron inicialmente en ratas para evaluar las reacción en el sitio de aplicación y elegir los mejores prototipos para administrarlos posteriormente a 30 perros clínicamente sanos (10 por grupo) para realizar la evaluación farmacocinética, como comparativo se incluyeron dos productos farmacéuticos orales de uso humano (liberación inmediata y larga acción [LA], 10 animales por grupo) todos a razón de 5 mg/Kg. Se analizaron las concentraciones séricas del tramadol por medio de una técnica de cromatografía de líquidos (HPLC) con un detector de fluorescencia. A partir de estas evaluaciones se encontró que hay un potencial efecto terapéutico de 12 horas para los preparados de carbopol y quitosan y de más de 24 horas para el poloxámero. Estos preparados de tramadol para aplicación subcutánea pueden llegar a ser una herramienta muy importante en la clínica de pequeñas especies ya que ofrecen una alternativa analgésica con muy pocos efectos adversos.

## ABSTRACT

Managing pain is one of the most important challenges that veterinarians, face given that mismanagement on therapy can prolong the suffering of patients and / or could induce undesirable side effects. There are several drugs to control various types of pain (slight, moderate, severe, acute or chronic). It is common to use non-steroidal anti-inflammatory painkillers (NSAIDs) on small species, but there are limitations imposed adverse effects. One painkiller known for its inability to produce gastric irritation and for its outstanding share-based analgesic effect based to central actions related to morphine-mimetic receptors is tramadol. This drug is a semi-synthetic analogue related to opioids. It has been used successfully to control pain in humans, has been reported for patients with severe pain, chronic non-cancer and cancer related pain, neuropathic pain and chronic pain and analgesia pre-and post-operative. This opens opportunities for its use in dogs, in this species; tramadol is rapidly and extensively metabolized after oral administration and presents fast renal elimination, producing shorter dosing intervals (< 6 h). Therefore, to bring this agent in dogs a modified release rate (long acting) is required. This was researched through the design and evaluation of three preparations subcutaneous administration of tramadol included in polymer matrices. The preparations were administered initially in rats to evaluate the reaction at the site of application and choose the best prototypes administrated later to 30 healthy dogs (10 per group) for pharmacokinetic evaluation, also, two oral pharmaceutical products for humans were included for comparison (fast release rate and long-acting [LA], 10 animals per group) all at 5 mg/Kg rate. We analyzed serum concentrations of tramadol by means of a liquid chromatography technique (HPLC) with fluorescence detector. From these evaluations we found that there is a potential therapeutic effect of 12 hours for carbopol and chitosan preparations and more than 24 hours in the poloxamer. These preparations of tramadol applied subcutaneously can become an important tool in the small animal treatment and offer an alternative analgesic with few adverse effects.

# ÍNDICE

<b>DEDICATORIA</b> .....	II
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	III
<b>RESUMEN</b> .....	IV
<b>ABSTRACT</b> .....	V
<b>ÍNDICE</b> .....	VI
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	2
2.1 Propiedades fisicoquímicas del tramadol .....	2
2.2 Mecanismo intracelular de la analgesia opioide .....	3
2.3 Otros efectos farmacológicos del tramadol .....	4
2.4 Farmacocinética del tramadol .....	5
2.5 Teoría de la liberación modificada.....	8
2.6 Matrices poliméricas.....	9
2.6.1 Carbopol.....	12
2.6.2 Poloxámero .....	12
2.6.3 Chitosan .....	13
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	14
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	15

<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	15
6.1 FASE I .....	15
6.2 FASE II .....	15
6.3 FASE III .....	15
6.4 FASE IV .....	16
6.5 Desarrollo de cada fase.....	16
6.5.1 FASE I .....	16
6.5.2 FASE II .....	16
6.5.2.1 Prueba de tramadol en ratas .....	16
6.5.2.2 Formación de polímeros y reacciones cutáneas .....	17
6.5.2.3 Adición del tramadol .....	18
6.5.3 FASE III .....	19
6.5.3.1 Técnica Cromatográfica .....	19
6.5.3.1.1 Reactivos Químicos.....	19
6.5.3.1.2 Preparación de las disoluciones estándar y de trabajo .....	20
6.5.3.1.3 Equipo .....	20
6.5.3.1.4 Condiciones cromatográficas .....	20
6.5.3.1.5 Preparación de las muestras .....	21
6.5.3.1.6 Extracción en fase sólida (EFS) .....	21
6.5.3.1.7 Límite de detección y cuantificación .....	22
6.5.4 FASE IV .....	23
6.5.4.1 Conformación de los grupos.....	23
6.5.4.2 Procesamiento de los resultados.....	25
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	26
7.1 FASE I .....	26
7.1.1 Matrices poliméricas elegidas .....	26
7.2. FASE II .....	26
7.2.1 Prueba de tramadol en ratas .....	26
7.2.2 Reacción en el sitio de aplicación .....	27
7.2.2.1 Ratas .....	27



7.2.2.2 Perros.....	29
7.3 FASE III.....	31
7.3.1 Ultravioleta visible (UV-Vis ).....	31
7.3.2 Curva de Calibración.....	31
7.3.3 Límite de Detección (Ld) y Cuantificación (Lc).....	33
7.3.4 Cromatogramas.....	34
7.4 FASE IV.....	41
7.4.1 Resultados farmacocinéticos.....	41
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>X. REFERENCIAS.....</b>	<b>50</b>
<b>XI. CUADROS Y FIGURAS</b>	
Cuadro 1.....	6
Cuadro 2.....	9
Cuadro 3.....	16
Cuadro 4 y 5.....	17
Cuadro 6 y 7.....	18
Cuadro 8.....	21
Cuadro 9.....	26
Cuadro 10.....	27
Cuadro 11.....	29
Cuadro 12.....	31
Cuadro 13,14 y 15.....	33
Cuadro 16 y 17.....	44
Figura 1.....	3
Figura 2.....	7
Figura 3, 4 y 5.....	28
Figura 6, 7 y 8.....	30

Figura 9 .....	31
Figura 10 y 11 .....	32
Figura 12 .....	34
Figura 13 y 14 .....	35
Figura 15 y 16 .....	36
Figura 17 y 18 .....	37
Figura 19 y 20 .....	38
Figura 21 y 22 .....	39
Figura 23 y 24 .....	40
Figura 25 y 26 .....	41
Figura 27, 28 y 29 .....	42
Figura 30 .....	43

## **XII. ANEXOS**

Anexo 1 Escala de evaluación de los signos del dolor en perros.

Anexo 2 Fármacos analgésicos antiinflamatorios no esteroidales (AINEs) y derivados narcóticos utilizados en el perro.

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el manejo del dolor es uno de los retos más importantes a los que se enfrentan los Médicos Veterinarios Zootecnistas (MVZ). Precisamente por el carácter subjetivo del dolor, en el área veterinaria se propician malos manejos que pueden llegar a prolongar el sufrimiento del paciente. La incapacidad de tasar la magnitud del dolor por el médico veterinario no niega la posibilidad de que un individuo lo experimente. Esto obliga a proporcionar tratamientos apropiados para su alivio<sup>1</sup>.

El dolor se puede definir como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con una lesión real o potencial del tejido<sup>2</sup>. La falta de comunicación verbal representa un obstáculo hasta ahora insalvable para caracterizar la magnitud y el tipo de dolor que puede estar sufriendo un perro. Por ello las clasificaciones que existe de severidad del dolor, se basan en una mezcla de antropomorfismo y etología<sup>3-6</sup>. Existen diferentes tipos de dolor; como el superficial que resulta de la estimulación de los receptores del dolor en la piel y el dolor profundo que se presenta de las estructuras subyacentes como el músculo, articulaciones, tendones, el periostio y ligamentos. El dolor visceral que se extiende desde los receptores de la pared visceral, susceptibles a cambios en la forma y la tensión. En el anexo 1 se resumen las clasificaciones sugeridas y detalladas en la literatura formal de la evaluación de los signos del dolor.

Dependiendo de la duración, el dolor puede ser agudo o crónico<sup>7</sup>. Sin embargo, existen muchas otras formas de describirlo como punzante, sordo, con ardor, etc. Existen dos vías de transmisión del dolor, una rápida y otra lenta. El dolor rápido es conducido por fibras de tipo A $\delta$  que por ser mienilizadas, alcanzan a transmitir el impulso a una velocidad de hasta 80 m/s; y el dolor lento que está dado por fibras tipo C amielínicas que conducen al estímulo doloroso a una velocidad aproximada de 2 - 4 m/s<sup>3,8,9</sup>.

Por referencia al anexo 1 se pueden establecer 4 niveles de dolor y en estudios de farmacocinética/farmacodinamia puede ser útil la siguiente escala:

- **Forma no calificable del dolor:** 0 – 6 puntos.
- **Dolor leve:** 6 – 12 puntos.
- **Dolor moderado:** 12 – 18 puntos.
- **Dolor severo:** 18 – 24 puntos.
- **Dolor muy severo:** 24 – 32 puntos.

En la clínica de perros y gatos se utilizan comúnmente los analgésicos antiinflamatorios no esteroidales (AINEs, anexo 2) aunque estos en general proveen un buen estado de analgesia, la mayoría de ellos están acompañados de marcados efectos secundarios por su mecanismo de acción como gastritis, úlceras gástricas e incluso insuficiencia renal, que pueden poner en riesgo la vida del paciente <sup>3,10-12</sup>.

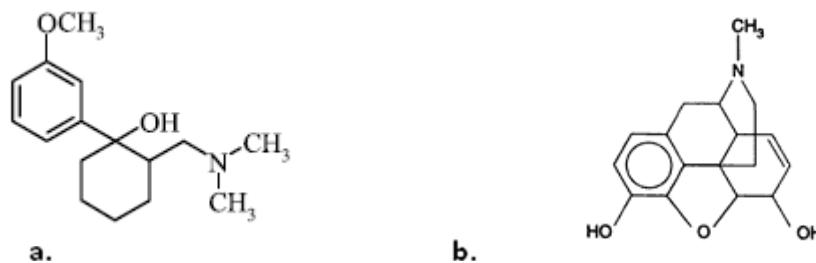
Uno de los analgésicos, no AINE, que destacan por su virtual o nula capacidad para producir irritación gástrica y por proveer un notable efecto analgésico basado en acciones centrales y relacionadas con receptores morfimomiméticos, es el tramadol<sup>13-15</sup>.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 Propiedades fisicoquímicas del tramadol**

El clorhidrato de tramadol (1RS, 2RS)-2[[Dimetilamino)metil]-1-(3-metoxifenil) ciclohexanol, (C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>·HCl); es un polvo blanco, cristalino, amargo e inodoro, tiene una solubilidad de 0.75 mg/mL, es fácilmente soluble en agua y metanol, pero poco soluble en acetona. Posee un pKa del grupo amina de 8.3 y de 9.41 para el grupo OH, un coeficiente de partición (log P octanol/agua) de 3.01, su

peso molecular es de 299.8 g/mol, con un punto de fusión de 179 – 181 °C y una detección ultravioleta UV-Visible de 272 – 279 nm y espectro infrarojo (principal pico de número de ondas: 1601, 1575, 1284, 1238, 1042 y 702  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>16,17</sup>. Es un análogo semisintético relacionado con la familia de los opioides, se le considera un derivado de la codeína y estructuralmente relacionado con la morfina ya que corresponde a una piperidina relacionada con el grupo fenantreno de los alcaloides del opio<sup>18,19</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Estructuras químicas, **a.** Tramadol<sup>20</sup> y **b.** morfina<sup>21</sup>.

El tramadol es administrado como una mezcla racémica de dos enantiómeros (+ y -), el enantiómero (+) que tiene mayor afinidad a los receptores  $\mu$  y un mayor efecto inhibitorio en la recaptación de 5-HT, mientras que el enantiómero (-) muestra un mayor efecto inhibitorio en la recaptación de norepinefrina e incrementa su liberación por activación del autoreceptor<sup>22-24</sup>. En estudios *in vitro* se ha observado que la presencia de los enantiómeros (+) y (-) son necesarios para que se dé el efecto analgésico<sup>23</sup>.

## 2.2 Mecanismo intracelular de la analgesia opioide

Se han identificado varios genes que codifican los receptores opioides  $\mu$  (mu),  $\delta$  (delta) y  $\kappa$  (kapa)<sup>18</sup>; dichos receptores pertenecen a la familia de los receptores heterotriméricos pares de la proteína G (posee 3 subunidades,  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta) y  $\gamma$  (gamma)). Los agonistas opioides como el tramadol, dan lugar a la

activación intracelular de esta proteína. Cuando se activan los receptores opioides por medio de agonistas opioides, dan lugar a la activación de la subunidad G $\alpha$ i y a la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, provocando una reducción significativa en los niveles basales intracelulares del AMPc. También los receptores opioides ubicados en terminales presinápticos de fibras nociceptivas C y A $\delta$  activados igualmente por agonistas opioides, inhiben de manera indirecta el voltaje dependiente de los canales de Ca $^{++}$  (calcio) por medio de la disminución del AMPc; generando un bloqueo de la liberación de los neurotransmisores como el glutamato y la sustancia P, produciendo de esta forma analgesia. Por otro lado estos receptores activan la subunidad  $\beta\gamma$  que permiten la apertura de los canales de K $^{+}$  (potasio), provocando una hiperpolarización de la membrana celular, disminuyendo la excitabilidad celular y por ende una atenuación de la transmisión neuronal<sup>25,26</sup>.

### **2.3 Otros efectos farmacológicos del tramadol**

Se ha encontrado que el tramadol tiene efectos anticolinérgicos, dentro de los cuales se encuentra el aumento del pH gástrico por efectos sobre la inhibición en la función de los receptores muscarínicos (Tipo M3) en la contracción del músculo liso y en la secreción glandular<sup>27</sup>, posee actividad antitusiva<sup>13</sup>; en roedores induce efectos antidepresivos por disminución del acoplamiento frontocortical de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, los 5-HT<sub>2a</sub> y los  $\alpha_2$ -adrenoreceptores; por otro lado incrementa el acoplamiento de los receptores  $\alpha_1$ -adrenoreceptores y los D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> dopaminoreceptores<sup>28</sup>. Rojas-Corrales *et al* (2000)<sup>29</sup> encontró que la combinación de pindolol, un  $\beta$ -bloqueador antagonista de los receptores somatodendríticos de 5-hidroxitriptamina (5-HT<sub>1A-1B</sub>) y el tramadol, inhibidor de la reabsorción de serotonina; pueden potenciar el efecto de 5-HT a nivel de las terminales nerviosas, produciendo una analgesia más eficaz, al igual que otros bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos a los narcóticos, como la meperidina y propanolol<sup>30</sup>. En 2004 Rojas-Corrales *et al*, sugieren que el tramadol tiene muchas

de las características neuroquímicas pre y post-sinápticas de un antidepresivo convencional<sup>31</sup>.

## **2.4 Farmacocinética del tramadol**

El tramadol se ha usado con mucho éxito en humanos, se ha reportado en pacientes con: dolor agudo<sup>15</sup>, dolor crónico no oncológico<sup>32</sup>, dolor oncológico<sup>16</sup>, dolor neuropático y dolor crónico<sup>33</sup>; así como para analgesia pre y post-operatoria<sup>34,35</sup>.

La eficacia analgésica del tramadol, es el resultado de una interacción compleja de receptores opiáceos, adrenérgicos y serotoninérgicos. Actúa como un opioide agonista débil, estimulador de los receptores  $\mu$  y por otro lado ejerce una acción central sobre la vías inhibitorias descendentes, inhibiendo la recaptación de serotonina y noradrenalina<sup>14,36,37</sup>.

El tramadol presenta una farmacocinética de primer orden<sup>13,38,39</sup>. No se han observado efectos adversos en perros, administrando tramadol a dosis de  $11.2 \pm 2$  mg/Kg vía oral y de 4.4 mg/Kg intravenosa<sup>13</sup>; sin embargo, a la administración experimental del metabolito principal M1 (O-desmetiltramadol) a dosis de 1 mg/Kg IV, se ha observado náusea, salivación, aumento de la deglución, vomitó y sedación moderada; todos los signos fueron transitorios y se corrigieron en un lapso de 4 horas<sup>13</sup>. Los principales efectos adversos reportados en humanos son: náusea, mareo, somnolencia, sequedad en la boca y sudoración; otros como vómito, cefalea, estreñimiento y dolor abdominal se observan en menos del 1% de los pacientes<sup>13,32</sup>.

Las concentraciones plasmáticas terapéuticas de tramadol establecidas en perros van de 100 a 800 ng/mL y se sabe que a concentraciones terapéuticas por debajo de los 100 ng/mL no generan un buen estado de analgesia<sup>13</sup>.

En humanos, el tramadol se absorbe rápido y casi completamente después de la administración oral, teniendo una biodisponibilidad del 65 - 70% por el efecto del primer paso. La biodisponibilidad se incrementa cuando se administra por vía rectal a 77% y hasta un 100% por vía intramuscular<sup>40</sup>, a dosis de 11.2 mg/Kg por vía oral<sup>13</sup> se obtiene concentraciones plasmáticas máximas ( $C_{max}$ ) de  $1.402 \pm 0.695 \mu\text{g/mL}$  a las  $1.04 \pm 0.51$  horas ( $T_{max}$ ). En perros se ha observado una biodisponibilidad del 65% a la administración oral de tabletas de liberación inmediata y del 10% con cápsulas de liberación sostenida<sup>41</sup> (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Farmacocinética del tramadol en perros y otras especies<sup>12,13,36,48</sup>.

PARÁMETRO	HUMANO	PERRO	GATO	CABALLO	CAMELLO
DOSIS (mg/Kg)	PO: 50 mg IV: 100 mg	PO: 5 - 11.2 IV: 1 - 4.4, IM: 4 PO-LA: Tab. 100 mg	PO: 5.2 IV: 2 IM: 4	PO, IV, IM: 2	IV, IM: 2.3
$C_{max}$ (ng/mL)	$280 \pm 49$	PO: $1402 \pm 695$ PO-LA: 0.04 mg/mL	PO: $914 \pm 232$	PO: 33 (21) $\pm 19$	IM: $0.44 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}^{-1}$
$T_{max}$ (h)	2	PO: $1.04 \pm 0.51$ PO-LA: 3	PO: 25 min	PO: 50 (45) $\pm 18$ min	IM: $0.57 \pm 0.11$
BIODISPONIBILIDAD (%)	65 - 75	PO: $65 \pm 38$ PO-LA: 10	PO: $93 \pm 7$	PO: 3	PO: $101.62 \pm 9.38$
VOLUMEN DE DISTRIBUCIÓN (L/Kg)	3	PO: $3.01 \pm 0.45$ IV: $3.79 \pm 0.93$	IV: $3103 \pm 132$ mL/Kg	V: $2.17 \pm 0.52$	IV: $2.58 \pm 0.44$
$\beta_{1/2}$ (h)	6	PO: $1.71 \pm 0.12$ IV: $0.80 \pm 0.12$	PO: $134 \pm 18$ min IV: $204 \pm 8$ min	IV: $82 \pm 10$ min	IV: $1.33 \pm 0.18$
DEPURACIÓN (mL/min/Kg)	6	PO: $52.33 \pm 23.97$ IV: $54.63 \pm 8.19$	PO: $18.6 \pm 3.2$ IV: $20.8 \pm 3.2$	IV: $26 \pm 3$	IV: $1.94 \pm 0.18$ L/h/Kg
UNIÓN A PT (%)	20	-	-	-	-
CONCENTRACIÓN TERAPÉUTICA ( $\mu\text{L/L}$ )	100 - 800	-	-	-	-
DOSIS TÓXICA (mg/L)	1.0	-	-	-	-
DOSIS LETAL (mg/L)	2.0	-	-	-	-

. PT: Proteínas plasmáticas  
. IV: Endovenoso

. PO: Vía oral  
. IM: Intramuscular

. PO-LA: Vía oral- larga acción  
. Tab: Tabletas



Se han realizado estudios del metabolismo del tramadol en diferentes especies como ratas<sup>38</sup>, conejos<sup>42</sup>, gatos<sup>43</sup>, perros<sup>38</sup>, cerdo de guinea<sup>22</sup>, cabras<sup>44</sup>, caballos<sup>45</sup>, camellos<sup>46</sup>, burros<sup>47</sup> y humanos<sup>42</sup> (Cuadro 1). En perros se han identificado 26 metabolitos<sup>38</sup>; siendo el 0-desmetiltramadol (M1) el principal metabolito activo<sup>38,42,49</sup>. En ratones, el M1 tiene hasta 200 veces mayor afinidad por receptores  $\mu$  que el tramadol, lo cual le da hasta 6 veces mayor potencia analgésica que el tramadol<sup>42</sup>. La reacción de desmetilación para producir M1, está dada por el citocromo P-450 2D6 (CYP2D6)<sup>13,38</sup>, en otros estudios se ha observado que la actividad del CYP2D juega un papel muy importante en la antinocicepción después de la administración del tramadol (+) ya que ejerce un control en la formación y eliminación del M1 (+)<sup>24</sup>. La biotransformación hepática para el M1 se da principalmente por la vía de la O- y la N- desmetilación<sup>14,40</sup> (Figura 2).

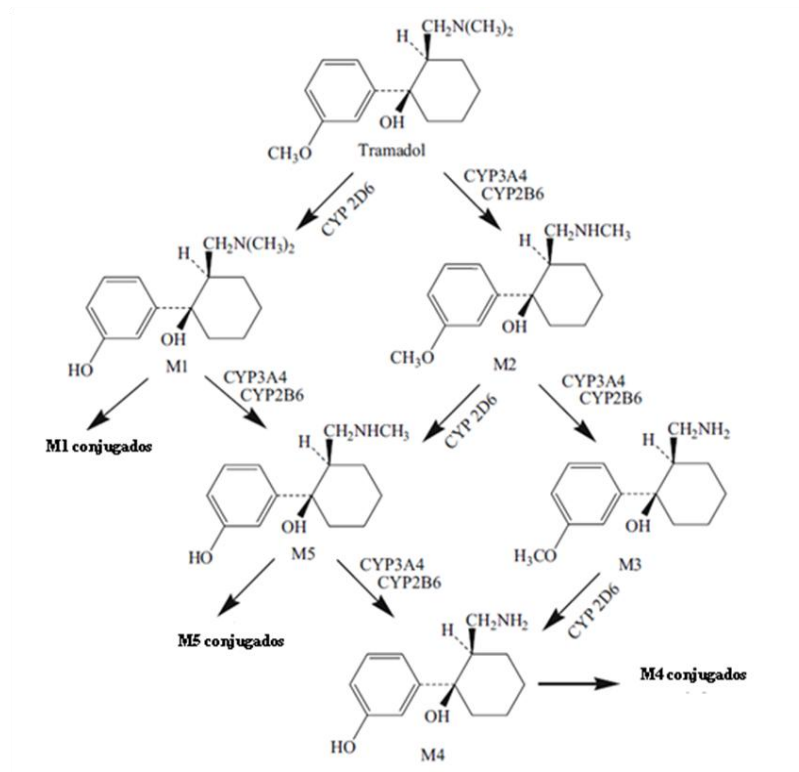


Figura 2. Rutas metabólicas del tramadol<sup>41</sup>.

En general, el tramadol presenta un metabolismo rápido y una eliminación renal por un conjugado glucorónico<sup>41</sup>. En humanos el M1, tiene una vida media de eliminación de aproximadamente 6 h<sup>40,50</sup> y en perros es de 1 – 2 h para la vía oral y de 0.8 h para la vía IV. Por consecuencia se requiere aumentar la frecuencia de administración para mantener una concentración plasmática adecuada<sup>13,50</sup>.

En perros dosificados a razón de 11.2 mg/Kg vía oral, la eliminación es rápida y aproximadamente a las 6 horas las concentraciones están por debajo de los 100 ng/mL<sup>13</sup>. En contraste, la  $C_{max}$  llega a valores superiores o cercanos a 800 ng/mL que, de acuerdo con las referencias clínicas pueden llegar a ocasionar náuseas transitorias y otros efectos colaterales asociados a la ocupación de receptores morfinomiméticos<sup>12,13,51</sup>.

Clínica y farmacológicamente resulta congruente postular que sería deseable tener una absorción inicial más lenta y que lograra  $C_{max}$  menores pero terapéuticas ( $> 100 \text{ ng/mL} < 800 \text{ ng/mL}$ ) y que se mantuvieran por al menos 12 horas para reducir los efectos colaterales y extender el efecto analgésico. Esto puede ser posible mediante el diseño de un preparado de liberación modificada de tramadol<sup>50,52-54</sup>.

## **2.5 Teoría de la liberación modificada**

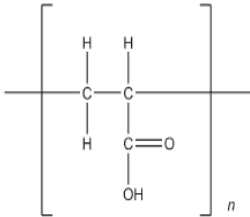
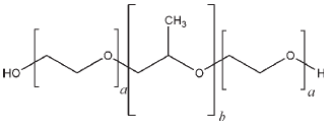
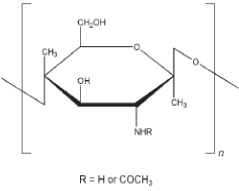
Los sistemas de liberación modificada incorporan el agente bioactivo a un soporte polimérico, lipídico o inorgánico (matriz única, combinación de varias o reservorios)<sup>53</sup>. Considerando que los sistemas de liberación modificada buscan establecer concentraciones plasmáticas constantes por periodos prolongados en comparación con las formas farmacéuticas tradicionales, se busca tener un efecto terapéutico durante más tiempo debido al control de la velocidad con la que se libera el principio activo al organismo. Todo esto con base en las propiedades fisicoquímicas de los polímeros, del principio activo, del pH, de la temperatura y de los fluidos del organismo<sup>53</sup>. Este tipo de diseños pretenden disminuir los

efectos adversos, mantener concentraciones terapéuticas por más tiempo y disminuir la frecuencia de dosificación<sup>50,53,54</sup>.

## 2.6 Matrices poliméricas

En el cuadro 2 se presenta un resumen de las principales matrices poliméricas utilizadas en la elaboración de productos de larga acción. El principio activo se encuentra ampliamente disperso dentro de la matriz polimérica.

**Cuadro 2.** Características de las matrices poliméricas elegidas<sup>55-63</sup>.

CARACTERÍSTICAS	CARBOPOL	POLOXÁMERO	CHITOSAN
<b>Tipo de polímero</b>	Homopolímero del ácido acrílico. Se considera polianiónico por encima de su pKa (3.5)	Copolímero no iónico del polioxi-etileno y del polioxi-propileno. Es neutro a cualquier pH.	Aminopolisacárido. Es un biopolímero polica-tiónico a pH bajos.
<b>Otros nombres</b>	Carbomer Carboximetileno Polímero del ácido acrílico	Pluronic Lutrol Monolan Synperonic	Chitosani Glucosamine Deacetato chitin Deactilchitin
<b>Polímero y Concentración (%) a usar en los preparados</b>	Carbopol 934-P al 0.7	Poloxámero 407 (P-407) o Pluronic F-127 al 10	Chitosan al 0.5
<b>Nombre químico</b>	Carbomer 934	$\alpha$ -Hidro- $\omega$ -hidroxipoli(oxietileno) poli(oxipropileno)poli(oxietileno) bloque copolímero.	Poli- $\beta$ -(1,4)-2-Amino-2 deoxi-D-glucosa
<b>Estructura química</b>			 <p>R = H or COCH<sub>3</sub></p>

CARACTERÍSTICAS	CARBOPOL	POLOXÁMERO	CHITOSAN
<b>Peso Molecular (Daltons)</b>	Carbopol 934-P (29400 – 39400)	9840 – 14 600 (P-407: 12000)	10000 - 1'000000
<b>Concentración %</b>	Para gelificación 0.5 – 2% p/v	15 - 50% p/v	<1 % p/v
<b>pH</b>	2.5 - 3.0 (1% p/v dispersiones acuosas)	5.0 – 7.5 (p/v soluciones acuosas)	4.0 – 6.0 (1% p/v solución)
<b>Punto de Fusión (°C)</b>	260	52 - 57	-
<b>Solubilidad</b>	Agua, alcohol y glicerina.	Agua (+ a temperaturas bajas), etanol y propan-2-ol.	Ligeramente soluble en agua. Soluble en disolventes orgánicos, en soluciones neutras o ácidas y prácticamente insoluble en etanol al 95%.
<b>Neutralizantes</b>	Hidróxido de sodio y potasio, bicarbonato, aminoácidos, trietanolamina, bórax, sodio, aminas orgánicas y aminas lauryl-stearyl.	-	-
<b>Incompatibilidad</b>	Fenoles, polímeros catiónicos, ácidos de cadena corta, electrolitos altamente concentrados, exposición a la luz (oxidación y baja la viscosidad).	Dependen de las concentraciones relativas. El poloxámero 188 es incompatible con fenoles y parabenos.	Agentes oxidantes.

.p/v: peso/volumen

CARACTERÍSTICAS	CARBOPOL	POLOXÁMERO	CHITOSAN
<b>Estabilidad</b>	Estables a temperaturas de hasta 104 °C por 2 horas.	stable en soluciones acuosas en presencia de ácidos, álcalis y metales iónicos.	Muy estables a Temperatura ambiente.
<b>Seguridad</b>	En perros no se ha encontrado daños a 8 g/Kg  LD <sub>50</sub> en ratas es de 4.1 g/Kg	Biocompatible con las células y fluidos del cuerpo. En perros a concentraciones de 5 y 10% no se ha encontrado irritación ni sensibilización en ojos y piel. En un estudio de 14 días a dosis de 0.5g/Kg/IV/día en perros no se observaron efectos adversos. LD <sub>50</sub> en ratas es de 7.5 g/Kg IV y 9.4 g/Kg vía oral	Biocompatible y biodegradable, es considerado como un material no tóxico e irritante.  La LD <sub>50</sub> en ratas es > 16 g/Kg
<b>Aplicaciones</b>	Desarrollo de formulación en la industria cosmética y farmacéutica.  Actúa como material bioadhesivo, como agente de liberación controlada, de emulsificación, de estabilización, de gelificación y de suspensión. Se utiliza en tabletas, geles, emulsiones y cremas; para el control de la liberación de fármacos.	Desarrollo de formulaciones en la industria cosmética y farmacéutica. Actúa como agente solubilizante y emulsificante.  Se utiliza en geles, emulsiones; para el control de la liberación de fármacos.	Desarrollo de formulaciones en la industria cosmética y farmacéutica.  Actúa como un agente de capa, formador de películas, mucoadhesivo y para incrementar la viscosidad. Se utiliza en tabletas, geles, emulsiones, microesferas y conteniendo liposomas; para el control de la liberación de fármacos.

### 2.6.1 Carbopol

Los carbómeros son polímeros sintéticos de alto peso molecular, derivados del ácido acrílico, se caracterizan por ser de carácter hidrofílico y poseer una estructura entrecruzada que les permite formar un sistema de liberación modificada de fármacos<sup>64</sup>. El pH induce la capacidad de gelificación *in situ* y control de la liberación del fármaco, en presencia de pH ácidos puede llegar a incrementar la fuerza iónica del medio y producir una disminución en el grado de hinchamiento del polímero<sup>65</sup> y a pH alcalino se ioniza el grupo carboxílico y aumenta la microviscosidad de la matriz polimérica (relajación de las cadenas poliméricas - formación de redes tridimensionales) que permiten la liberación del fármaco a través de los poros que se forman por el grado de hinchamiento<sup>64</sup>.

Se han administrado geles de carbopol por vía oral, transdérmica, ocular, rectal, nasal<sup>65</sup> y parenteral<sup>66</sup>. Se elimina del organismo sin degradarse, porque no tiene enlaces susceptibles a la hidrólisis u otro tipo de degradación.

### 2.6.2 Poloxámero

Es un tensoactivo no iónico<sup>67</sup> que se caracteriza por ser un copolímero compuesto por tres bloques anfifílicos, dos cadenas laterales idénticas de polioxietileno (hidrofílica) y una cadena central de polioxipropileno (lipofílica)<sup>68</sup> en una proporción en masa de aproximadamente 70% (7 x 10) para la parte hidrofílica y para la masa molecular relativa de la parte hidrofóbica es de 3600 (12 x 300)<sup>69</sup>.

Es considerado un gel termorreversible, ya que, a temperatura ambiente logra una viscosidad muy alta y a temperaturas bajas disminuye la viscosidad y se vuelve líquido<sup>68</sup>. Tiene la capacidad de autoagregarse, formando así micelas,

microemulsiones o fases líquidas cristalinas<sup>64</sup>. Los poloxámeros se han usado por diversas vías de administración como la oral, tópica, intranasal, rectal, vaginal, ocular y parenteral.<sup>67</sup>

La hidratación de los bloques hidrofílicos se debe a su fácil acomodamiento en la estructura del agua; esta hidratación depende en gran medida de la temperatura, por lo tanto, la solubilidad y la formación de los agregados poliméricos en bloques que contienen este grupo polar puede ser regulada por variaciones en la temperatura. Estos polímeros tienen la capacidad de adoptar distintas estructuras cuando se dispersan en el agua, las cuales dependen directamente de la proporción de cada uno de los bloques y de su masa molecular relativa<sup>69</sup>.

Se cree que el proceso de gelificación del P-407 ocurre como consecuencia de la deshidratación del polímero que conduce a un incremento en el plegamiento (enredo) de la cadena polimérica, produciendo una asociación hidrofóbica<sup>67</sup>.

### **2.6.3 Chitosan**

Es un polímero natural, derivado de la quitina a través de la desacetilación alcalina<sup>70</sup>, compuesto por un aminopolisacárido unido a una cadena de -N-acetilglucosamina<sup>64</sup>, es biodegradable y biocompatible<sup>71</sup>. El manejo de la temperatura y del pH estimula el control de la respuesta de los sistemas de liberación de fármacos<sup>72</sup>; se ha observado en dispersiones de chitosan un efecto similar al carbopol, en la presencia de tensoactivos catiónicos<sup>65</sup>.

El chitosan es uno de los polímeros que más aplicaciones biomédicas ha tenido, gracias a las características antes mencionadas y por su baja toxicidad<sup>72</sup>. Se ha mostrado que tiene propiedades mucoadhesivas, debido a las fuerzas de atracción molecular formada por la interacción electrostática entre las cargas

positivas del quitosano y las cargas negativas de las superficies de las mucosas; estas propiedades se pueden atribuir a los puentes de hidrógeno de los grupos –OH y –COOH, a las fuertes cargas y al alto peso molecular<sup>73</sup>. Se ha administrado por las diferentes vías enterales y parenterales<sup>55</sup>.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Con base en experiencias clínicas y lo documentado en la literatura<sup>13</sup>, el tramadol ejerce un efecto analgésico adecuado y con un mínimo de efectos adversos. Sin embargo, para perros no existe una presentación comercial que proporcione concentraciones plasmáticas constantes por más de 6 horas. En el presente trabajo se propone el diseño de un preparado de liberación modificada de administración subcutánea de este analgésico, que ofrezca un efecto terapéutico por lo menos durante 12 horas.

### **IV. HIPÓTESIS**

El tramadol y su principal metabolito activo M1 (O-desmetiltramadol) tienen una vida media corta en perros y para lograr un efecto analgésico adecuado en plasma se requiere de una concentración de 100 a 800 ng/mL. Se espera que la administración de liberación modificada (larga acción-LA) de un preparado del Tramadol (analgésico-polímero) por vía subcutánea de como resultado en su evaluación farmacocinética un efecto analgésico potencial en perros de al menos 12 horas. Lo anterior se postula como posible, mediante el uso de una matriz polimérica que permita modificar la velocidad de liberación del fármaco y a su vez su absorción y eliminación para tener concentraciones terapéuticas por más tiempo.



## V. OBJETIVOS

1. Elaborar varios prototipos y elegir por sus propiedades fisicoquímicas un preparado de tramadol que proporcione una liberación modificada-prolongada que sea susceptible de aplicación por vía subcutánea en perros.
2. Establecer la farmacocinética de un prototipo de tramadol-LA para administrar vía subcutánea en perros, a dosis de 5 mg/kg y proponer un intervalo de dosificación basado en las concentraciones plasmáticas mínimas terapéuticas.
3. Realizar la extracción en fase sólida (EFS) del tramadol en suero de perros y su cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

**6.1 FASE I:** Revisión bibliográfica de diferentes fuentes de información, destacándose las del acervo de la Facultad de Medicina Veterinaria, así como de la Facultad de Química para establecer las matrices poliméricas que interactúen correctamente con el tramadol.

**6.2 FASE II:** Formulaciones y evaluaciones de las matrices poliméricas elegidas de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, en estudios experimentales con ratas.

**6.3 FASE III:** Establecimiento de las condiciones de análisis para la extracción en fase sólida (EFS) y el análisis por HPLC para su determinación cualitativa y cuantitativa.

**Nota:** La determinación del tramadol se llevó a cabo mediante HPLC, teniendo como referencia los métodos de Nobilis et al<sup>40</sup> y el de Gan et al<sup>74</sup>. Se modificó y estandarizó la técnica para este ensayo.

**6.4 Fase IV:** Evaluaciones farmacocinéticas en perros, en función a los resultados obtenidos en la fase III de los preparados de tramadol con las matrices poliméricas que no produjeron necrosis en las ratas y farmacocinética comparativa con preparados farmacéuticos humanos de uso oral de liberación inmediata y de larga acción.

## 6.5 DESARROLLO DE CADA FASE

**6.5.1 Fase I:** Se encontró que las matrices poliméricas de carbopol 934, poloxámero 407 y chitosan son viables para el diseño y desarrollo del preparado subcutáneo de tramadol<sup>53-73</sup>.

**6.5.2 Fase II:** Formulaciones y evaluaciones de las matrices poliméricas elegidas de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas, en estudios experimentales con ratas.

### 6.5.2.1 Prueba de tramadol en ratas

Se emplearon 3 ratas hembras sanas de la cepa Wistar adultas, a las cuales se les administró por vía subcutánea clorhidrato de tramadol (Tradol<sup>®</sup> 50 mg/mL) a dosis de 10 mg/kg, para observar alguna reacción dolorosa, algún tipo de irritación o lesión cutánea (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Administración subcutánea de tramadol en ratas.

IDENTIFICACIÓN RATA	PESO (g)	DOSIS (mg/Kg)	CONCENTRACIÓN TOTAL (mg)	DOSIS (mL)
<b>CARBOPOL 934-P</b>	372.5	10	3.725	0.07
<b>POLOXÁMERO 407</b>	349	10	3.49	0.07
<b>CHITOSAN</b>	336	10	3.36	0.07

### 6.5.2.2 Formación de polímeros y reacciones cutáneas

Se realizaron diferentes modelos poliméricos, hasta obtener el modelo idóneo con las características fisicoquímicas adecuadas para administrar los preparados a los animales, ratas y perros (Cuadros 4, 5, 6 y 7).

**Cuadro 4.** Características de las matrices poliméricas administradas en 3 ratas hembras sanas de la cepa Wistar adultas.

IDENTIFICACIÓN RATA	PESO (g)	POLÍMERO	VOLUMEN DE ADMINISTRACIÓN (mL)
1	90	carbopol 934-P, 0.7% pH: 5.06	0.3
2	90	poloxámero 407, 10% pH: 6.93	0.3
3	90	chitosan, 0.5% pH: 5.01	0.3

**Cuadro 5.** Características de las matrices poliméricas adicionadas con 1 mg/kg de tramadol, administradas en 30 ratas. (10 ratas por polímero).

POLÍMERO	CONCENTRACIÓN %	CANTIDAD mL	pH Inicial	CLORHIDRATO DE TRAMADOL mg/mL	pH Final
CARBOPOL 934-P	0.7	25	5.06	2.4	5.11
POLOXÁMERO 407	10	25	6.93	2.5	6.90
CHITOSAN	0.5	25	5.01	2.0	5.00

**Cuadro 6.** Características fisicoquímicas de las matrices poliméricas que mostraron las mejores características en ratas para administrar en perros.

POLÍMERO	CARBOPOL 934-P	POLOXÁMERO 407	CHITOSAN
Concentración %	0.7	10	0.5
Ácido acético, mL	-	-	0.5
Solución de NaOH 0.5 M, pH 12.87 (µL)	0.5	-	2500
Solución reguladora de pH 0.1 M, pH 5.5 (mL)	25	-	-
Solución reguladora de pH 0.1 M, pH 7.4 (mL)	-	-	22.5
Etanol (mL)	-	2.5	-
Propilenglicol (mL)	-	2.5	-
Agua desmineralizada (mL)	-	20	-
pH	5.23	6.90	5.26

.Soución reguladora de pH  $\text{NaH}_2\text{Po}_4$

### 6.5.2.3 Adición del tramadol

**Cuadro 7.** Características de los preparados subcutáneos que se administraron en los perros.

POLÍMERO	CONCEN-TRACIÓN %	CANTIDAD mL	pH Inicial	CLORHIDRATO DE TRAMADOL mg/mL	pH Final
CARBOPOL 934-P	0.7	25	5.23	100	<b>5.12</b>
POLOXÁMERO 407	10	20	6.93	100	<b>6.90</b>
CHITOSAN	0.5	25	5.01	100	<b>5.00</b>

Para el estudio se emplearon 9 ratas de la cepa Wistar adultas sanas (3 hembras y 6 machos) con pesos promedio al inicio del experimento entre 245 y 350g, las cuales fueron divididas aleatoriamente en 3 grupos; a cada uno se le administró por vía subcutánea 1 mg/kg de tramadol en una matriz polimérica diferente (carbopol 934-P, poloxámero 407 y chitosan) en la región toracolumbar dorsal. Los animales fueron donados por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Posteriormente se evaluaron entre 4 y 72 horas; se les administró pentobarbital sódico intraperitoneal a dosis de 150 mg/kg para eutanasia y se les realizó una incisión en la zona de inyección para observar alguna reacción cutánea y ver la presencia o no de la matriz polimérica.

**6.5.3 FASE III:** Establecer las condiciones de análisis para la extracción en fase sólida (EFS) y el análisis por HPLC para su determinación cualitativa y cuantitativa.

**Nota:** La determinación del tramadol se llevó a cabo mediante HPLC, teniendo como referencia los métodos de Nobilis et al<sup>40</sup> y el de Gan et al<sup>74</sup>. Se modificó y estandarizó la técnica para este ensayo.

### **6.5.3.1 Técnica Cromatográfica**

#### **6.5.3.1.1 Reactivos Químicos**

Clorhidrato de tramadol (Sigma-Aldrich por Grunenthal, México), Fosfato dihidrógeno de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) reactivo grado analítico (Merck<sup>®</sup>, Germany), Metanol, Acetonitrilo y Trietilamina disolventes grado HPLC (J.T. Baker<sup>®</sup>). Agua destilada y filtrada a través de un sistema Prodigio de agua (Simplicity, Millipore<sup>®</sup>).

#### **6.5.3.1.2 Preparación de las disoluciones estándar y de trabajo**

La disolución estándar de tramadol (98% de pureza) se preparó disolviendo 10 mg del fármaco en 10 mL de metanol (disolución “stock” almacenada a 4°C, posteriormente se tomó 250 µL de la mezcla y se aforó a 1mL con metanol (0.25 mg/mL de tramadol), se realizó la extracción en fase sólida, se reconstituyó a un volumen de aforo de 1mL con metanol, se filtró al vial con una membrana de nylon (0.45 µm HNwp). Las concentraciones de tramadol en las disoluciones estándar de trabajo seleccionadas para la curva de calibración (Cuadro 10, Figuras 11 y 12) fueron 0.953, 3.813, 15.253, 61.015, 244.062, 976.25, 3905, 15625, 62500, 125000 y 250000 ng/mL. La ecuación logarítmica ( $\log y = 1/n \log b + 1/n \log X$ , donde Y es la absorbancia AUC, X es la concentración y b es la pendiente) aplicada permitió obtener una recta, donde la absorbancia (respuesta AUC) es proporcional a la concentración.

#### **6.5.3.1.3 Equipo**

Se utilizó un sistema cromatográfico de HPLC (Jasco®, Japón) equipado con una bomba de gradiente cuaternario modelo Jasco PU-2089 plus, con un detector de fluorescencia modelo Jasco – 2020 plus (Intelligent fluorescence detector). La columna analítica de fase C-18 fue una Clipeus con un tamaño de partícula de 5µ y de dimensiones de 100 x 6 mm de diámetro interno, acoplada a una pre-columna Cartridge C-18 (Opti-guard® USA) de 5 µm y 3 mm de diámetro interno). El sistema de HPLC fue controlado por un sistema de cómputo con el Software EZChrom Elite® (Agilent Technologies 2007).

#### **6.5.3.1.4 Condiciones cromatográficas**

Se utilizó como fase móvil una disolución reguladora a pH 6 de fosfatos (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a una concentración 0.01 M, la fase orgánica es la mezcla de

acetonitrilo con 0.1% de trietilamina (90:10 % v/v) en gradiente de elución (Cuadro 8). El flujo empleado fue de 1 mL/min, el volumen de inyección de 20 µL. Las longitudes de onda fueron de 296 nm para la excitación y de 320 nm para la emisión. Para determinar la longitud de onda de máxima absorción del tramadol, se realizó el análisis por UV-Vis (Ultravioleta Visible), (Figura 9, pág 31).

**Cuadro 8.** Gradientes de elución de la fase móvil en el sistema cromatográfico.

TIEMPO min	FLUJO mL/min	FASE MÓVIL ACUOSA %	FASE MÓVIL ORGÁNICA %
0-3	1	90	10
3-11	1	75	25
11-12	1	90	10
12-15	1	90	10

El Buffer de fosfato fresco, fue preparado en un matraz aforado de 1000 mL con 1.36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en agua destilada y filtrada. El pH final de la mezcla fue ajustado a 6.0, la disolución fue degasificada previamente al vacío y filtrada a través de una membrana de nylon Millipore<sup>®</sup> (0.45 µm HNwp), esta fase reguladora se preparó periódicamente. La fase orgánica se preparó bajo las mismas condiciones de filtrado y de forma regular.

#### 6.5.3.1.5 Preparación de las muestras

Las muestras de suero fueron descongeladas a temperatura ambiente y agitadas en un sistema vortex por 30 seg.

#### 6.5.3.1.6 Extracción en fase sólida (EFS)

Se tomaron 2 mL de suero de cada muestra y fueron pasados a través de una columna de fase de extracción sólida (Sep-pack<sup>®</sup> Vac 3 cc, 500 mg, C18

cartridges); primero se activa el cartucho con 2 mL de metanol, seguido de 2 mL de agua y se desecha el residuo, se hace un lavado con 2 mL de una disolución de agua-metanol en una proporción de 95:5 %, igualmente se desecha el residuo. Se colocaron los 2 mL del suero en el cartucho y se recupera la primera elución, se hacen 4 eluciones en un volumen de 2 mL de metanol cada una y se agitaron en un sistema vortex por 30 seg. Las eluciones se juntan y se llevan a sequedad con un sistema de bajo flujo, utilizando nitrógeno durante 2 h en baño seco (Felisa<sup>®</sup>) a 40°C dentro de una campana de extracción. El extracto seco fue reconstituido con 1 mL de metanol, filtrado (Millipore-Millex<sup>®</sup>, HN nylon 0.45 UM, 13 mm, olietileno, 100/cx) y transferido a un vial. Un volumen de 20 µL de la muestra fue analizado en el equipo de HPLC (Figuras 12 – 24).

#### **6.5.3.1.7 Límite de detección y cuantificación**

La determinación del límite de detección (Ld) y límite de cuantificación (Lc) de tramadol por Cromatografía de Líquidos se realizó mediante una serie de diluciones de una solución “stock” (1mg/mL). De esta solución se tomó un volumen de 500 µL y se aforó a 2 mL con metanol (0.25 mg/mL, C1), se inyectaron 20 µL al cromatógrafo, de C1 se tomaron 500 µL y se aforaron con 1 ml de metanol (0.125 mg/mL de tramadol) y se inyectó el mismo volumen al HPLC, se continuaron las diluciones hasta C11 de concentración (0.953 ng/mL), véase cuadro 13. Este experimento tiene la finalidad de determinar la mínima concentración detectada (Ld) por el sistema y en función de ella determinar el límite de cuantificación (Lc). La disolución C10 (3.813 ng/mL) presentó una señal en el tiempo de retención del tramadol que por su baja respuesta se confundía con el ruido del sistema cromatográfico. Se toma la disolución C9 (15.253 ng/mL) y en una serie de n =7 inyecciones se determina Ld y 10 veces más este resultado es el Lc. (Cuadros 13 – 15).



-  $Ld = 2t \times \sigma / (n)^{1/2}$

Donde: .t: t student

.σ: desviación estándar

.n: tamaño de la muestra.

-  $Lc = Ld \times 10$

**6.5.4 FASE IV:** Para la experimentación con perros, se emplearon 50 adultos sanos (30 hembras y 20 machos) mestizos con pesos entre 8 y 30 kg, los cuales fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos; cada uno de ellos recibió tramadol en una presentación diferente. Los perros del presente estudio fueron los mismos que se utilizaron en las prácticas quirúrgicas de licenciatura en el ciclo escolar 2009-1 y 2 (proporcionados por la FMVZ, UNAM), dichos animales fueron alojados en la Sección de Enseñanza Quirúrgica del Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies de la FMVZ-UNAM. Previamente al estudio, a cada animal se le practicó un examen físico completo en la sala de preparación de las mismas instalaciones.

#### **6.5.4.1 Conformación de los grupos**

. **Grupo 1.** Diez perros a los que se les administró tramadol a dosis de 5 mg/Kg en presentación oral (Tradol<sup>®</sup>, liberación inmediata, cápsulas por 50 mg).

. **Grupo 2.** Diez perros a los que se les administró tramadol a dosis de 5 mg/Kg en presentación oral (Tradol<sup>®</sup> Retard: Larga acción, tabletas por 200 mg).

. **Grupo 3.** Diez perros a los que se les administró tramadol a dosis de 5 mg/Kg en presentación subcutánea experimental con matriz polimérica de carbopol 934-P.

. **Grupo 4.** Diez perros a los que se les administró tramadol a dosis de 5 mg/Kg en presentación subcutánea experimental con matriz polimérica de poloxámero 407.

. **Grupo 5.** Diez perros a los que se les administró tramadol a dosis de 5 mg/Kg en presentación subcutánea experimental con matriz polimérica de quitosan.

Los preparados orales y subcutáneos se administraron antes de los procedimientos anestésicos y quirúrgicos (cuadro 8). Todas las dosis fueron manejadas de acuerdo con el peso de cada animal y administradas según el caso. En cuanto a las cápsulas de Tradol<sup>®</sup> se prepararon en otras nuevas, ajustando el contenido al peso de cada perro. Los preparados subcutáneos se aplicaron en la zona toracolumbar dorsal.

Todos los animales fueron tranquilizados con acepromacina a dosis de 0.1 mg/kg por vía IV y anestesiados con pentobarbital sódico a dosis de 15 mg/Kg IV. Durante el proceso quirúrgico se realizó un seguimiento de cada paciente. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular durante el tiempo en que los animales permanecieron anestesiados (promedio de 4 h). Una vez culminada la práctica quirúrgica los alumnos de licenciatura procedieron a realizar la eutanasia mediante una sobredosis de pentobarbital sódico, todo esto apegado a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999<sup>75</sup>.

Se realizaron diferentes tiempos de muestreo: 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 y 24 horas. El muestreo se tomó de acuerdo al tiempo de dosificación, adaptado a los horarios de las prácticas quirúrgicas de licenciatura. El sangrado se realizó posterior a la dosificación (de acuerdo al tiempo de cada grupo) y se obtuvieron entre 3 y 5 ml de sangre por tiempo de muestreo por perro, muestreando 5 perros por tiempo por grupo, las cuales se colocaron en un vacutainer sin anticoagulante, se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min, posteriormente se separó el suero; cada muestra fue identificada y se conservaron a -20° C, hasta el momento del análisis cromatográfico (Figuras 25 – 30 y Cuadros 16-17).

#### **6.5.4.2 Procesamiento de los resultados**

Se obtuvieron medias y desviaciones estándar de las concentraciones a partir de las áreas bajo la curva obtenidas de la técnica cromatográfica. Posteriormente con ayuda de los programas Microcal Origin<sup>®76</sup> y Excel<sup>®77</sup>, se obtuvieron las gráficas correspondientes a las concentraciones vs. tiempo de tramadol en perros. Los valores farmacocinéticos obtenidos en todos los grupos fueron evaluados por el programa WinNonline<sup>®78</sup>. Los datos obtenidos se sometieron a una prueba de análisis de varianzas ANOVA ( $p < 0.05$ ) y t de Bonferroni.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 FASE I

#### 7.1.1 Matrices poliméricas elegidas

Carbopol 934, poloxámero 407 y chitosan.

### 7.2 FASE II

**7.2.1 Prueba de tramadol en ratas:** Después de la administración subcutánea de Tramadol (Tradol<sup>®</sup> 50 mg/ mL) a dosis de 10 mg/Kg, no se observó ninguna alteración, (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Reacciones en el sitio de aplicación en 3 ratas después de la administración subcutánea de tramadol.

IDENTIFICACIÓN RATA	Rx 0 min	Rx 5 min	Rx 10 min	Rx 15 min	Rx 30 min	Rx 1 h	Rx 24 h	Rx 48 h
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-

. Rx: Reacción

. -: No se observó dolor, ardor, prurito, eritema, exudado o cambios en el pelo y la piel.

**7.2.2 Reacción en el sitio de aplicación:** Con las matrices poliméricas en ratas y perros.

**7.2.2.1 Ratas:** Los resultados que se presentan a continuación fueron idénticos a los obtenidos en las ratas a las cuales se les administró los preparados subcutáneos adicionados con tramadol (1 mg/Kg), (Cuadro 10).

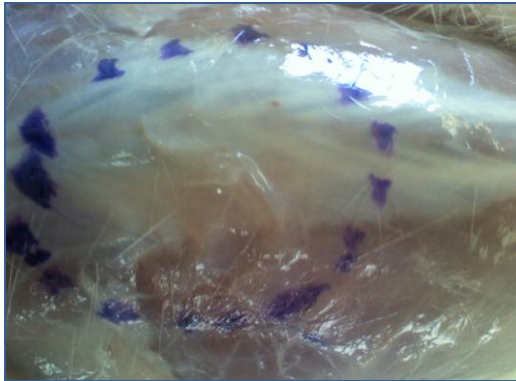
**Cuadro 10.** Resultados de las observaciones en piel después de la administración de las matrices poliméricas en 9 ratas por vía subcutánea.

IDENTIFICACIÓN RATA	Rx 0 min	Rx 5 min	Rx 10 min	Rx 15 min	Rx 30 min	Rx 1 h	Rx 24 h	Rx 48 h	Rx 72 h
carbopol 934-P 0.7 % - pH 5.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
poloxámero 407 10 % - pH 6.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chitosan 0.5 % - pH 5.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-

. Rx: Reacción

. -: No se observó dolor, ardor, prurito, eritema, exudado o cambios en el pelo y la piel.

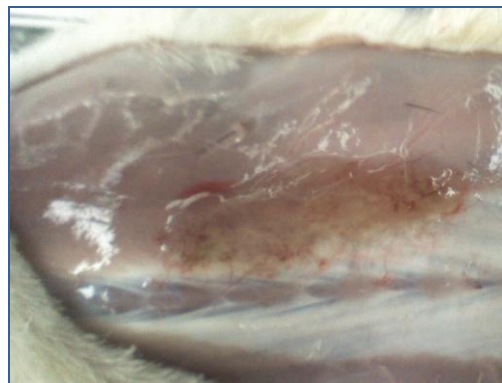
Después de 4 horas de administrado los preparados subcutáneos, a 3 ratas de cada grupo, se le realizó una incisión en la zona de aplicación para observar la presencia o ausencia de la matriz polimérica y las reacciones que estas pudiesen generar; (Figuras 3-5).



**Figura 3.** Se observa la matriz polimérica de carbopol 934-P y la integridad del tejido muscular y subcutáneo, después de la administración subcutánea del preparado con tramadol (1 mg/Kg) en rata.



**Figura 4.** Se observa la matriz polimérica de poloxámero 407 y la integridad del tejido muscular y subcutáneo, después de la administración subcutánea del preparado con tramadol (1 mg/Kg) en rata.



**Figura 5.** Se observa la matriz polimérica de chitosan e irritación del tejido muscular y subcutáneo, después de la administración subcutánea del preparado con tramadol (1 mg/Kg) en rata.

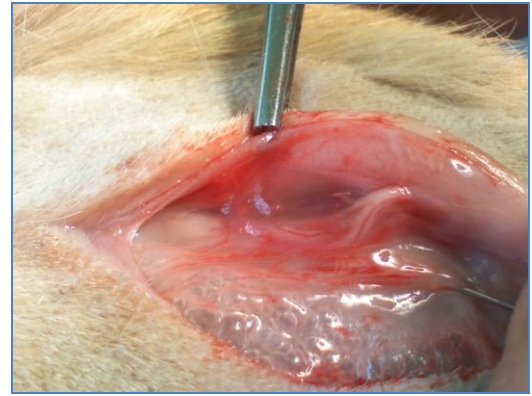
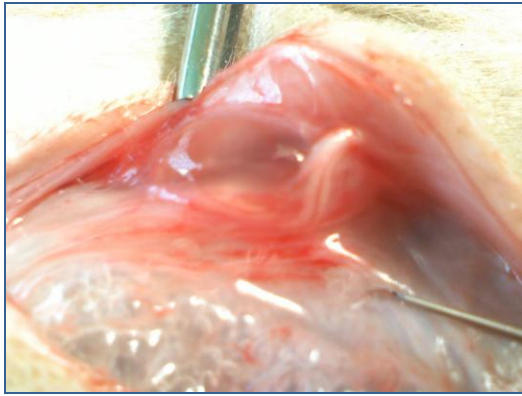
**7.2.2.2 Perros:** Después de la administración de los preparados subcutáneos adicionados con tramadol a 5 mg/Kg en las diferentes matrices poliméricas en perros, se observó ligero dolor a la aplicación e irritación a las 4 horas de la dosificación con el preparado de quitosán. (Cuadro 11 y Figuras 6 – 8).

**Cuadro 11.** Resultados de las observaciones en piel después de la administración de los preparados subcutáneos de tramadol con las matrices poliméricas en perros.

IDENTIFICACIÓN PERRO	Rx 0 min	Rx 5 min	Rx 15 min	Rx 30 min	Rx 1 h	Rx 2 h	Rx 4 h
<b>carbopol 934-P 0.7 % - pH 5.12</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>poloxámero 407 10 % - pH 6.9</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>chitosan 0.5 % - pH 5.0</b>	Dolor ligero a la aplicación	-	-	-	-	-	Ligera Irritación

. Rx: Reacción

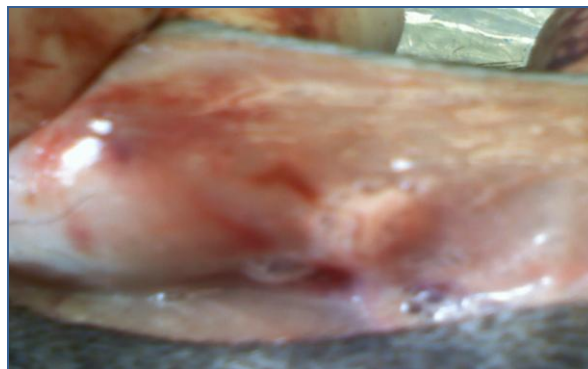
. -: No se observó dolor, ardor, prurito, eritema, exudado o cambios en el pelo y la piel.



**Figura 6.** Se observa la matriz polimérica de carbopol 934-P y la integridad del tejido dérmico y subcutáneo, después de la administración subcutánea del preparado con tramadol (5 mg/Kg) en perro.



**Figura 7.** Se observa la matriz polimérica de poloxámero 407, y la integridad del tejido dérmico y subcutáneo, después de la administración subcutánea del preparado con tramadol (5 mg/Kg) en perro.

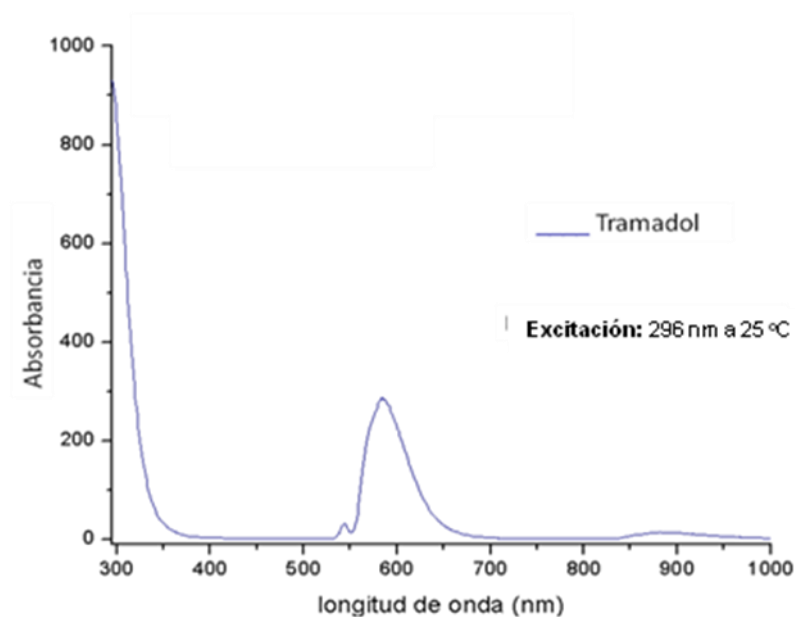


**Figura 8.** Se observa la matriz polimérica de chitosan, y ligera irritación del tejido dérmico, después de la administración subcutánea del preparado con tramadol (5 mg/Kg) en perro.



### 7.3 FASE III

#### 7.3.1 Ultravioleta visible (UV-Vis )



**Figura 9.** Gráfica de  $\lambda$  de máxima absorción del tramadol (296 nm) del tramadol por UV-Vis.

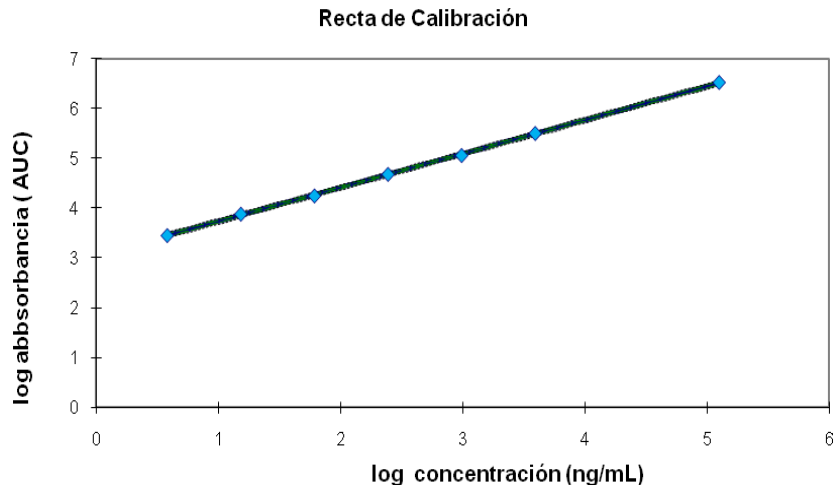
#### 7.3.2 Curva de Calibración

- Ecuación:  $\log y = 1/n \log b + 1/n \log X$

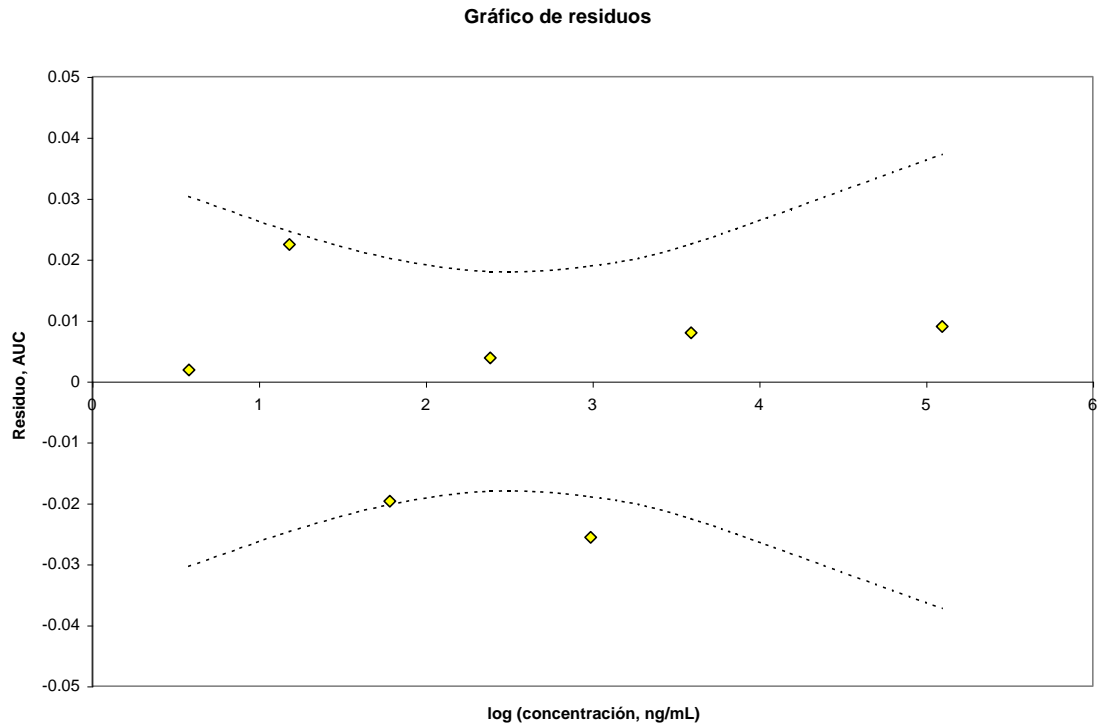
**Cuadro 12.** Datos del logaritmo de la concentración y de la absorbancia.

log concentración (ng/mL)	Absorbancia (AUC)
0.58	3.45
1.18	3.88
1.78	4.24
2.38	4.67
2.98	5.05
3.59	5.49
5.09	6.51

- $n = 7$
- **Ordenada** =  $3.056 \pm 0.037$
- **Pendiente** =  $0.678 \pm 0.013$
- **Coefficiente de relación** =  $0.9998$



**Figura 10.** Gráfica de la curva de calibración.



**Figura 11.** Gráfica de residuos de la curva de calibración, donde se observan que los datos son aleatorios y no presentan alguna tendencia.

### 7.3.3 Límite de Detección (Ld) y Cuantificación (Lc)

**Cuadro 13.** Diluciones de la solución “stock” para determinar la concentración mínima de tramadol en el sistema cromatográfico (HPLC).

NOMBRE	CONCENTRACIÓN (ng/mL)	RESPUESTA (AUC)
C1	250000	4001894
C2	125000	3305551
C3	62500	2360850
C4	15625	871978
C5	3905	314922
C6	976.25	113939
C7	244.062	47659
C8	61.015	17647
C9	15.253	7600
C10	<b>3.813</b>	<b>2833</b>
C11	0.953	0

**C10:** Presencia de ruido

**Cuadro 14.** Valores estadísticos del Ld y Lc.

n	$\alpha$	Media X	Media Y	$\sigma$ AUC	$\sum_x$	$\sum_y$	Fr	sConc	Ld ng/mL	Ld ng/mL
7	1.943	15.25	13404	8413	106.8	93830	878.8	9.6	7	70

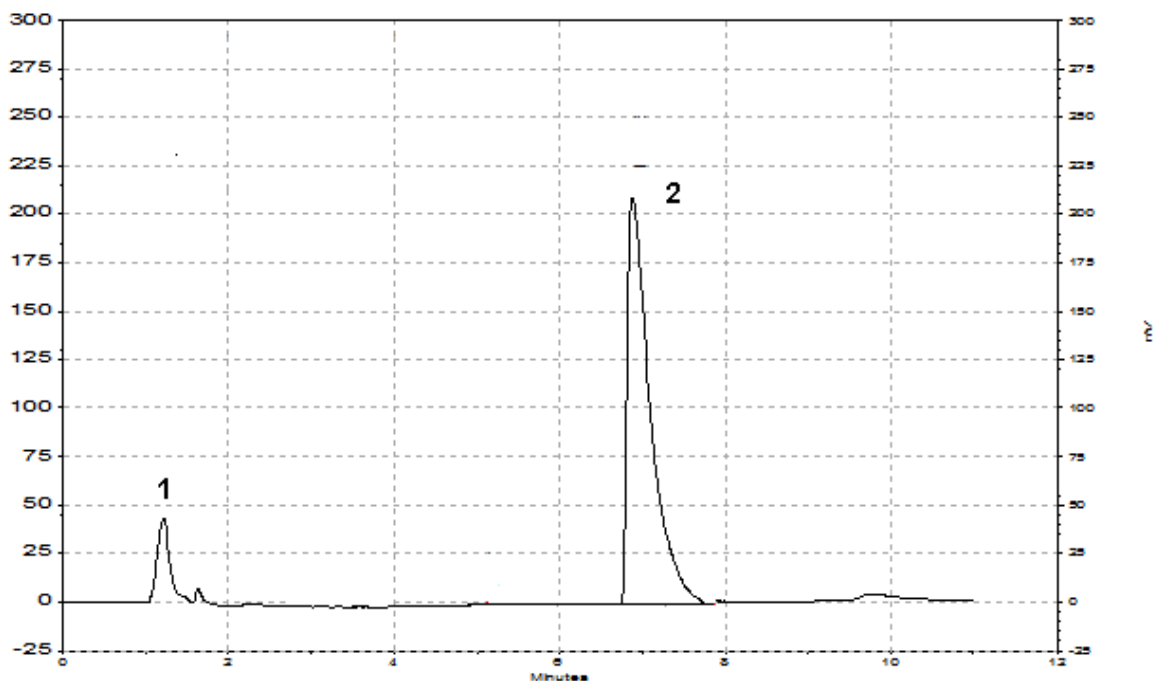
**Cuadro 15.** Respuesta de las 7 inyecciones de C9 en el HPLC

C9 15.253 ng/mL	AUC
1	7600
2	31878
3	14573
4	10285
5	10110
6	9981
7	9403

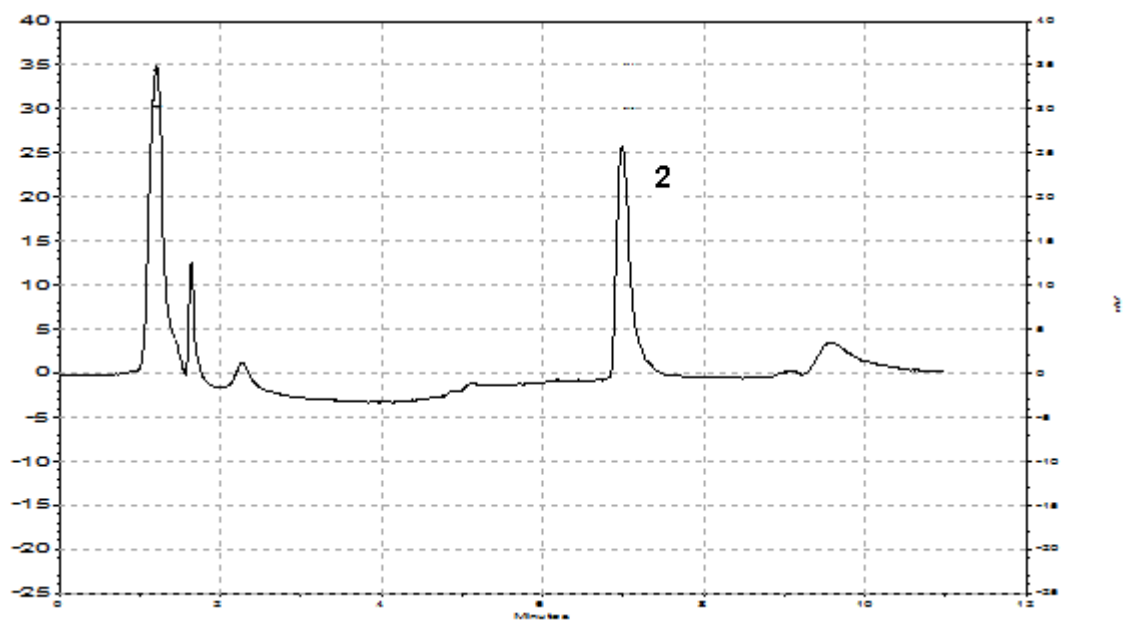
- . **n:** Tamaño de la muestra
- .  **$\alpha$ :** Grados de libertad
- .  **$\sigma$ :** Desviación estándar de absorbancia
- .  $\sum_x$ : Sumatoria de X
- .  $\sum_y$ : Sumatoria de Y
- . **Fr:** Factor de respuesta
- . **sConc:** Desviación estándar de la concentración
- . **Ld:** Límite de detección
- . **LC:** Límite de cuantificación

### 7.3.4 Cromatogramas

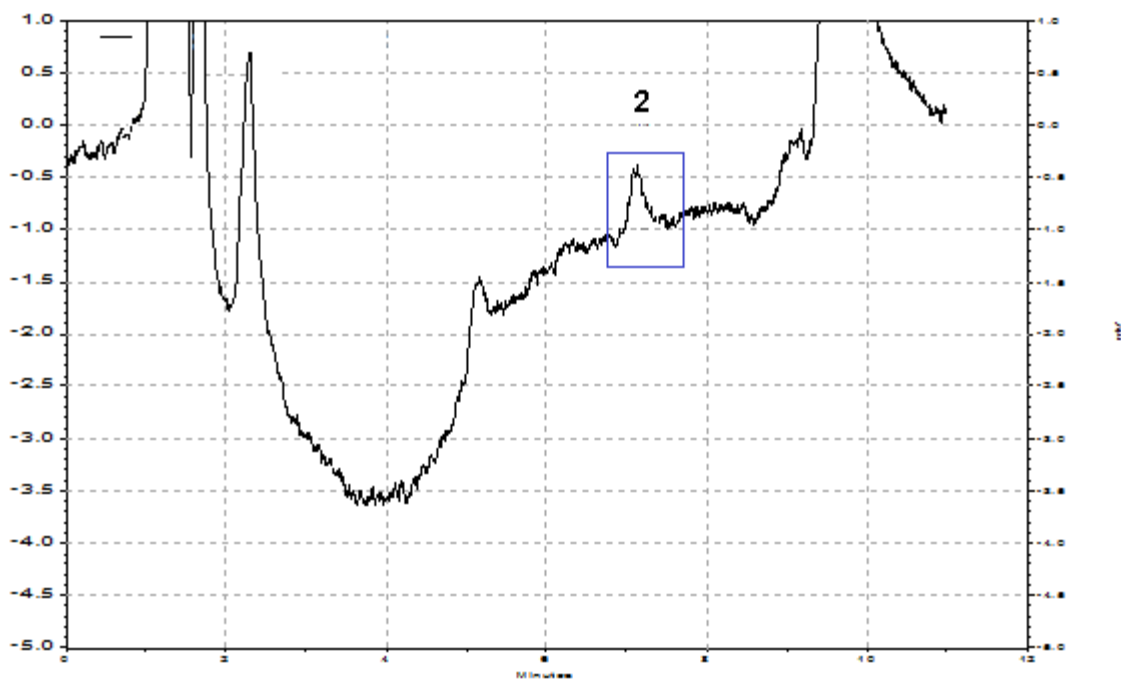
Las figuras 12 - 24 mantuvieron las siguientes condiciones cromatográficas: Columna C<sub>18</sub> de 4.6 X 150 mm X 5 μm de diámetro de poro. Fases móviles (A): Solución amortiguadora de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01 M pH 5.99, (B) MeCN con 0.1% Et<sub>3</sub>N ; gradiente de elución (A) 90% 0-3 min, (A) 75% 3-12min, (A) 90% 12-15 min; con un flujo de 1 mL/min, Longitud de onda: 296 y 320 nm.



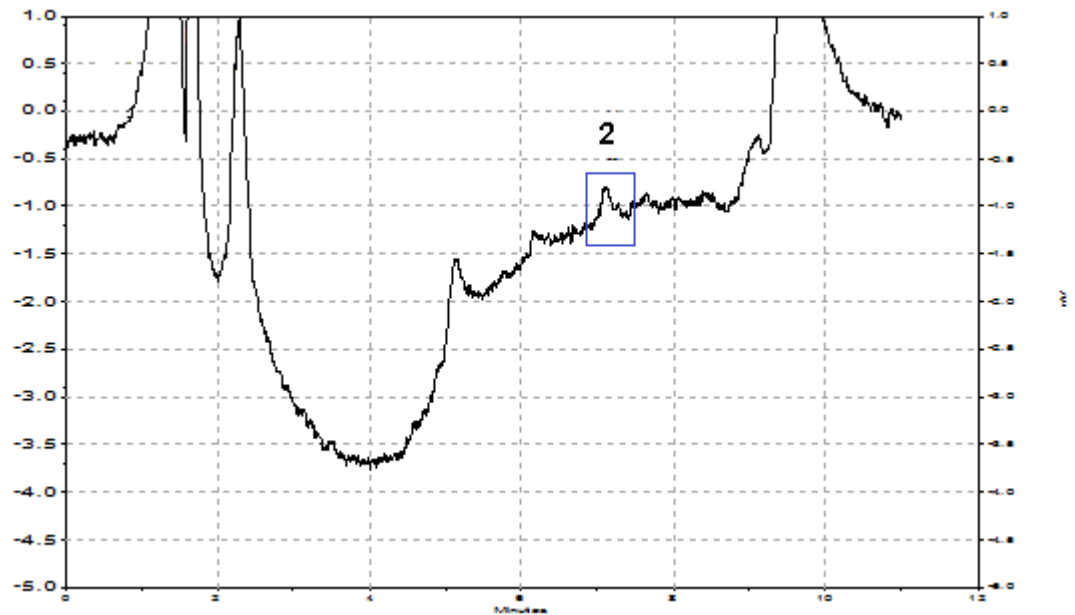
**Figura 12.** Cromatograma del estándar de tramadol, disolución C1 (0.25 mg/mL). Se observa el pico de metanol (1) y de tramadol (2) con un tiempo de retención de 6.88 min.



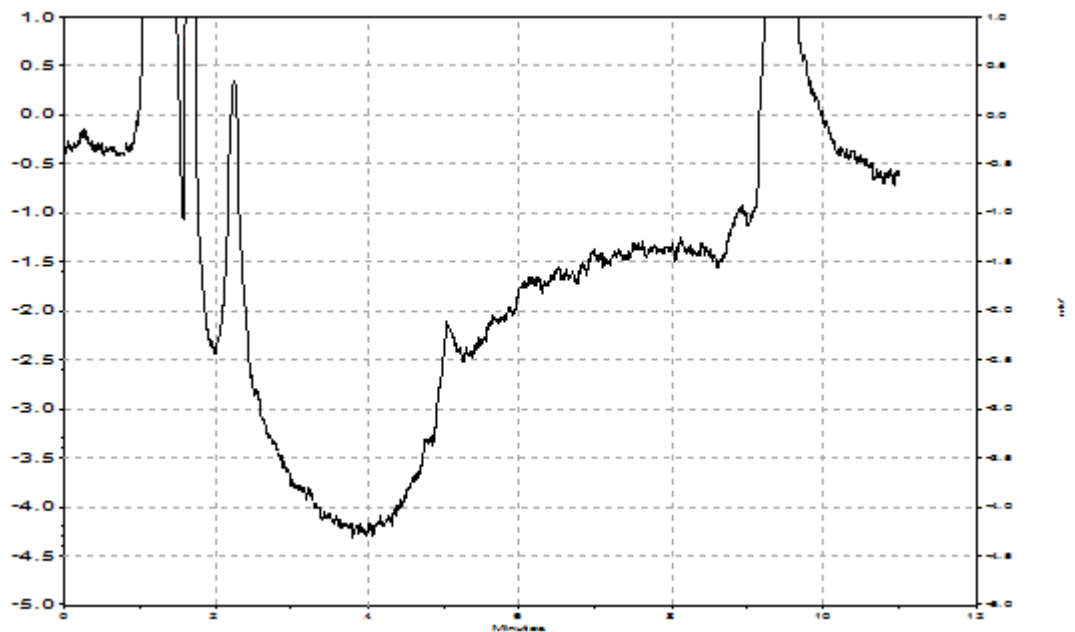
**Figura 13.** Cromatograma del estándar de tramadol (2), disolución C5 (3905 ng/mL).



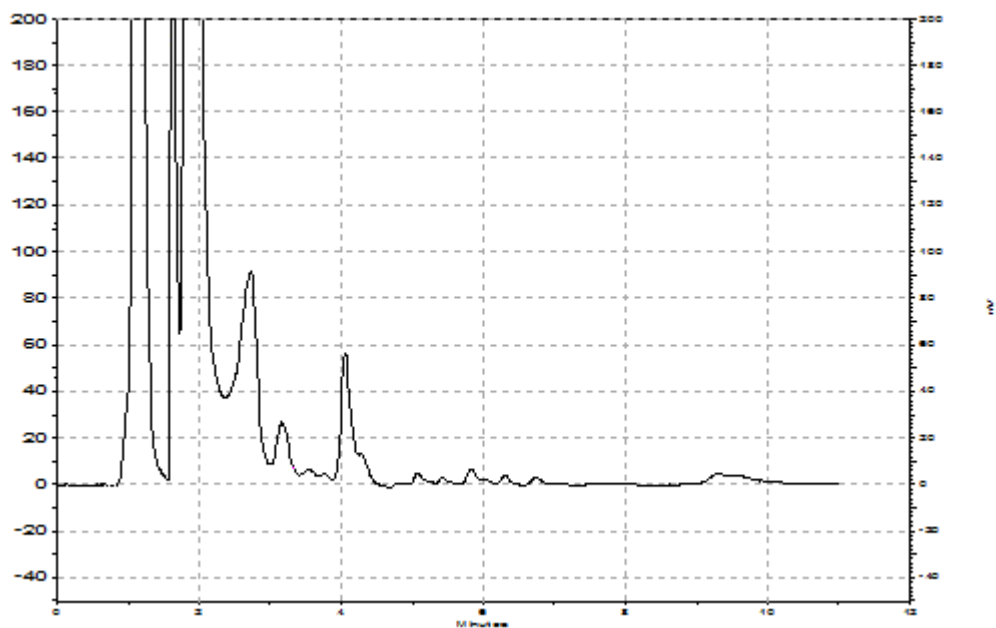
**Figura 14.** Cromatograma del estándar de tramadol (2), disolución C9 (15.253 ng/mL).



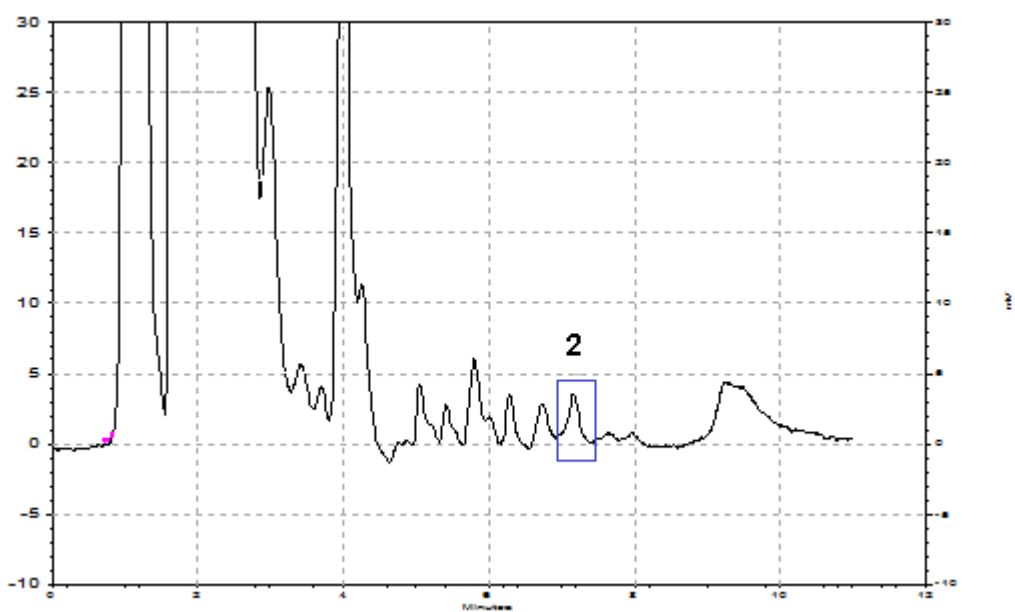
**Figura 15.** Cromatograma del estándar de tramadol (2), disolución C10 (15.253 ng/mL). Se observa, la presencia de una señal en el tiempo de retención del tramadol que por su baja respuesta se confunde con el ruido del sistema cromatográfico.



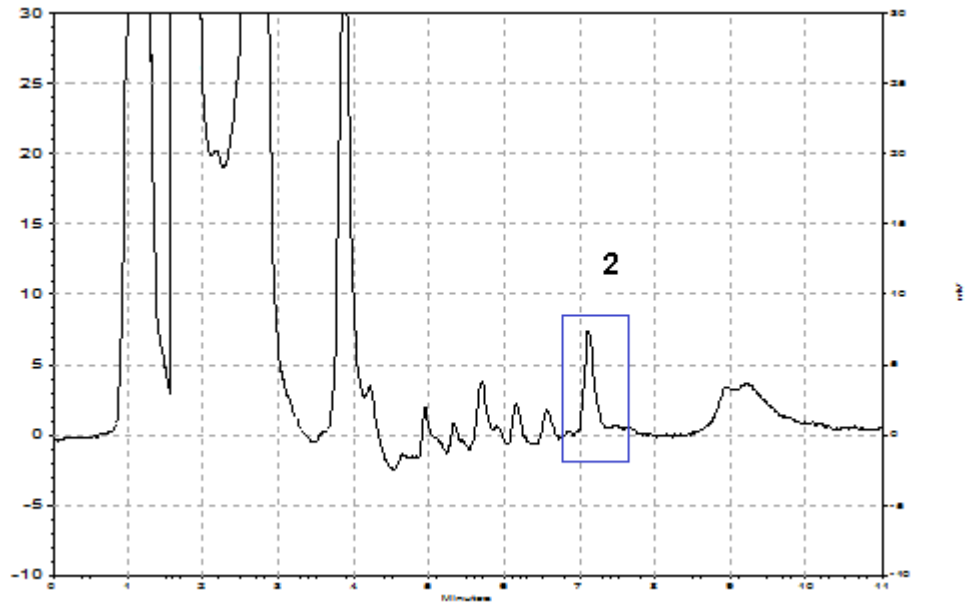
**Figura 16.** Cromatograma del estándar de tramadol, disolución C11 (de 0.953 ng/mL). Se observa la presencia de ruido del sistema y la ausencia de tramadol.



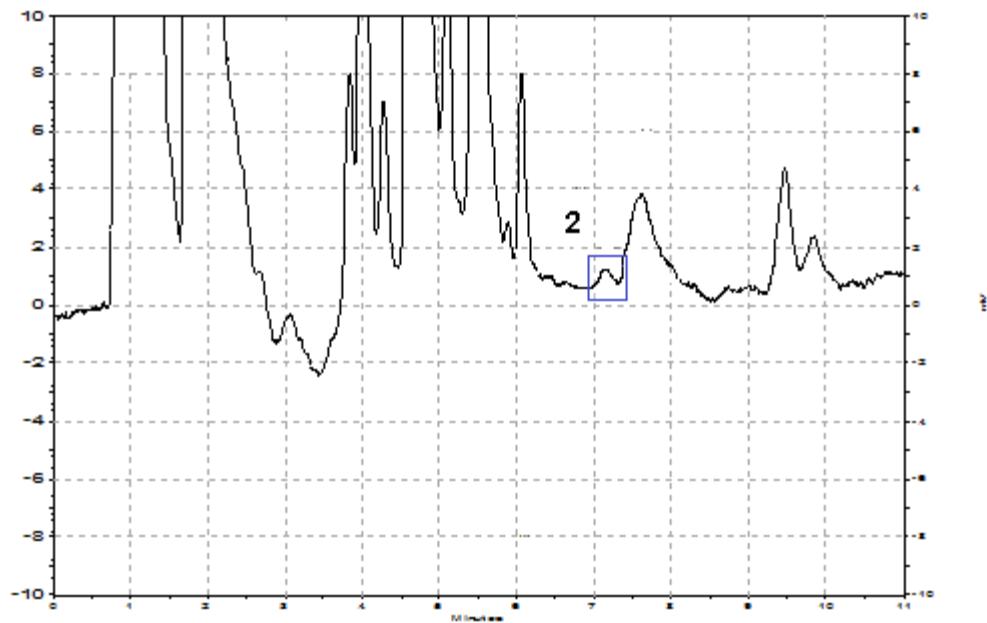
**Figura 17.** Cromatograma de un suero sin tramadol.



**Figura 18.** Cromatograma de un suero fortificado con 50  $\mu$ L de estándar de tramadol (2), (3905 ng/mL).

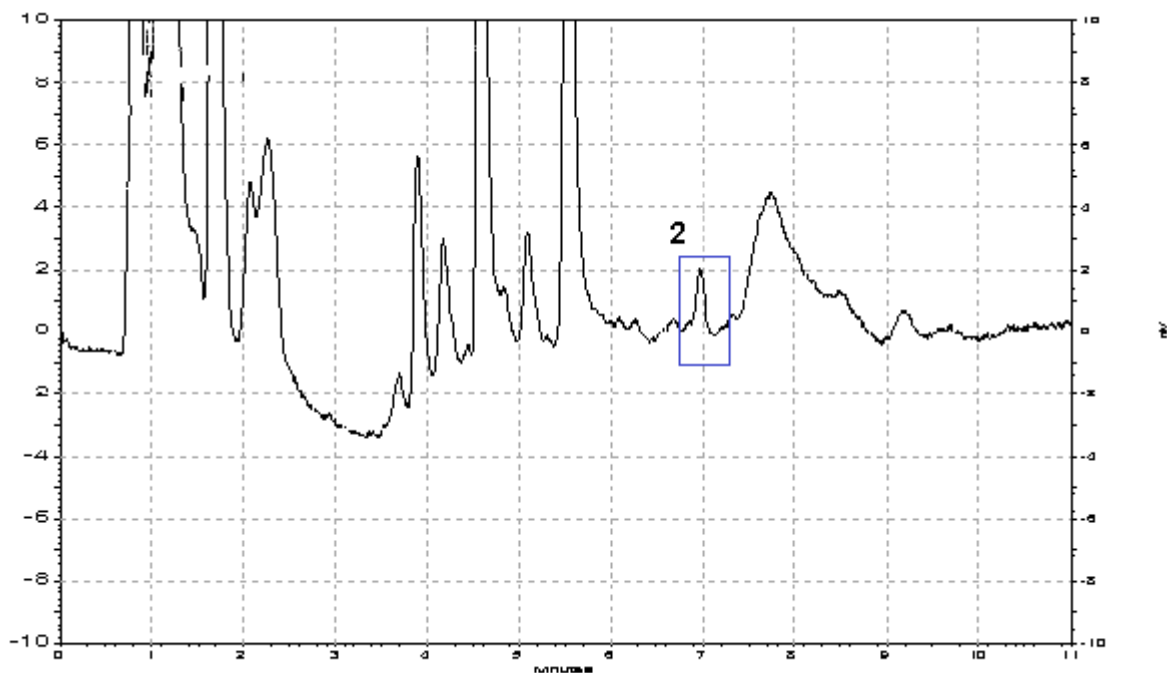


**Figura 19.** Cromatograma de un suero fortificado de perro con 195 ng/mL de tramadol estándar (2).

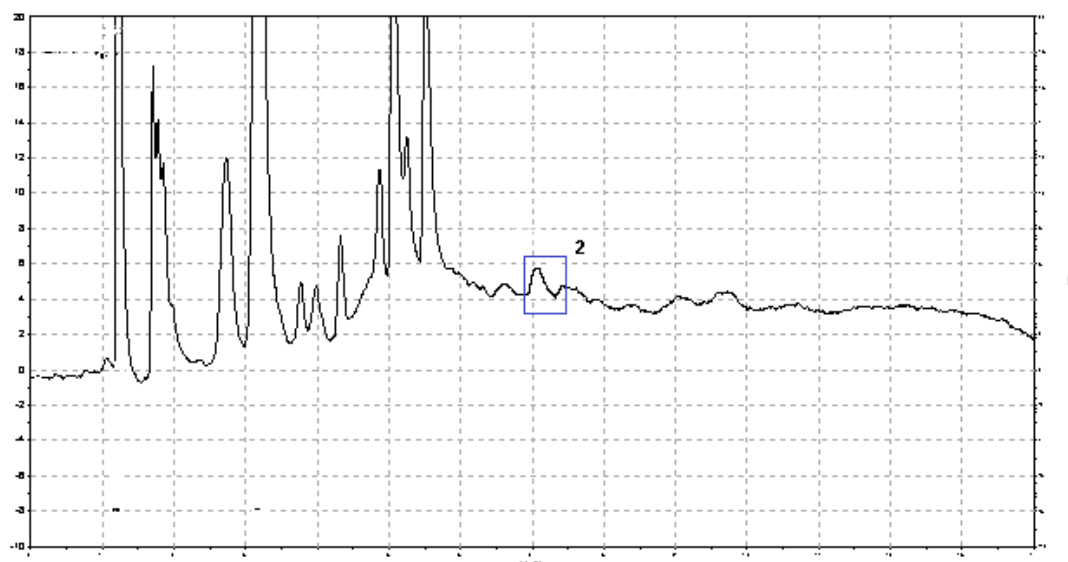


**Figura 20.** Cromatograma de un suero de perro al que se le administró por vía oral 5 mg/Kg de tramadol de liberación inmediata a las 4h.

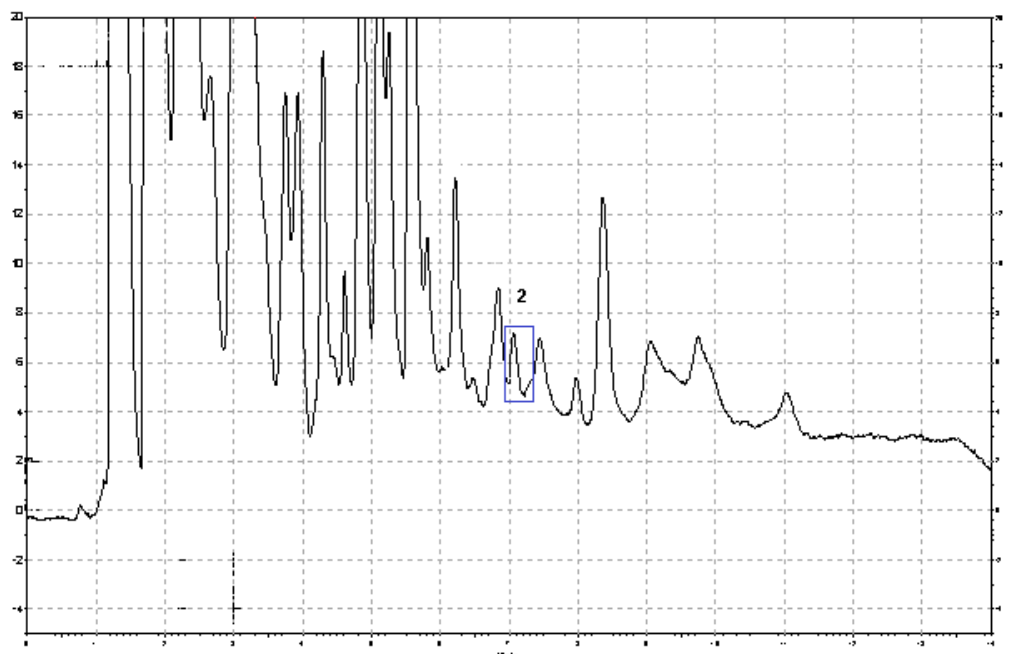




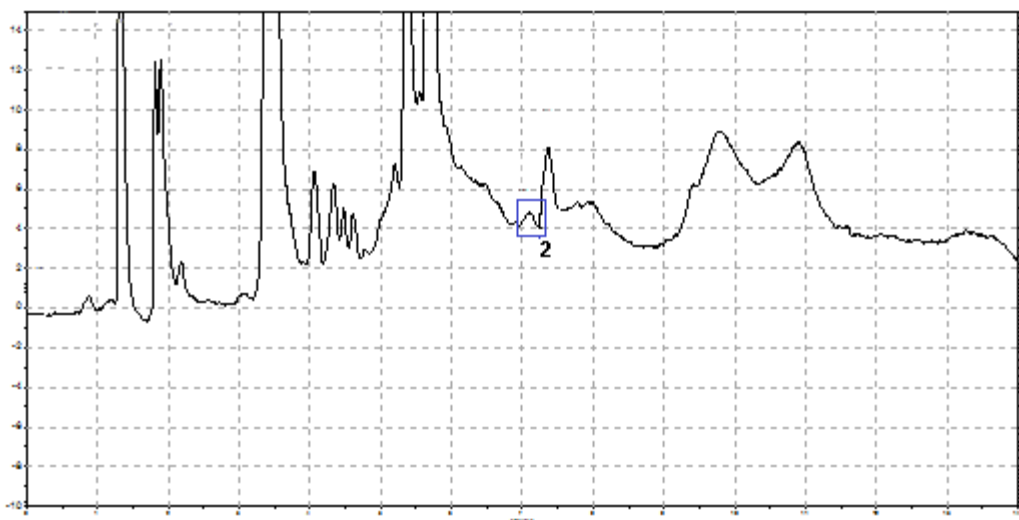
**Figura 21.** Cromatograma de un suero de perro al que se le administró por vía oral 5 mg/Kg de tramadol de liberación retardada (LA) a las 4h.



**Figura 22.** Cromatograma de un suero de perro al que se le administró por vía subcutánea 5 mg/Kg de tramadol en una matriz polimérica de carbopol al 0.7%, a las 8h.



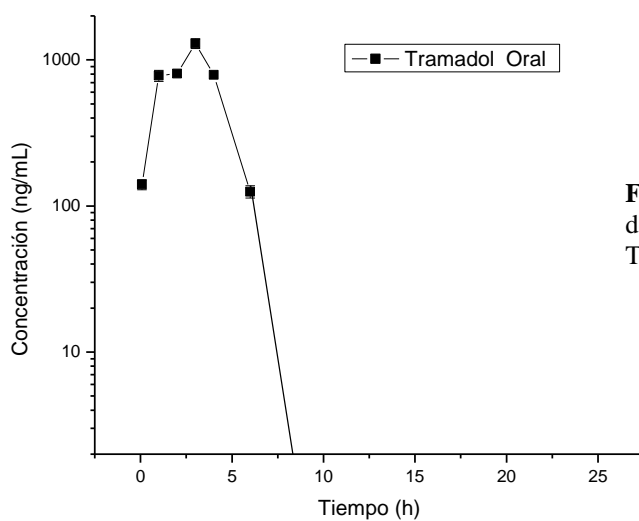
**Figura 23.** Cromatograma de un suero de perro al que se le administró por vía subcutánea 5 mg/Kg de tramadol en una matriz polimérica de poloxámero al 10% a las 24h.



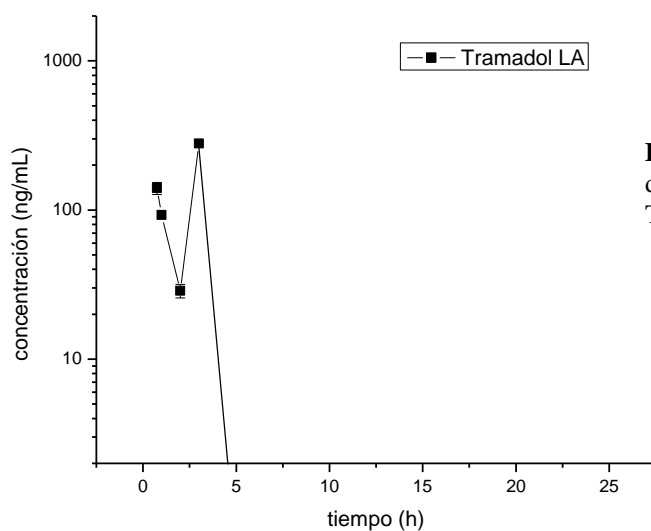
**Figura 24.** Cromatograma de un suero de perro al que se le administró por vía subcutánea 5 mg/Kg de tramadol en una matriz polimérica de chitosan al 0.5% a las 8h.

## 7.4 FASE IV

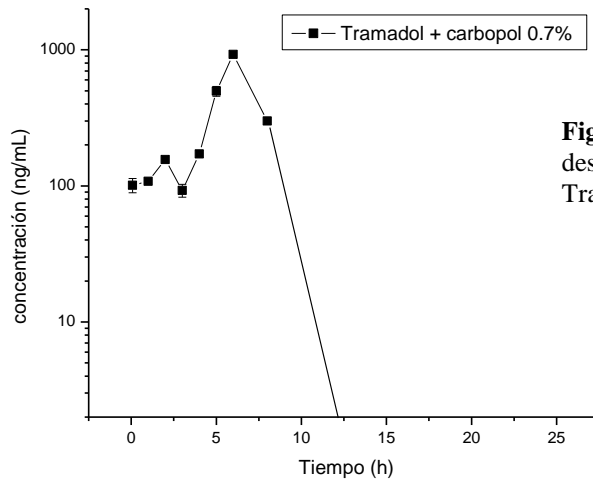
**7.4.1 Resultados farmacocinéticos:** En perros después de la administración de los preparados orales y subcutáneos de tramadol. (Figura 25 – 30 y Cuadros 16 - 17).



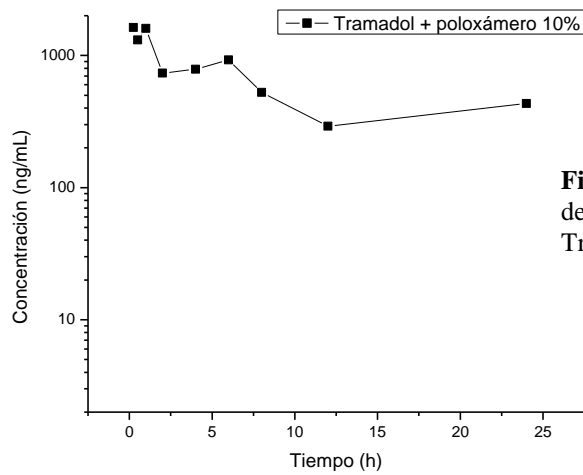
**Figura 25.** Farmacocinetica en perros después de la administración a 5 mg/Kg de Tradol® oral de liberación inmediata.



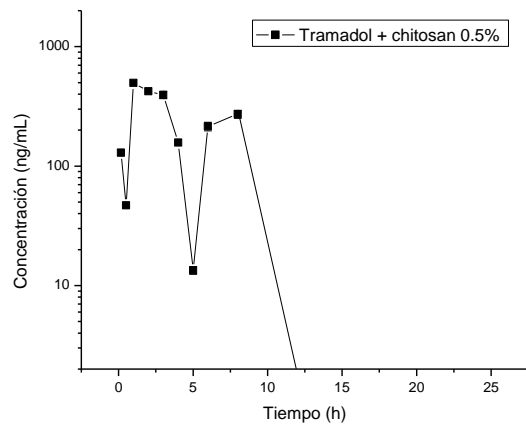
**Figura 26.** Farmacocinetica en perros después de la administración a 5 mg/Kg de Tradol® Retard (LA).



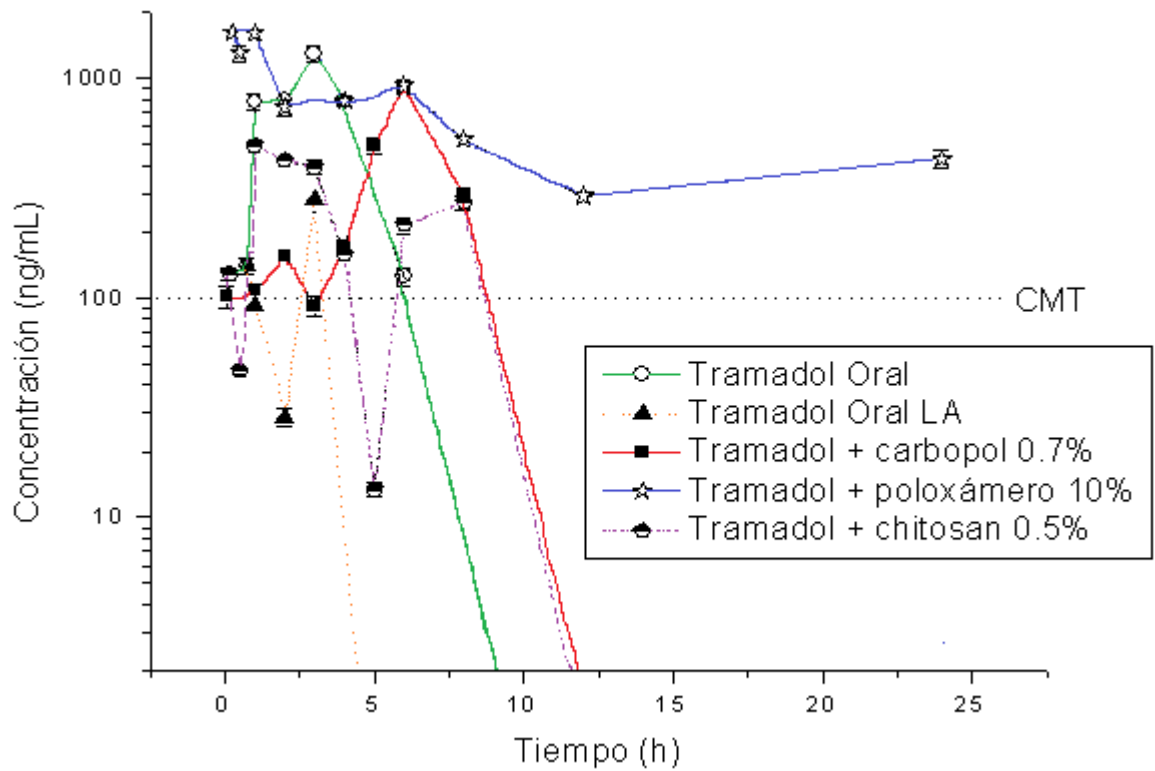
**Figura 27.** Farmacocinetica en perros después de la administración a 5 mg/Kg de Tramadol + carbopol al 0.7%.



**Figura 28.** Farmacocinetica en perros después de la administración a 5 mg/Kg de Tramadol + poloxámero al 10%.



**Figura 29.** Farmacocinetica en perros después de la administración a 5 mg/Kg de Tramadol + chitosan al 0.5%.



**Figura 30.** Farmacocinetica en perros después de la administración a 5 mg/Kg de tramadol en diferentes preparados farmacéuticos. Por vía oral, o: Tradol<sup>®</sup> liberación inmediata y ▲: Tradol<sup>®</sup> retard (Larga acción). Por vía subcutánea, ■: carbopol 934P al 0.7%, ☆: poloxámero 407 al 10% y ▲ chitosan al 0.5%.

**Cuadro 16.** Concentraciones séricas de tramadol en perros a dosis de 5 mg/Kg. Grupos comparativos TRADOL<sup>®</sup> y TRADOL<sup>®</sup> Retard (LA) por vía oral y los experimentales en polímeros de carbopol, poloxamero y chitosan por vía subcutánea.

Tiempo Horas (h)	TRADOL <sup>®</sup> , PO		TRADOL <sup>®</sup> LA, PO		TRAMADOL CARBOPOL, SC		TRAMADOL POLOXÁMERO SC		TRAMADOL CHITOSAN SC	
	Prom (ng/mL)	± DE	Prom (ng/mL)	± DE	Prom (ng/mL)	± DE	Prom (ng/mL)	± DE	Prom (ng/mL)	± DE
0.08	-	-	-	-	101.15	12	-	-	-	-
0.16	-	-	-	-	-	-	-	-	129.71	8
0.25	-	-	-	-	-	-	1629.29	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-	-	1309.18	111	46.88	2
0.75	140.28	11	140.28	13	-	-	-	-	-	-
1	779.83	68	92.46	-	107.89	-	1603.24	-	497.73	-
2	805.37	-	28.77	3	155.95	-	734.51	66	423.64	-
3	1294.19	100	278.61	-	92.46	10	-	-	394.45	28
4	788.86	-	nd	nd	171.79	-	787.04	42	157.39	-
5	-	-	-	-	496.59	41	-	-	13.42	1
6	125.30	12	nd	nd	924.69	-	924.69	-	214.78	18
8	nd	nd	nd	nd	299.22	-	526.34	-	272.27	21
12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	291.07	-	nd	nd
24	nd	nd	nd	nd	nd	nd	433.51	40	nd	nd

.-: no evaluado .nd: no detectado

**Cuadro 17.** Farmacocinética de las concentraciones séricas de tramadol en perros a dosis de 5 mg/Kg. Grupos comparativos TRADOL<sup>®</sup> y TRADOL<sup>®</sup> Retard (LA) por vía oral y los experimentales en polímeros de carbopol, poloxamero y chitosan por vía subcutánea.

VARIABLE	TRADOL <sup>®</sup> PO		TRADOL <sup>®</sup> LA PO		TRAMADOL carbopol SC		TRAMADOL poloxámero SC		TRAMADOL chitosan SC	
	Prom	± DE	Prom	± DE	Prom	± DE	Prom	± DE	Prom	± DE
Cmax <sub>1</sub> (ng/mL)	1294.2 <sup>a</sup>	22.3	140.3 <sub>b</sub>	21.3	155.9 <sup>b</sup>	13.5	1629.3 <sup>c</sup>	98.3	497.7 <sup>d</sup>	12.1
Cmax <sub>2</sub> (ng/mL)	-	-	278.6 <sub>a</sub>	32.1	924.7 <sup>b</sup>	-	924.7 <sup>b</sup>	25.1	-	-
Tmax <sub>1</sub> (horas)	3 <sup>a</sup>	0	0.75 <sup>b</sup>	0	2 <sup>c</sup>	0	0.25 <sup>d</sup>	-	1 <sup>e</sup>	0
Tmax <sub>2</sub> (horas)	-	-	3 <sup>a</sup>	0	6 <sup>b</sup>	0	6 <sup>b</sup>	-	-	-
AUC	4223.6 <sup>a</sup>	153.2	321.9 <sub>b</sub>	83.2	2752.8 <sup>c</sup>	152.3	8583.4 <sup>d</sup>	215.6	1510.8 <sup>e</sup>	132.5
t <sub>1/2</sub> β (h)	0.63 <sup>a</sup>	0.08	0.29 <sup>b</sup>	0.04	0.59 <sup>a</sup>	0.02	1.94 <sup>c</sup>	0.09	0.64 <sup>a</sup>	0.03
β	1.09 <sup>a</sup>	0.02	2.33 <sup>b</sup>	0.10	1.163 <sup>c</sup>	0.09	0.35 <sup>d</sup>	0.04	1.06 <sup>a</sup>	0.04

.Prom: Promedio . ±DE: Desviación estándar

Diferentes literales significan diferencias estadísticas entre variables farmacocinéticas (p < 0.05).

## VIII. DISCUSIÓN

Uno de los puntos críticos en los estudios de farmacocinética y de diseño farmacéutico es la confiabilidad de la técnica analítica empleada. En este sentido se puede hacer énfasis en que se logró implementar un método de extracción y un análisis cromatográfico, que permitieron determinar un límite de cuantificación de 70 ng/mL y un límite de detección de 7 ng/mL, con un error entre ensayo < 2.5%. Los análisis reportados en la literatura de Nobilis *et al* y Gan *et al* se utilizaron como guías iniciales, se modificaron los volúmenes y los pesos, así como las proporciones de las fases móviles para lograr los valores ya mencionados. La fortificación en sueros permitió una regresión con una elevada confiabilidad ( $R= 0.9998$ ). Por lo anterior no es aventurado asegurar que las concentraciones de tramadol determinadas son altamente confiables. Más aún, el intervalo de valores que se obtuvo en la determinación cuantitativa de tramadol, es muy similar a estudios previos reportados por Kukanich y Papich 2004.

Por otro lado, en estudios farmacocinéticos formales no es extraordinario utilizar un número de perros como el utilizado en este trabajo. Sin embargo, como punto adicional en la originalidad del diseño, se utilizó el denominado *naive pool sampling*<sup>79</sup>, básicamente maximiza el empleo de muestras sanguíneas en perros que están destinados a otro procedimiento.

Los resultados obtenidos para los preparados de liberación inmediata y de larga acción (LA) destinados a humanos ofrece concentraciones paradójicas, esto es que, el LA da concentraciones que se eliminan más rápido que el de liberación inmediata (0.29 h y 0.63 h, respectivamente). Esto puede explicarse en función de que el pH en el estómago de los perros y su actividad enzimática, así como la temperatura basal son esencialmente distintas a las del hombre (Hombre: pH de 1-3<sup>80</sup> en ayuno y 37°C<sup>81</sup>, perro: pH de 0.9-2.5<sup>82</sup> en ayuno y 37.8-39.3 °C<sup>83</sup>). A menudo estas pequeñas diferencias son suficientes para modificar el

comportamiento de las matrices poliméricas en las que se incluyen los productos de larga acción<sup>72</sup>. No obstante, ninguno de los dos preparados puede considerarse como adecuado para su utilización en perros, dado que el efecto analgésico es extremadamente corto (menos de 6h para el Tradol<sup>®</sup> y menos de 4h para el Tradol<sup>®</sup> LA) y se logran concentraciones demasiado altas en el de liberación inmediata ( $C_{max}$  1294 ng/mL) que están relacionadas en la literatura con efectos adversos como náusea, salivación, aumento de la deglución, vómito y sedación moderada<sup>13</sup>.

Con respecto a los preparados experimentales utilizados en este ensayo, destaca que ni el carbopol ni el chitosan brindaron una verdadera larga acción, únicamente lograron superar el tiempo de estancia en el organismo a los preparados sin vehículo, logrando un intervalo de estancia de 8 a 12 h; por lo que es discutible que se haya generado una *farmacocinética flip-flop* (Error en la asignación de constantes de velocidad a los procesos, normalmente el proceso más lento es el de eliminación, por lo que se acostumbra asignar la constante de menor valor absoluto a este proceso. El efecto *flip-flop* se aprecia cuando el proceso más lento es el de incorporación del fármaco<sup>84</sup>). En contraste, las concentraciones séricas de tramadol en el preparado a base de poloxámero generan concentraciones de la ventana terapéutica propuesta (100 – 800 ng/mL)<sup>13</sup>, por más de 24 horas, dando lugar a una verdadera farmacocinética de larga acción con una media de eliminación evidentemente mayor ( $t\beta_{1/2} = 1.94$  h).

No se detectaron reacciones adversas en el sitio de inyección con el preparado a base del poloxámero, ni de otra índole que sugirieran que lo obtenido solo tiene un valor teórico. Se sabe que el poloxámero 407 puede estar incluido en formulaciones parenterales hasta en un 20-30 % (subcutáneo en ratas)<sup>85</sup>. Considerando estos rasgos del vehículo queda por corroborar en una muestra de gran tamaño que en efecto no existe toxicidad (ni local, ni sistémica) a la aplicación única ni a las múltiples de un preparado como el descrito.



Adicionalmente, si se tiene la intención de hacer un seguimiento de los hallazgos obtenidos, se deberá estabilizar químicamente la fórmula y producir en condiciones de esterilidad para inyectables. Más aún, sería interesante determinar si la adición de algunos alcoholes puede dar al preparado una mejor inyectabilidad dado que hay evidencias que indican que la reología del poloxámero se puede modificar, haciéndose más fluida porque pierde poder de gelificación; así como cambiar sustancialmente su tasa de liberación del principio activo<sup>86</sup>.

En la clínica de pequeñas especies el manejo del dolor es esencial, para lo cual se encuentran comercialmente disponibles una gran variedad de preparados analgésicos, sin embargo la mayoría de ellos producen efectos secundarios indeseables que no solo ponen en riesgo la salud del animal, sino que incluso, llegan a ocasionarle la muerte. Los AINEs, son los más utilizados ya sean los COX1 o COX2 en los cuales se ha encontrado en mayor o menor grado cuadros clínicos de gastritis irritativa, úlceras gástricas, discrasias sanguíneas como hipoproteïnemia, anemia que puede ser no regenerativa, metahemoglobinemia (intoxicación con paracetamol en gatos), deficiencia en la agregación plaquetaria (intoxicación con aspirina en perros) e insuficiencias renales agudas que pueden convertirse en crónicas (ver anexo1). Uno de los analgésicos que destacan por su virtual o nula capacidad para producir irritación gástrica, discrasias sanguíneas e insuficiencia renal y por proveer un notable efecto analgésico basado en acciones centrales no perteneciente al grupo de los AINE's ya que se encuentra relacionado con receptores morfomiméticos, es el tramadol<sup>11-13</sup>. El tramadol es administrado como una mezcla racémica de dos enantiómeros<sup>9-25</sup>, la presencia de los enantiómeros (+) y (-) son necesarios para que se dé el efecto analgésico<sup>18</sup>.

Kukanich y Papich (2004) administraron tramadol a dosis de 11.2 mg/Kg vía oral en perros, encontrando que el tramadol permanece más tiempo en sangre que su metabolito M1, además de que el último alcanza una  $C_{max}$  menor que el tramadol y se elimina más rápido. No obstante, en ambos casos la eliminación es

rápida y aproximadamente para las 6 horas las concentraciones están por debajo de los 100 ng/mL (0.1 µg/mL), las cuales se ha encontrado que no generan una buena analgesia<sup>13</sup>. En contraste, las concentraciones iniciales llegan a valores de  $C_{max}$  cercanos a 800 ng/mL (0.8 µg/mL) que, de acuerdo con las referencias clínicas causan náusea transitoria y otros efectos colaterales asociados a la ocupación de receptores morfinomiméticos<sup>13,19,51</sup>.

## **IX. CONCLUSIONES**

A nivel mundial no existen preparados de tramadol para su uso en el área veterinaria, los clínicos de pequeñas especies utilizan preparados de línea humana reportando muy buen efecto analgésico. En línea humana existen preparados orales e intravenosos.

El preparado de tramadol en las 3 matrices poliméricas empleadas en este trabajo de investigación (carbopol 934-P al 0.7%, chitosan al 0.5% y poloxámero 407 al 10%) proporcionaron una farmacocinética de liberación modificada en las cuales se lograron concentraciones por arriba de las mínimas para obtener un efecto analgésico durante 12 h para el carbopol y chitosan, y de 24 horas para el poloxámero, sin llegar a niveles que induzcan efectos adversos en una sola administración, a dosis de 5mg/Kg. Estos resultados ofrecen una nueva alternativa en el control del dolor en pequeñas especies.

Al comparar las farmacocinéticas obtenidas con los preparados diseñados para la administración subcutánea, se obtuvieron biodisponibilidades relativas superiores a las logradas en perros con los preparados comerciales para línea humana y superiores a las reportadas por Kukanich y Papich (2004) para preparados de línea humana en perros por vía oral.

Los valores farmacocinéticos obtenidos proporcionan las bases para continuar la línea de investigación en diseños de liberación modificada con tramadol, y con modificaciones de matrices poliméricas para lograr preparados que proporcionen hasta 24 horas de efecto analgésico con un mínimo de efectos adversos.

En la continuidad experimental de este trabajo se propone mejorar la eficiencia en el proceso de Extracción en Fase Sólida (EFS) con la finalidad de obtener porcentajes de recuperación altos, así como obtener una mejor resolución cromatográfica en las muestras séricas en la determinación de tramadol.

Se propone realizar evaluaciones clínicas a nivel hospitalario y en clínicas particulares para valorar la respuesta analgésica del preparado de tramadol con vehículos de liberación modificada.

Aparentemente, el paso consecuente con lo realizado en este ensayo es dar a la formulación propuesta hecha a nivel de laboratorio un proceso farmoquímico escalado y verificar la estabilidad de lo obtenido. Logrando esto, será imprescindible realizar estudios multicéntricos que permitan correlacionar las concentraciones séricas con el efecto analgésico, en un estudio de farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD) y de toxicidad para poder contar con un analgésico de aparentemente gran eficacia clínica y diseñado ex profeso para perros.

## **X. REFERENCIAS**

- 1.** IASP, International Association for the Study of Pain. Pain Terms: a list with definitions and notes on usage, Pain 6, 1979; 249-252.
- 2.** Hellyer P, Rodan LI, Brunt J, Downing R, Hagedorn J, Robertson S. AAHA/AAFP Pain Management Guidelines for Dogs & Cats. Journal of the American Animal Hospital Association. September/October 2007; 43: 235-248.
- 3.** Traquilli W, Thurman J, Grimm K. Veterinary anesthesia and analgesia. U.S.A, Blackwell Publishing, fourth edition, 2007; 3:31-57; 10: 241 – 270.
- 4.** Allen C, Bekoff M. Animal minds, cognitive ethology, and ethics. The journal of ethics. September 2007; 11 (3): 299–317.
- 5.** Hanssen B., Assessment of Pain in Dogs: Veterinary Clinical Studies. ILAR Journal, 2003; 44 (3) 197-205.
- 6.** Short C. Fundamentals of pain perception in animals. Applied Animal Behaviour Science. August 1998; 59 (1-3): 125-133.
- 7.** Anil S, Anil L, Deen J. Challenges of pain assessment in domestic animals. Journal of American Veterinary Medical Association, February 2002; 220 (3), 313-319.
- 8.** Sumano H, Ocampo L. Farmacología Veterinaria. McGraw-Hill, México, tercera edición, 2006; 44:771-797.
- 9.** Ganong W. Fisiología Médica. Manual Moderno S.a. de C.V., 20<sup>a</sup> edición, 2006; 7: 129-138.
- 10.** Plumb D, Pharm C. Veterinary Drug Handbook. 4<sup>th</sup> edition, Pharma Vet Publishing. Minesota, USA. 2002.
- 11.** Tranquilli W, Grimm K, Lamont L. Tratamiento del dolor en pequeños animales. Multimédica, Barcelona (España), 2001. Pág. 14-24.
- 12.** Mathews K. Nonsteroidal anti-inflammatory analgesics in pain management in dogs and cats. Canadian Veterinary Journal, September 1996; 37: 539 545.
- 13.** Kukanich B, Papich M, Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyltramadol in dogs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 2004; 27: 239-246.

- 14.** Likar R, Wittels M, Molnar M, Kager I, Ziervogel G, Sittl R. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Tramadol IR and SR in Elderly Patients: A Prospective, Age-Group-Controlled Study Clinical. *Therapeutics* 2006; 28 (12): 2022-2039.
- 15.** Palop Manjón-Cabeza E, Santamarina Carvajal F, Gálvez Mateos R. Efecto analgésico de la administración de tramadol por vía subcutánea en dolor agudo. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 1998; 5: 120-124.
- 16.** Clarke's Analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Pharmaceutical press, third edition, London-Chicago, 2004; 1 – 2: 136, 181, 1654-1656.
- 17.** Clarke's Isolation and identification of drugs. In pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Pharmaceutical press, second edition, London-Chicago, 1986; 1033-1034.
- 18.** Villarejo M, Murillo J, Alvarado H. Farmacología de los agonistas y antagonistas de los receptores opioides. *Educación e Investigación Clínica*, 2000; 1 (2): 106 - 137.
- 19.** Rico M, Cura M, Harbst h, Palominos A, Figueroa M, Kramer V. Evaluación de tramadol como un opioide alternativo a la codeína en el segundo peldaño de la escalera analgésica de la OMS. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 2000; 7: 345-353.
- 20.** Garrido E, Garrido J, Borges F, Delerue-Matos C. Development of electrochemical methods for determination of tramadol- analytical application to pharmaceutical dosage Forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, January 2003; 32: 975- 981.
- 21.** [http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/158/html/sec\\_9.html](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/158/html/sec_9.html).
- 22.** Herbert M, Weis R, Holzer P. The enantiomers of tramadol and its major metabolite inhibit peristalsis in the guinea pig small intestine via differential mechanisms. *BMC Pharmacology*, 2007; 7(5): 1 - 11.
- 23.** Campanero M, Calahorra B, Valle M, Troconiz I, Honorato J. Enantiomeric separation of tramadol and its active metabolite in human Plasma by chiral High-Performance Liquid Chromatography: Application to pharmacokinetic studies. *Chirality*, 1999; 11: 272 - 279.
- 24.** Garrido M, Sayar O, Segura C, Rapado J, Dios-viéitez M, Jesús M, Trocóniz I. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effects of (+)-

tramadol in the rat: Role of cytochrome P450 2D activity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003; 305 (2): 711-718.

**25.** Zegarra J. Bases fisiopatológicas del dolor. *Acta Médica Peruana*, 2007; 24 (2):105-108.

**26.** Hernández G, Cruz S. Mecanismos de tolerancia analgésica a los opioides. *Salud mental*, 2005; 28 (3): 22-31.

**27.** Minami K, Ogata J, Horishita T, Shiraishi M, Okamoto T, Sata T, Shigematsu A. Intramuscular tramadol increases gastric pH during anesthesia. *Canadian Journal of Anesthesia*, 2004; 51 (6): 545-548.

**28.** Rojas-Corrales O, Berrocoso E, Micó. Role of 5-Ht<sub>1A</sub> and 5-Ht<sub>1B</sub> receptors in the antinociceptive effect of tramadol. *European Journal of Pharmacology*, 2005; 511: 21-26.

**29.** Rojas-Corrales M, Ortega-Alavaro A, Gibert-Rahola J, Roca-vinardell A, Micó J. Pindolol, a  $\beta$ -adrenoceptor blocker/5-hidroxytryptamine (1A/1B) antagonist, enhances the analgesic of tramadol. *Pain*, 2000; 88: 119-124.

**30.** Navarro A, Sumano H, Ocampo L, Basurto H. Efecto sinérgico de la meperidina y el propranolol en perros. *Veterinaria México*; 1982, 13: 183-127.

**31.** Rojas-Corrales M, Berrocos E, Gibert-Rahola J, Micó J. Antidepressant-like effect of tramadol and its enantiomers in reserpinized mice: comparative study with desipramine, fluvoxamine, venlafaxine and opiates. *Journal of Psychopharmacology*, 2004; 18(3): 404-411.

**32.** Casals M, Samper D. Efectividad, tolerabilidad y calidad de vida en el tratamiento del dolor crónico no oncológico, con tramadol de liberación controlada en dosis única diaria. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 2004; 11: 129-140.

**33.** Herrera J. Utilidad de los opioides orales en dolor neuropático. Aparición de nuevas formulaciones de tramadol y morfina. V reunión científica de la sed y jornada de actualización en dolor. Granada (España), 2001: 32-34.

**34.** Cuéllar E, Méndez D, Medina A, Hinojosa A, Partal S, Sabatel M, Vera A, Rodríguez-Fernández. Analgesia intravenosa controlada por el paciente: tramadol vs tramadol + droperidol en cirugía digestiva. Control de náuseas y vómitos postoperatorios. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 2001; 8: 253-259.

- 35.** Lara A, Lavin N, Rogerio-Zamora R, Esquivel V. Control del dolor postoperatorio con clorhidrato de tramadol sublingual. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 2001; 8: 486-494.
- 36.** Mastrocinque S, Fantoni T. Comparison of preoperative tramadol and morphine for the control of early postoperative pain in canine ovariohysterectomy. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 2003; 30: 220-228.
- 37.** Alvarado C, Guzmán A, Díaz E, Patiño R. Synthesis of tramadol and analogus. *Journal of the Mexican Chemical Society*, November 2005; 49(4): 324-327.
- 38.** Mckown W, Gauthier A, Jones W, Raffa R. Metabolism of the analgesic drug, tramadol hydrochloride, in rat and dog. *Xenobiotica*, 2001; 31(7): 423-441.
- 39.** McMillan C, Livingston A, Clark C, Dowling P, Taylor S, Duke T, Terlinden R. Pharmacokinetics of intravenous tramadol in dogs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 2008; 72: 325-331.
- 40.** Nobilis M, Kopecky J, Kvetina J, Chladek J, Svoboda Z, Vorisek V, Perlik F, Pour M, Kunes J. High-performance liquid chromatographic determination of tramadol and its O-desmethylated metabolite in blood plasma. Application to a bioequivalence study in humans. *Journal of Chromatography A*, 2002; 949: 11-22.
- 41.** Giorgi M, Del Carlo S, Saccomanni G, Lebkowska-Wieruszewska B, Kowalski C.J. Pharmacokinetic and urine profile of tramadol and its major metabolites following oral immediate release capsules administration in dogs. *Veterinary Research Communications*, 2009: 33:875–885.
- 42.** Ho S, Wang J, Liaw W, Ho C, Li J. Determination of tramadol by capillary gas chromatography with flame ionization detection application to human and rabbit pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*. 1999; 736: 89-96.
- 43.** Pypendop B, Ilkiw J. Pharmacokinetics of tramadol, and its metabolite O-desmethyl-tramadol, in cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2007; 31: 52-59.
- 44.** Sousa A, Santos A, Schramm S, Porta V, Górnjak S, Florio J, Souza H. Pharmacokinetics of tramadol and O-desmethyltramadol in goats after intravenous and oral administration. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2008; 31(1): 45-51.
- 45.** Shilo Y, Britzi M, Eytan B, Lifschitz T, Soback S, Steinman S. Pharmacokinetics of tramadol in horses after intravenous, intramuscular and oral

administration. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2007; 31: 60-65.

**46.** Elghazali M, Barezaik I, Abdel Hadi A, Eltayeb F, Al Masri J, Wasfi I. The pharmacokinetics, metabolism and urinary detection time of tramadol in camels. *The Veterinary Journal*, 2008; 178: 272-277.

**47.** Giorgi M, Del Carlo S, Sgorbini M, Saccomanni G, Pharmacokinetics of Tramadol and Its Metabolites M1, M2, and M5 in Donkeys after Intravenous and Oral Immediate Release Single-Dose Administration. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2009; 29(7): 569-574.

**48.** PLM. Diccionario de especialidades farmacéuticas, Intersistemas editores, edición 52, 2006; tomo II K-Z: 3519-3526.

**49.** Garrido M, Habre W, Rombout F, Trocóniz I. Population Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modelling of the Analgesic Effects of Tramadol in Pediatrics. *Pharmaceutical Research*, September 2006; 23( 9): 2014-2223.

**50.** Malonne H, Sonet B, Streel B, Lebrun S, De Niet S, Sereno A, Vanderbist F. Pharmacokinetic evaluation of a new oral sustained release dosage form of tramadol. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2003; 57(3): 270-278.

**51.** Corrêa N1, Silva a, Crosignani N. Effects of morphine or tramadol on thiopental anesthetic induction dosage and physiologic variables in halothane anesthetized dogs. *Acta Scientiae Veterinariae*. March 2007; 35(2): 161-166.

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

**53.** Sáez V, Hernández E, Sanz Angulo L. Sistemas de liberación controlada de medicamentos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Julio 2002; 3(3): 1-20.

**54.** Sáez V, Hernández E, López L. Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Abril 2003; 4(2): 111-122.

**55.** Handbook of pharmaceutical excipients. American pharmacists association. Edited by Rowe R, Sheskey P and Quinn M. USA, sixth edition 2009; 110-114, 159-161, 506-509.



- 56.** Morales M<sup>a</sup>, López G, Ruiz M<sup>a</sup>. Estudio de estabilidad de suspensiones farmacéuticas de liberación modificada de clorhidrato de morfina. *Ars pharmaceutica*, 2007; 48 (2): 157-173.
- 57.** Fresno M<sup>a</sup>, Ramírez A, Jiménez M<sup>a</sup>. Estudio reológico e interacción de geles binarios de carbopol<sup>®</sup> ultrez<sup>™</sup> 10 y ácido hialurónico: Índice de sinergia viscosa. VI Congreso SEFIG y 3<sup>as</sup> jornadas TF, 2003; 177-180.
- 58.** Zhang L, Parsons D, Navarre C, Kompella U. Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. *Journal of Controlled Release*, 2002; 85: 73–81.
- 59.** Ricci E, Lunardi L, Nanclares D, Marchetti J. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutis*, 2005; 288: 235–244.
- 60.** Krishnaiah Y, Karthikeyan R, Satyanarayana V. A three-layer guar gum matrix tablet for oral controlled delivery of highly soluble metoprolol tartrate. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002; 241: 353–366.
- 61.** Pillai C, Paul W, Sharma P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 2009; 34: 641–678.
- 62.** Sinha V, Singla A, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004; 274: 1–33.
- 63.** Felt O, Furrer P, Mayer J, Plazonnet B, Buri P, Gurny R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999; 180: 185–193.
- 64.** Vargas D. Diseño y farmacocinética de un sistema matricial de hidrato de doxiciclina de liberación prolongada en becerros. Tesis para obtener el doctorado en ciencias. U.N.A.M. 2008.
- 65.** Barreiro-Iglesias R, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Incorporation of small quantities of surfactants as a way to improve the rheological and diffusional behavior of carbopol gels. *Journal of Controlled Release*; 2001, 77: 59–75.
- 66.** LueBen H, Leeuw B, Langemeyer M, Verhoef J, Jungunger H. Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin *in vivo*. *Pharmaceutical Research*; 1996, 13(11): 1668-1672.

- 67.** Escobar-Chávez J, López-Cervantes M, Naik A, Kalia Y, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermoreversible pluronic f-127 gels in pharmaceutical formulations *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2006, 9 (3): 339-358.
- 68.** Ricci E, Bentley B, Farah M, Bretas R, Marchetti J. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2002, 17: 161–167.
- 69.** Pasquali R, Chiappetta D, Bregni C. Los Copolímeros en Bloques Anfifílicos y sus Aplicaciones Farmacéuticas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*; 2005, 24(4): 610 -8.
- 70.** Rabea E, Badawy M, Stevens C, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*; 2003, 4(6): 1457-1465.
- 71.** Pillai C, Paul W, Sharma Ch. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*; 2009, 34: 641–678.
- 72.** Carreira A, Gonçalves F, Mendonça P, Gil M, Coelho J. Temperature and pH responsive polymers based on chitosan: Applications and new graft copolymerization strategies based on living radical polymerization. *Carbohydrate Polymers*; 2010, 80: 618–630.
- 73.** Sonha V, Singla A, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*; 2004, 274: 1-33.
- 74.** Gan S, Ismail R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for tramadol and *o*-desmethyltramadol in human plasma using solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 2001; 759: 325–335.
- 75.** Aline SA. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gaceta Médica Mexicana* 2002; 138:295-298.
- 76.** Microcal, Origin version 4.0 Scientific and Technical Graphics in Windows. Microcal Software Inc.
- 77.** Microsoft Excel. 1985-1997.
- 78.** WinNonline, Version 5.1, Pharsight Corporation, Mountain View, Calif, USA.

- 79.** Chu H-M, Ette EI. A Random Sampling Approach for Robust Estimation of Tissue-to-Plasma Ratio From Extremely Sparse Data. *AAPS Journal*; 2005, 7(1): E249-E258.
- 80.** Pocock G, Richard C. Fisiología humana, la base de la medicina. Masson, segunda edición. Barcelona, España, 2005, 18: 435.
- 81.** Lazaeta M. Medicina natural al alcance de todos. Pax México, segunda edición; 1997, 5: 32.
- 82.** Enfermedades digestivas de los animales pequeños. Inter-médica, segunda edición. Buenos Aires, Argentina; 1995, 6: 91.
- 83.** Radostits O, Mayhew J, Houston D. Examen y diagnóstico clínico en Veterinaria. Harcourt, primera edición. Madrid, España; 2002, 7:129.
- 84.** Águila A, Caamaño M, Martín F, Montejo M. Biofarmacia y farmacocinética, ejercicios y problemas resueltos. Elsevier. España; 2008, 2: 116.
- 85.** Barichello J, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. *International Journal of Pharmaceutics*; 1999, 184: 189–198.
- 86.** Gonzalez M. Desarrollo farmacéutico de un gel con poloxámero para la aplicación tópica de ibuprofeno. Tesis para obtener el doctorado en ciencias. U.N.A.M. 2007.
- 87.** Hellyer P. Objective, categoric methods for assessing pain and analgesia. En Gaynor J.S., Muir W.W., eds. *Handbook of Veterinary Pain Management*, st. Louis, Mo. Mosby, 2002; 82-107.
- 88.** Muir W, Wiese A, Wittum T. Prevalence and characteristics of pain in dogs and cats examined as outpatients at a veterinary teaching hospital. *Journal of American Veterinary Medical Association*, May 2004; 224 (1):1459 – 1463.
- 89.** Fernández I, Jones E, Welsh E, Fleetwood-Walker a S. Pain mechanisms and their implication for the management of pain in farm and companion animals. *The Veterinary Journal*, February 2007; 174: 227–239.
- 90.** Maddison J, Wpage S, Church D. *Small Animal Clinical Pharmacology*. W.B. Saunders 2002; 12: 251-269, 13: 271-292.

- 91.** Nishihara K, Kikuchi H, Kanno T, Tanabe S, Sarashina T, Uzuka Y. Comparison of the upper gastrointestinal of etodolac and aspirin in healthy dogs. *Journal veterinary Medical Science*, June 2001; 63(10): 1131-1133.
- 92.** Luna SP, Basilio AC, Steagall PV, Machado LP, Moutinho FQ, Takahira RK, Brandao CV. Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. *American Journal Veterinary Research.*, March 2007; 68(3):258-64.
- 93.** Steagall P, Mantovani F, Ferreira t, Salcedo S, Moutinho F, Luna S. Evaluation of the adverse effects of oral firocoxib in healthy dogs. *Journal Veterinary. Pharmacology. Therapeutics.* June 2007; 30: 218–223.
- 94.** Mathews K, Doherty T, Dyson D, Wilcock B, Valliant A. Nephrotoxicity in dogs associated with methoxyflurane anesthesia and flunixin meglumine analgesia. *Canadian Veterinary Journal*, November 1990; 31: 766-771.
- 95.** Narita T., Sato R., Tomizaea N., Tani K., Komori S., Hara S., Safety of reduced-dosage ketoprofen for long-term oral administration in healthy dogs. *American Journal Veterinary Research.* July 2006; 67 (7): 1115-20.
- 96.** Bosmans T, Gasthuys F, Duchateau L, de Bruin T, Verhoeven G, Polis I. A Comparison of Tepoxalin–Buprenorphine Combination and Buprenorphine for Postoperative Analgesia in Dogs: A Clinical Study. *Journal Veterinary Medical*, October 2007; 54: 364–369.
- 97.** Hoeijmakers M, Coert A, Van Helden H, Horspool L. The pharmacokinetics of vedaprofen and its enantiomers in dogs after single and multiple dosing. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2005; 28: 305–312
- 98.** Nell J, Bergman M, Hoeijmakers, Van Laar P, Horspool J. Comparison of vedaprofen and meloxicam in dogs with musculoskeletal pain and inflammation *Journal of Small Animal Practice*, May 2002; 43: 208–212.
- 99.** Tendillo F. Memorias del Seminario de anestesia y manejo del dolor. Especialidades Virbac, Canigen, 2008; 1- 4.