



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**“FARMACOCINÉTICA ORAL DE UNA ENROFLOXACINA SOLVATO
RECRISTALIZADA CLORHIDRATO-DIHIDRATO EN TILAPIA HÍBRIDA
(*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*)”**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA:

ENRIQUE ESTRADA SAN AGUSTÍN

TUTOR PRINCIPAL:
DR. HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ, FMVZ UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:
DRA. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD, FACULTAD DE QUÍMICA UNAM
DR. HÉCTOR CASTILLO JUÁREZ, UAM-X

CD. MX.

DIC, 2018



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 mis padres y hermanos.

Agradecimientos:

A mis tutores por haberme encausado correctamente en esta etapa de investigador en formación, y gracias también por su paciencia. En especial mención al Dr. Héctor Sumano que consiguió los recursos para poder costear el proyecto.

A la Dra. Lilia Gutiérrez, que siempre estuvo dispuesta a escuchar los problemas que se iban presentando en la parte experimental y de generación de resultados, aportando ideas valiosas para la resolución de estos.

A mis amigos, aunque no son muchos, me han ayudado en muchas situaciones, sobre todo, por aceptarme cómo soy.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por permitirme integrarme al programa de Posgrado.

Al Departamento de Medicina y Zootecnia Acuícola, por apoyarme en la realización de pruebas piloto del experimento.

A la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, por permitirme realizar la fase experimental dentro de sus instalaciones, y a los docentes de esta institución que me tendieron la mano para resolver mis dudas con el sistema de recirculación. y a todos los chicos de licenciatura que me ayudaron en la realización de la fase experimental.

Al Dr. Fernando García por todo el apoyo incondicional, primero cómo tutor de servicio social, y después por su ayuda para contactarme con el sector acuícola del país.

A la técnica de laboratorio de farmacología Felisa González por su ayuda en la realización de estudios microbiológicos de los que derivaron los resultados obtenidos en el experimento.

Resumen:

El solvato recristalizado de enrofloxacin como clorhidrato-dihidrato (enro-C) ha mostrado valores de biodisponibilidad considerablemente mayores en algunas especies. Este trabajo define la farmacocinética (PK) de enro-C en tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*) cuando se administra recubriendo los *pélets* prefabricados con una suspensión de gelatina que contiene enro-C (T1) o con alimentos balanceados prefabricados añadiendo enro-C durante la *peletización* (T2). Ambas alimentaciones medicadas con una concentración de 3000 mg de enro-C por kg de alimento. La dosis total se calculó en aproximadamente 10 mg/kg en función del consumo de alimentos. La prueba se llevó a cabo en tanques de agua recolectando muestras de sangre catorce veces en 96 h (n= 5 tilapias/tiempo de muestreo). Las concentraciones máximas en plasma (C_{max}) para T1 y T2 fueron de $1.35 \pm 0.55 \mu\text{g/mL}$ y $1.92 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$, respectivamente; el tiempo para alcanzar C_{max} (T_{max}) ocurrió casi simultáneamente a las 6.5 h. El área bajo la curva de las concentraciones de plasma frente al tiempo (AUC₀₋₂₄) fue de $25.41 \pm 24 \mu\text{g/mL/h}$ y $57.91 \pm 30 \mu\text{g/mL/h}$ para T1 y T2, respectivamente. Comparando los datos disponibles de otros estudios con enro-C, los resultados indican que la misma dosis de enro-C logra valores más altos de C_{max} y AUC₀₋₂₄ en comparación con la enrofloxacin estándar. Con base en los datos obtenidos en este estudio, es factible proponer que, si se requiere enrofloxacin para el tratamiento de una enfermedad bacteriana en tilapia, la adición de enro-C al alimento durante el proceso de peletización del alimento parece tener una ventaja en comparada con la enrofloxacin estándar. Sin embargo, antes de que esto suceda, se deben llevar a cabo estudios de toxicidad y residuos de medicamentos y se deben resolver los problemas ambientales y de salud pública.

Abstract:

A recrystallized solvate of enrofloxacin as hydrochloride-dihydrate (enro-C) has shown higher bioavailability in some species and possesses higher water solubility, than enrofloxacin. This study defines the pharmacokinetics (PK) of enro-C in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*) when administered as in-feed medication either adding enro-C during food pelleting (T2) or by coating pre-manufactured pellets with a gelatin suspension containing enro-C (T1). T1 and T2 were prepared to end up with 3000 mg of enro-C/kg of feed and a total dose of 10 mg/kg based on food consumption. The trial was carried out in sweet water tanks, collecting blood samples twelve times in 96 h (3 repetitions with 5 tilapias/sampling time). Maximum plasma concentrations (C_{MAX}) for T1 and T2 were 1.35 ± 0.55 $\mu\text{g/mL}$ and 1.92 ± 0.26 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Time to achieve C_{MAX} (T_{MAX}) occurred almost simultaneously at 6.5 h. Area under the plasma vs time concentrations (AUC_{0-24}) were 25.41 ± 24 $\mu\text{g/mL/h}$ and 57.91 ± 30 $\mu\text{g/mL/h}$, for T1 and T2, respectively. Taking MIC data from available literature indicate that PK/PD ratios (C_{MAX}/MIC_{90} and AUC_{0-24}/MIC_{90}) are higher in T2 as compared to T1 in tilapia. Results indicate that the customary dose of enrofloxacin (10 mg/kg) but utilizing enro-C achieves particularly high C_{MAX} and AUC_{0-24} values. Thus, based on these results, it is feasible to propose enro-C for the treatment of bacterial diseases in tilapia, preferably as done in T2. Yet, before this happens, toxicity, and drug-residue studies, as well as environmental and public health issues, must be resolved.

ÍNDICE

1	Introducción.....	- 12 -
2	Marco teórico.....	- 13 -
2.1	La tilapia.....	- 13 -
2.2	Sistemas de producción en acuicultura.....	- 14 -
2.1.1	Extensivo.....	- 14 -
2.1.2	Semi-intensivo.....	- 14 -
2.1.3	Intensivo.....	- 15 -
2.3	Calidad de agua (CA).....	- 16 -
2.4	Enfermedades bacterianas que afectan a la tilapia.....	- 19 -
2.5	Principales patógenos de la tilapia reportados en México.....	- 21 -
2.6	Tratamiento farmacológico antibacteriano.....	- 22 -
2.7	Alimento medicado.....	- 23 -
2.8	Fluoroquinolonas.....	- 25 -
2.9	Enrofloxacin.....	- 26 -
2.10	Propiedades fisicoquímicas de la enrofloxacin.....	- 26 -
2.11	Mecanismo de acción de las fluorquinolonas.....	- 26 -
2.12	Actividad antibacteriana de las fluorquinolonas.....	- 27 -
2.13	Farmacocinética de la enrofloxacin.....	- 29 -
2.14	Enrofloxacin recristalizada.....	- 32 -
3	Justificación.....	- 33 -
4	Hipótesis.....	- 34 -
5	Objetivo.....	- 35 -
6	Material y métodos.....	- 36 -
7	Resultados.....	- 43 -
8	Discusión.....	- 47 -
9	Referencias:.....	- 51 -

10 Apéndices	- 61 -
2.15 Apéndice 1 Formatos	- 61 -
2.16 Apéndice 2 Gráficas de regresión lineal de los estándares de cada uno de los cultivos que se realizaron.....	- 63 -

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Parámetros farmacocinéticos en el plasma y músculo después de una dosis oral única en alimento medicado de 10 mg/Kg de enrofloxacin en tilapia (Teles et al., 2016).	- 31 -
Cuadro 2. Cálculo de dosis de enro-C adicionada al pélet (3000 mg/kg de alimento) para cada tina (Sujeto)	- 38 -
Cuadro 3. Medias de parámetros farmacocinéticos \pm 1 DE de enro-C en tilapia, después de una dosis única de 10 mg/kg a través de alimento medicado, basado en el consumo de alimento. El T1 con pélets recubiertos con una mezcla de fármaco/gelatina (3000 mg de enro-C/Kg de alimento), y el T2 con el fármaco mezclado antes de peletizar también a 3000 mg de enro-C por kilogramo de alimento.	- 43 -
Cuadro 4 Prueba de efectos fijos	- 44 -
Cuadro 5 Estimaciones de componentes de varianza	- 45 -
Cuadro 6 Detalles de los efectos del tratamiento	- 45 -
Cuadro 7 Prueba t de Student de los tratamientos	- 45 -
Cuadro 8. Comparación con los resultados de Teles et al. (2016). Los tratamientos 1 y 2 alimento medicado con enro-C y el tratamiento de Teles et al. con alimento medicado con enrofloxacin base, los tres tratamientos a una dosis de 10 mg/kg de pez calculado con base en la ingesta diaria de alimento.	- 47 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la hidrólisis de la urea al contacto con el agua (Vinatea, 1994).	- 18 -
Figura 2. Momento de pesaje antes de aleatorización de tilapia en tina de sistema de recirculación.....	- 39 -
Figura 3. Esquema del sistema de recirculación utilizado para el experimento. ...	- 39 -
Figura 4. Procedimiento para la obtención de plasma sanguíneo en tilapia. Momento de anestesia del pez (A); toma de muestra de sangre de la vena caudal (B); plasma obtenido después de la centrifugación de la sangre (C).....	- 40 -
Figura 5. Inoculación del plasma en agar TSA.....	- 40 -
Figura 6. Fórmula para obtener la concentración de la enro-C a un tiempo “x”.....	- 41 -
Figura 7 . Medias \pm ee de las concentraciones plasmáticas de enrofloxacin obtenidas a partir de datos arrojados por el programa JMP, en tilapia híbrida (<i>Oreochromis niloticus</i> x <i>Oreochromis mossambicus</i>) después de la administración de enro-C con dos distintas formas de adición del fármaco en alimento: T1, cubriendo los pélets prefabricados con una mezcla de gelatina/fármaco (3000 mg/kg de alimento) (A) y T2, incorporando el fármaco al alimento antes de realizar el peletizado, también a 3000 mg/Kg de alimento (B). Las dosis finales para ambos tratamientos fueron calculadas a 10 mg/Kg con base en el consumo diario de alimento.....	- 44 -
Figura 9. Medias \pm ee de las concentraciones plasmáticas de enrofloxacin, en tilapia híbrida (<i>Oreochromis niloticus</i> x <i>Oreochromis mossambicus</i>) después de la administración de enro-C con dos distintas formas de adición del fármaco en alimento: T1, cubriendo los <i>pélets</i> prefabricados con una mezcla de gelatina/fármaco (3000 mg/kg de alimento) (A) y T2, incorporando el fármaco al alimento antes de realizar el peletizado, también a 3000 mg/Kg de alimento (B). Las dosis finales para ambos tratamientos fueron calculadas a 10 mg/Kg con base en el consumo diario de alimento.	- 46 -

ABREVIATURAS

AUC	Área bajo la curva
C _{MAX}	Concentración plasmática máxima
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Da	Dalton
enro-C	Enrofloxacin recrystalized
F	Biodisponibilidad
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Food and Drug Administration
G (+)	Gram positiva
G (-)	Gram negativas
h	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
kg	Kilogramo
l	Litro
mg	Miligramo
µg	Microgramo
MMDP	Miles de millones de pesos
ml	Mililitro
MPC	Concentración de prevención de mutantes

MRT	Tiempo medio de residencia
MVZ	Médico veterinario zootecnista
NH ₃	Amonio no ionizado
NH ₄ ⁺	Amonio ionizado
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Principio activo
pH	Potencial de hidrogeniones
RAS	Sistemas de recirculación en acuicultura
RPM	Revoluciones por minuto
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
T	Tiempo
T _{½β}	Vida media de eliminación
T _{MAX}	Tiempo que tarda en alcanzar la C _{MAX}
USD	Dólares de Estados Unidos de Norteamérica
UV	Ultravioleta

1 Introducción

La acuicultura es definida como el cultivo de peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas y presupone la intervención humana en el proceso de cría para aumentar la producción, por ejemplo, en el almacenamiento periódico de la especie productiva, la alimentación, su protección frente a los depredadores, etc. El cultivo también conlleva la propiedad individual o empresarial de la población que se cultiva y la planificación, el desarrollo y la utilización de sistemas, emplazamientos, instalaciones, así como la producción y el transporte (FAO, 2015).

Para 2016, la producción en la acuicultura a nivel mundial se estimó en 80.0 millones de toneladas, con un valor estimado de 231,600 millones de USD. Se han registrado en las bases de datos estadísticas de la producción Mundial de Acuicultura de la FAO un total de 575 especies acuáticas cultivadas en agua dulce, agua de mar y agua salobre. El consumo per cápita de pescado comestible aumentó de 9.0 kg en 1961 a 20.2 kg en 2015, con una tasa media de aproximadamente un 1,5% al año. Las estimaciones preliminares relativas a los años 2016 y 2017 apuntan a un nuevo aumento hasta alcanzar unos 20,3 kg y 20,5 kg, respectivamente (FAO, 2018).

La acuicultura sigue siendo el segmento de más rápido crecimiento en lo que se refiere a producción de alimento animal (Noga, 2010), con una media anual del 5.5% del 2010 hasta 2016 (FAO, 2018).

La acuicultura es considerada también una de las industrias proveedora de alimentos con un rápido crecimiento en la región latinoamericana. El aumento se produjo principalmente a partir de la cría de salmón, camarón y el cultivo de varias especies de agua dulce como la tilapia. En el caso de los dos primeros productos, el aumento de la producción se asoció con la intensificación de las actividades acuícolas, tanto en términos de número de sitios de producción como de aumento de las densidades de cultivo. La mala planificación, entre otras cuestiones, ha sido responsable de graves crisis debido a la severa ocurrencia de enfermedades como

la mancha blanca en el camarón y la anemia infecciosa del salmón (ISA) en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (FAO, 2018). Esto deriva en la utilización de grandes cantidades de antibióticos, por ejemplo, de acuerdo con el Servicio Nacional de Pesca de Chile (SERNAPESCA), el uso de antibióticos en la industria del salmón llegó a 557 toneladas en 2015 y de 327 en 2016 (Lozano *et al.*, 2018).

En México se incrementó el consumo per cápita de productos pesqueros y acuícola en 3.7 kilos, al pasar de 8.9 kilos en 2012 a 12.6 kilogramos en 2016, con lo que nuestro país alcanzó la meta sexenal establecida por la Organización Mundial de Salud (OMS), la cual recomienda el consumo *per cápita* de 12 kilos de pescado al año (SAGARPA, 2017). Este sector produjo 146,000 toneladas con un valor estimado en 7.56 MMDP, y las principales especies producidas son la tilapia (35%), el camarón (25%) y el ostión (16%) (SAGARPA, 2012). En nuestro país no se tiene un registro de la incidencia de enfermedades en los diferentes tipos de cultivo acuícolas, así como tampoco de las cantidades que se ocupan de antibióticos para el tratamiento de estas.

No obstante, existe preocupación por las enfermedades que afectan a los peces. Uno de los cultivos más diseminados en el mundo es el de las tilapias y esto se debe a sus altas tasas de crecimiento, adaptabilidad a una amplia gama de condiciones ambientales y la capacidad de crecer y reproducirse en cautiverio, además de su bajo precio en el mercado (El-Sayed, 2006).

2 Marco teórico

2.1 La tilapia

La tilapia es el nombre común utilizado para describir a un grupo de más de 100 especies de peces de la familia Cichlidae, la expresión deriva de una palabra del dialecto nativo africano (Bechuana) *thiape*, que significa pez (Chapman, 1992). Son nativas de África y Medio Oriente. Las especies más cultivadas pertenecen al género de *Oreochromis*, este incluye la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus*; la

tilapia azul *Oreochromis aureus*; y la tilapia de Mozambique *Oreochromis mossambicus* (Jimenez, 2007; Noga, 2010).

Estas pueden tolerar un amplio rango de salinidades que van desde agua dulce hasta agua marina, por su velocidad de crecimiento, la más cultivada en agua dulce es la *O. niloticus*, pues no es considerada como la más apropiada para salinidades altas. Las principales tilapias estudiadas con respecto a la tolerancia a la salinidad han sido las tilapias rojas, que se conoce que tiene varias especies, entre ellas la *O. mossambicus*. Estas dos especies fueron fusionadas para aprovechar el rápido crecimiento de *O. niloticus* y la tolerancia a salinidades de la *O. mossambicus* (Hena *et al.*, 2005).

2.2 Sistemas de producción en acuicultura

Los sistemas de producción en acuicultura se dividen en extensivo, semi-intensivo, intensivo e hiperintensivo, y dependen de la densidad, la cantidad de agua de recambios, la fertilización de estanques, el manejo de los parámetros de calidad de agua y la utilización de dietas balanceadas, a continuación, se describen los más comunes en México:

2.1.1 Extensivo

En los tipos de sistema intensivo no hay control de los parámetros de calidad de agua, sólo se utiliza el estanque para dejar crecer por sí mismos a los peces, sólo se suministra la semilla (alevines) y se va pescando poco a poco los peces dependiendo del consumo local o familiar.

2.1.2 Semi-intensivo

Un sistema de producción semi-intensiva de peces, y otros animales acuáticos, usan alimento natural, fertilización de estanques o fertilización y lo suplementan con alimento balanceado. Este tipo de sistemas producen peces a bajo costo, con bajos rendimientos. Cultivan principalmente peces herbívoros u omnívoros cómo la tilapia

o la carpa. Las densidades de siembra y producción son bajas, por lo que se recomienda a productores de sustento (El-Sayed, 2006).

2.1.3 Intensivo

La acuicultura intensiva es simplemente el empleo de altas densidades de población de especies cultivadas, con el fin de maximizar la producción con el mínimo uso de agua. Dichos sistemas dependen exclusivamente de la alimentación artificial y la reutilización y / o intercambio de agua. Los sistemas intensivos producen una alta producción, que varía de 100 a > 500 Mt / ha / año. Sin embargo, requieren altos costos operativos y de capital, así como altos niveles de tecnología y herramientas de gestión.

2.1.3.1 Sistemas de recirculación acuícola (RAS)

La falta de espacio para expansión y posibilidad de ocupación de nuevos sitios para producción acuícola, la disponibilidad limitada de agua y la generación de contaminación, son considerados como los obstáculos clave para el desarrollo de la acuicultura. Es por eso que en muchos países europeos han promovido la utilización de sistemas de recirculación en acuicultura (RAS) como una posible solución y oportunidad para un fuerte desarrollo de la acuicultura (Badiola *et al.*, 2012).

Los RAS son un conjunto de procesos y componentes que se utilizan para el cultivo de organismos acuáticos, donde el agua es continuamente limpiada y reutilizada (Libey, 1993).

En este tipo de sistemas se conjuntan una serie de procesos químicos, biológicos y mecánicos, que son esencialmente, el tanque o tanques de cultivo de peces, un biofiltro para remover el amonio generado, un filtro para remover los sólidos, una bomba para recircular el agua y un artefacto para administrar de oxígeno (Singh *et al.*, 1999).

Tiene, además, escalas de producción muy efectivas, con una gran eficacia de producción por trabajador, superior a cualquier otro sistema de producción acuícola. Los RAS usan entre 90-99 % menos de agua y sólo el 1 % del espacio, además de ser sistemas amigables con el ambiente (Timmons *et al.*, 2012).

Los RAS son comúnmente utilizados en estudios de farmacología acuícola por la facilidad de control de los principales parámetros, cómo son pH, temperatura, oxígeno disuelto, componentes amoniacales, entre otros.

2.3 Calidad de agua (CA)

La CA es una condición general que permite que el agua se emplee para usos concretos. Esta calidad es determinada por la hidrología, la fisicoquímica y la biología de la masa de agua a que se refiera. En el cultivo de peces se menciona que el crecimiento de los mismos depende en gran parte de la CA; por lo que para lograr una buena producción, es necesario mantener las condiciones físico-químicas del agua dentro de los límites de tolerancia para la especie a cultivar (Bautista-Covarrubias y Ruiz, 2011). Estas son las más importantes:

➤ Oxígeno disuelto: El oxígeno disuelto (OD) debe ser considerado el parámetro más importante de calidad de agua. La concentración del oxígeno disuelto en el agua se expresa tanto en partes por millón (mg/l), como en porcentaje de saturación. Las concentraciones del oxígeno disuelto son más altas a 0°C y decrecen con el aumento de la temperatura, la salinidad y la altitud (Vinatea, 1994). Los rangos aceptables para tilapia son 3-8 mg/L (Valbuena-Villareal y Cruz-Casallas, 2006; Tran-Duy *et al.*, 2008).

➤ pH: El pH es un parámetro muy importante en los ambientes acuáticos, éste puede ser la causa de muchos fenómenos químicos y biológicos, pero también puede ser consecuencia de otra serie de fenómenos. Por ejemplo, el pH alcalino es responsable de que un mayor porcentaje de amonio no ionizado esté presente en el agua, pero a su vez, el pH alcalino puede ser resultante de varios factores por ejemplo la abundancia

de fitoplancton en los estanques de cultivo, además, posee un profundo efecto sobre el metabolismo en procesos fisiológicos de peces, camarones y todos los organismos acuáticos, actuando directamente en los procesos de permeabilidad de la membrana celular, interfiriendo por lo tanto en el transporte iónico intra y extracelular, y entre los organismos y el medio. Las comunidades acuáticas pueden interferir en los valores del pH del medio de diferentes maneras, por ejemplo, a través de la asimilación del CO₂, ya que durante el proceso fotosintético, las macrófitas acuáticas y las algas pueden elevar el pH del medio (Vinatea, 1994). Se ha reportado que los puntos letales de acidez y alcalinidad son de pH 4 y pH 11 respectivamente. Las aguas con valores que abarcan rangos de 6.5 a 9.0 son los más adecuados para la producción de peces. Ya valores inferiores a 6.5 disminuyen los procesos reproductivos (Boyd y Tucker, 1998). El pH también ejerce una fuerte influencia sobre la toxicidad de ciertos parámetros químicos tales como el amonio no ionizado, que se torna más abundante a pH alcalino (Vinatea, 1994). Además, es un factor determinante en la ionización de los fármacos cuando se administran por baños, pues estos se comportan como ácidos y bases débiles, los cuales se disocian dependiendo del pH en donde se encuentren, y cuando están disociados el organismo no los puede absorber.

➤ Amonio: el principal producto de excreción de los organismos acuáticos es el amonio (NH₃), compuesto resultante del catabolismo de proteínas (Campbell, 1973). La urea, aminoácidos, derivados óxido aminos, creatina, creatinina y ácido úrico son los otros compuestos nitrogenados de excreción. La urea es el único de estos compuestos que es excretado en cantidades significativas, sin embargo, no es tóxica y en contacto con el agua es rápidamente hidrolizada para producir amonio y dióxido de carbono (Figura 1). El amonio es un gas extremadamente soluble en agua. Cuando se encuentra en solución presenta la siguiente reacción de equilibrio: $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} = \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$, donde, NH₃= amonio no ionizado, NH₄⁺ = amonio ionizado, H₂O = agua y OH⁻ = ion hidroxilo. Este puede tener efecto tóxico de 7 tipos, a nivel

celular, sobre la excreción, en la osmorregulación, sobre el transporte de oxígeno, sobre los tejidos, aumentando la incidencia de enfermedades y disminuyendo el crecimiento (Vinatea, 1994). Los valores normales de este metabolito para tilapia deben ser menores a 1 mg/l (Benli *et al.*, 2008). El pH afecta el equilibrio de NH_4^+ y NH_3 . A pH menor de 7, la fracción de NH_4^+ del equilibrio será predominante. Ya con un pH más alto, la fracción de NH_3 aumenta, pudiendo alcanzar concentraciones tóxicas para los organismos acuáticos. En agua dulce, el porcentaje de cada forma de amonio está determinado básicamente por el pH y, en menor grado, por la temperatura del medio (Vinatea, 1994).

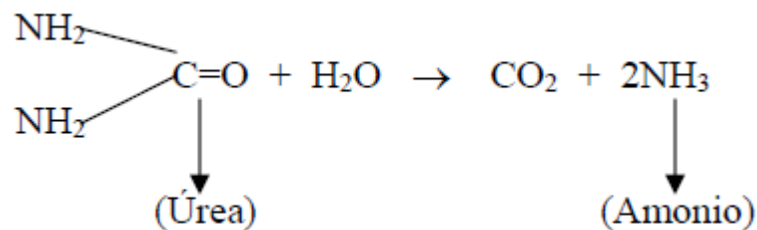


Figura 1. Representación de la hidrólisis de la urea al contacto con el agua (Vinatea, 1994).

➤ Nitrito (NO_2^-): El nitrito también es un compuesto intermediario del proceso de nitrificación, en que el amonio es oxidado por bacterias a nitrato (NO_3^-) en sistemas de acuicultura. El efecto más importante del nitrito en peces es la capacidad que este compuesto de oxidar la hemoglobina de la sangre, convirtiéndola en metahemoglobina, la cual es incapaz de transportar oxígeno, provocando de esta manera la muerte por asfixia de los organismos. El nitrito confiere a la sangre un inconfundible color marrón, indicando la oxidación del pigmento respiratorio (Vinatea, 1994).

➤ El nitrato (NO_3^-): es el producto final de la reducción del amonio, que comprende dos pasos: la transformación del amonio en nitrito por acción de las *Nitrosomonas* spp. y la transformación del nitrito en nitrato por acción del

género de bacterias *Nitrobacter*. Este proceso, por realizarse en condiciones aeróbicas, se lo conoce como "nitrificación". La reducción del nitrito a nitrógeno molecular es conocido como "desnitrificación", y se realiza en condiciones anaeróbicas, propio de ambientes eutrofizados en donde se lleva a cabo la descomposición de la materia orgánica. La toxicidad del nitrato en animales acuáticos parece no ser un serio problema, sin embargo, éste compuesto puede tornarse potencialmente tóxico en sistemas de recirculación de agua (sistemas cerrados), en donde altos niveles pueden ser alcanzados como resultado de la nitrificación del amonio. La toxicidad de este compuesto es debido a su efecto sobre la osmorregulación y posiblemente sobre el transporte de oxígeno (Vinatea, 1994).

➤ Temperatura: es el parámetro físico más comúnmente observado debido a la facilidad con la que puede ser registrado. La temperatura es una de las principales limitantes en una gran variedad de procesos biológicos, desde la velocidad de simples reacciones químicas hasta la distribución ecológica de una especie animal. Los peces, al ser animales poiquiloterms por lo que no presentan mecanismos para regular su temperatura que generalmente se aproxima a la de su ambiente. En vista a esto, la temperatura ambiental tiene un profundo efecto sobre el crecimiento, tasa de alimentación y metabolismo de estos animales (Timmons *et al.*, 2012). Por ejemplo, los peces juveniles, a diferencia de los adultos, requieren niveles más altos de oxígeno disuelto debido a su más alta tasa metabólica relativa. Consecuentemente, cuando el pez se va tornando más grande, su temperatura óptima de crecimiento se desplaza ligeramente a valores inferiores (Vinatea, 1994).

2.4 Enfermedades bacterianas que afectan a la tilapia

A pesar del incremento en las áreas de cultivo de tilapia, esta actividad ha estado desprovista del soporte científico y técnico necesario que permita al

acuicultor tener acceso a mejores condiciones de calidad de agua, a conocer con detalle los parámetros físicos y biológicos de la especie, así como tener facilidades para el diagnóstico de enfermedades dentro de los ciclos de producción. Por ejemplo, con frecuencia, se presenta mortalidad en los alevines, juveniles y adultos de tilapia y este fenómeno queda sin diagnóstico y a menudo sin tratamiento apropiado (Jimenez, 2007).

Las bacterias potencialmente patógenas se encuentran naturalmente en el intestino de tilapia y pueden llegar a ser infecciosas cuando las condiciones de cultivo son desfavorables, incluyendo una pobre calidad del agua y una sobrecarga orgánica (Noga, 2010).

Se han asociado tanto bacterias Gram (-) como Gram (+) con enfermedades de la tilapia, entre las que destacan las siguientes bacterias: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas* spp, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio mimicus* y *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus difficile* *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium chelonae*, *Edwarsiella tarda*, *Flexibacter columnaris* (El-Sayed, 2006; SENASICA, 2017b). *Francisella* sp., *Piscirickettsia salmonis* y *Plesiomonas shigelloides* (Quesada et al., 2013). En algunas ocasiones, las enfermedades bacterianas en peces se presentan con más de un agente patógeno, e incluso con parásitos (Rey et al., 2002), lo que dificulta el diagnóstico y tratamiento.

En México, se han reportado también agentes bacterianos patógenos que han atacado a producciones acuícolas que se dedican al cultivo de tilapia, pero nos enfocaremos a los siguientes cuatro: *Aeromonas* spp., *Francisella* spp., *Pseudomonas* spp. y *Streptococcus* spp. porque representan el 64% de los brotes en los últimos 3 años (SENASICA, 2017b).

2.5 Principales patógenos de la tilapia reportados en México

Aeromonas spp: son bacterias Gram (-), móviles, es probablemente la enfermedad bacteriana que más infecta tanto a cultivos y a tilapias silvestres. Es conocida como la “enfermedad de aletargamiento” o “enfermedad de podredumbre” y produce altas mortalidades en las producciones (El-Sayed, 2006). Se puede presentar a cualquier edad, pero sobre todo ataca a alevines, con mayor incidencia durante la reversión sexual. Los signos clínicos incluyen color oscuro, anorexia, úlceras o hiperemia en la base del pectoral, exoftalmia, letargo, nado errático, giros, separación del grupo y muerte, ascitis and exoftalmia. A la necropsia pueden presentar branquias, hígados y bazo pálidos y ascitis (Rey *et al.*, 2002; El-Sayed, 2006).

Pseudomonas spp: son bacterias Gram (-), móviles. Ha sido reportada en cíclidos en diversos puntos geográficos alrededor del mundo. Causa aumento de la mortalidad en granjas de tilapia. Los peces infectados presentan finos nódulos blancos en el bazo y abscesos en la vejiga natatoria. La infección ocurre principalmente en invierno y primavera a causa de la baja de temperatura (15–20°C). Además, pueden presentar exoftalmia, coloración oscura, lesiones nodulares, necrosis focal en hígado, bazo, riñón y branquias, inflamación de la vejiga natatoria, abscesos en ojos y bazo y formación de granulomas (El-Sayed, 2006). También se han reportado lesiones hemorrágicas en ojos, boca, branquias, superficie de músculos y órganos internos (Austin y Austin, 2007).

Edwardsiella spp: la enfermedad causada por este género de bacterias es conocida como edwardsielosis, son células Gram (-). La más representativa es *Edwardsiella tarda*, ha sido aislada en reptiles, peces y anfibios. Su patogenicidad se incrementa con las temperaturas altas en agua (>30° C) o altos contenidos de materia orgánica (El-Sayed, 2006). Entre los signos más comunes se encuentran la despigmentación de piel, opacidad corneal, ascitis, Nódulos bacterianos en branquias, bazo, intestino, hígado y riñón (Rey *et al.*, 2002; Noga, 2010). Es causa

de aumento en la mortalidad en las producciones y es un patógeno difícil de controlar, además de que es una potencial zoonosis que causa diarreas severas (Rey *et al.*, 2002).

Streptococcus spp: Este género de bacterias G (+) causa la estreptococosis, y es uno de los mayores problemas a nivel mundial en tilapia, con cientos millones de dólares en pérdidas. Es una bacteria oportunista que puede presentarse en peces que han sido sometidos a estrés como ascenso o descenso de temperatura y mala calidad de agua, ya que se encuentra en agua, lodos e incluso en peces sanos (El-Sayed, 2006). Las tilapias afectadas presentan oscurecimiento del cuerpo, letargia, al estar el sistema nervioso central involucrado presentan nado errático y rigidez dorsal, exoftalmia, hemorragias dentro y fuera del cuerpo, con líquido sanguinolento en cavidad peritoneal e intestino, además abscesos y nódulos en tronco y pedúnculo. Se han desarrollado vacunas ya que los tratamientos farmacológicos son generalmente poco efectivos (Noga, 2010).

2.6 Tratamiento farmacológico antibacteriano

Para tratar las enfermedades causadas por los organismos mencionados, se recurre a menudo a distintos antimicrobianos. Entre estos destacan el florfenicol (Shao, 2001; Soto-Rodríguez *et al.*, 2006), la oxitetraciclina (Shao, 2001; Oyebanji y Omoregie, 2002), en ocasiones la sulfadimetoxina-ormetoprim (Bowser y Babish, 1991), en la última década se incorpora a las fluoroquinolonas, en particular la sarafloxacin (Woo, 2006) y la enrofloxacin (Zaki *et al.*, 2011; Teles *et al.*, 2016).

Estos antibacterianos tienen una importancia crítica tanto porque se les supone como eficaces clínicamente, como porque se postula que pueden tener implicaciones ambientales y de resistencia a patógenos que pueden afectar al humano (Done y Halden, 2015; FAO, 2015; World Health Organization, 2015).

En México existen 6 antibióticos aprobados para su uso en acuicultura, estos son la oxitetraciclina, clortetraciclina, florfenicol, enrofloxacin, fosfomicina y

virginiamicina (SENASICA, 2017a). Existe todo un marco legal que regula el uso de fármacos, sin embargo, no hay un registro de las cantidades que se están utilizando de estos productos registrados, e incluso hay productores que utilizan productos no registrados, o hasta sales puras de medicamentos.

Se ha utilizado a la enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg, para el tratamiento tanto de la septicemia como de infecciones externas causadas por *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Renibacterium salmoninarum*, y *Pasteurella piscicida* (Teles *et al.*, 2016). Los resultados indican una eficacia superior al uso de sulfadimetoxina-ormetoprim (Bowser y Babish, 1991), florfenicol (Zaki *et al.*, 2011) y oxitetraciclina (Oyebanji y Omoregie, 2002). No se ha detallado el origen de la dosis señalada y es posible que provenga de extrapolaciones provenientes de información en especies domésticas.

2.7 Alimento medicado

El uso de agentes antibacterianos en acuicultura es limitado por varias razones. En teoría, casi todos los tratamientos pueden ser administrados por inyección, lo cual no es problema para la mayoría de las especies terrestres, sin embargo, esto en peces es costoso por el tiempo horas hombre que se requiere (Samuelsen, 2006). Además, genera un gran estrés en los organismos tratados (Noga, 2010).

Los tratamientos por baños son de fácil aplicación para agentes hidrosolubles, con restricción para los sistemas de recirculación de agua, este método es utilizado en especies pequeñas de peces que sufre de infecciones sistémicas, de piel o de branquias. Es importante hacer notar que los sistemas de acuicultura poseen una gran cantidad de cationes en agua marina que reaccionan con ciertas quinolonas y tetraciclinas, lo que reduce su disponibilidad para ser absorbidos por los peces (Samuelsen, 2006). En agua dulce puede variar de 0 a mayor a 300 mg/l, el rango ideal para acuicultura es de 20-300 mg/l (Vinatea, 1994).

Como se puede deducir, y en contraste con los estudios de farmacocinética en otras especies, en la acuicultura hay pocas vías prácticas de administración y la más utilizada es la medicación en el alimento. Evita el estrés relacionado con el manejo de los peces y es relativamente fácil de lograr, en comparación con la medicación a través de baños, que tampoco causa mucho estrés por manejo, pero en cambio causa graves daños al medio ambiente pues requiere de mucho mayor gasto de antibióticos en comparación de cualquier otra ruta (Noga, 2010).

La administración oral, vía alimento medicado, permite tratar un gran número de organismos con el mínimo de estrés y a bajo costo horas-hombre. Aunque, tiene una limitante importante, ya que los individuos infectados pierden el apetito cuando sufren de una infección bacteriana (Samuelsen, 2006), por lo que el tratamiento va dirigido a los organismos que todavía no están infectados o todavía no presentan signos de enfermedad, es decir, tiene una acción metafiláctica.

En la actualidad la producción de alimento medicado se realiza mezclando el principio activo en el alimento de los peces antes de someterlo a *peletización*¹; o bien se cubre la superficie del alimento ya fabricado con una mezcla del medicamento y aceite de pescado o vegetal² (Duis *et al.*, 1995). Se desconoce si el sabor desagradable-amargo de la enrofloxacin es un factor negativo para una dosificación correcta en el alimento, o si el carácter insoluble en agua de la enrofloxacin es una ventaja o desventaja con cualquiera de las formas mencionadas de administrarlo. aunque la posible lixiviación de enrofloxacin en el

¹ La palabra *peletización* es un proceso que consiste en la unión de un concentrado finamente molido por la adición de aglomerantes se deriva del término *pellet*, y su adaptación *pélet* que refleja la pronunciación, se refiere a pequeñas piezas prensadas de alimento con forma esférica o cilíndrica. El significado original del inglés *pellet* era el de pequeño proyectil de forma esférica de un material comprimido, acepción que ha evolucionado al uso actual en diversos ámbitos. El *DRAE* no lo reconoce de momento. Aunque, tanto en bancos de datos como en textos de Internet, se documenta una mayor presencia de la grafía original con //, la forma con acento *pélet* (pl. *pélets*) refleja mejor la pronunciación y sería la adaptación recomendada. No obstante, también puede optarse por una expresión alternativa, diferente según los contextos.

² Hoja técnica de Aquaflor, 2014. http://www.aquaflor-usa.com/pdfs/Aquaflor_Product_Bulletin_FINAL.pdf

agua y las interacciones entre alimentos y medicamentos son problemas obvios cuando se evalúa la actividad antibacteriana de este fármaco en los peces.

2.8 Fluoroquinolonas

Muchos de los compuestos antibacterianos fueron descubiertos el siglo pasado a partir de organismos vivos, sin embargo, las quinolonas fueron obtenidas químicamente, cuando Leshner *et al.* (1962), buscando un compuesto para combatir la malaria, creó el ácido nalidíxico. Y a partir de 1963 comenzó un gran desarrollo de las quinolonas.

Una de las claves para la creación de nuevos compuestos a partir del ácido nalidíxico fue la adición de diferentes sustitutos en las posiciones N-1, C-6, C-7 y C-8 del núcleo de la quinolona. Estas modificaciones alteran la actividad antimicrobiana, farmacocinética, y propiedades metabólicas de las quinolonas, además contribuye a la comprensión del desarrollo de resistencias bacterianas hacia estos compuestos.

Algunos de estos cambios incluyeron la adición de un átomo de flúor en la posición C-6, que incrementa la actividad inhibitoria de la DNA girasa, facilita la penetración a la célula bacteriana y provee actividad en contra de estafilococos. La adición de un segundo átomo de flúor en la posición C-8 resulta en un incremento en la absorción, alarga la vida media, pero incrementa la fototoxicidad. La adición del grupo piperazina en el C-7 una gran actividad en contra de bacterias Gram (-), además de incrementar la actividad en contra especies de estafilococos y *Pseudomonas*. La alquilación del anillo de piperazina en la posición C-7 también incrementa su vida media de eliminación ($T_{1/2\beta}$) y mejora su biodisponibilidad (F). Por último, la adición de un grupo ciclopropil en la posición N-1, incrementa la actividad antimicrobiana en contra de bacterias Gram (+) y Gram (-) (Andriole, 1993; Sumano *et al.*, 2015).

La incidencia de efectos adversos observados en asociación con las fluoroquinolonas de última generación es baja; estos aparecen regularmente

cuando hay muchos días de tratamiento. El rango de efectos adversos asociados con las fluoroquinolonas, tanto en vía oral e intravenosa, tienen un incremento asociado con la dosis y la duración del tratamiento. Aun así, las fluoroquinolonas son consideradas relativamente seguras, en comparación con otras clases comunes de antimicrobianos (Andriole, 2005).

2.9 Enrofloxacin

La enrofloxacin es un derivado del 1-ciclopropil-7-(4-etil-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-ácido quinolincarboxílico. Su fórmula condensada es $C_{19}H_{22}FN_3O_3$, y tiene un peso molecular de 359.4 Da (Sumano *et al.*, 2015). Es un antibacteriano perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas de tercera generación, fue diseñado en los años 80's para su uso exclusivo en medicina veterinaria (Otero *et al.*, 2001).

2.10 Propiedades fisicoquímicas de la enrofloxacin

La enrofloxacin tiene un bajo peso molecular, lo que favorece su penetración a tisular (Otero *et al.*, 2001). Se encuentra en forma de cristal y su color es amarillo pálido. Su punto de fusión oscila entre los 219-221 °C y es ligeramente soluble en agua y logra su máxima solubilidad a un pH de 5.02. Se debe proteger de la luz solar y no congelar. Se comporta como zwitterión y puede encontrarse en 4 formas: 1- catión ácido, 2- neutro no ionizado, 3- zwitterión intermedio, y 4- ion básico, con base al pH en el que se encuentre. Se inactiva poco en presencia de suero y otros fluidos orgánicos (Sumano *et al.*, 2015).

2.11 Mecanismo de acción de las fluorquinolonas

El principal mecanismo de acción de las quinolonas es la inhibición de la DNA girasa, una enzima bacteriana involucrada en la mayoría de los procesos biológicos que comprometen al DNA, tales como la transcripción, recombinación, replicación y reparación del mismo (Otero *et al.*, 2001). Actúa directamente inhibiendo el efecto de volver lineal el ADN y sobre la separación de la doble hélice, por bloqueo de la

torsión negativa que sufre este ADN bacteriano por la acción de la topoisomerasa IV y ADN girasa, que son esenciales para la replicación bacteriana la inhibición de este proceso bloquea múltiples funciones celulares, muchas de ellas vitales para la bacteria.

Los efectos de la enrofloxacin como inhibidora metabólica, como destructora del material genético y de la misma ADN girasa, son dependientes de la concentración. Por eso, es esencial a nivel clínico lograr la mayor concentración posible y con ello se abaten las posibilidades de que se recuperen las bacterias mutantes y se seleccionen, generando poblaciones resistentes (Sumano *et al.*, 2015).

Las topoisomerasas se encuentran también en organismos eucariotas, desde en las levaduras hasta en los seres humanos. La topoisomerasa tipo II eucariota difiere estructuralmente de la bacteriana y, si bien hace cortes al DNA, no produce superenrollamiento negativo. Se ha demostrado que esta topoisomerasa eucariota tiene una secuencia parcial de aminoácidos homóloga a la enzima bacteriana, que podría representar un sitio de acción para las quinolonas. Se pensaba que las quinolonas eran incapaces de inducir daño genético en células de mamíferos, debido a una afinidad de muy inferior por la topoisomerasa tipo II de los mamíferos. Sin embargo, estudios recientes han producido evidencias de una posible genotoxicidad de las quinolonas sobre sistemas eucariotas (Otero *et al.*, 2001).

2.12 Actividad antibacteriana de las fluorquinolonas

La enrofloxacin actúa como un antibacteriano concentración-dependiente para las bacterias G (+), G (-) y *Mycoplasma* sp. Sin embargo, se ha detectado un efecto tiempo dependiente contra bacterias G(+), aun así se debe contemplar su efecto óptimo a concentraciones elevadas ($C_{max} > 10-12$ veces la CMI) y durante el mayor tiempo posible entre dosis ($AUC/CMI \geq 125$) (Sumano *et al.*, 2015). Al actuar específicamente sobre el DNA, las fluorquinolonas son rápidamente bactericidas,

activas a muy bajas concentraciones, y muestran efecto post antibiótico (Otero *et al.*, 2001).

En un estudio hecho por Blondeau *et al* (2012) donde realizaron una nueva medición in vitro llamada concentración de prevención de mutantes (MPC), que define la concentración de fármaco antimicrobiano necesaria para bloquear el crecimiento de las células menos susceptibles presentes en poblaciones bacterianas de alta densidad tales como las observadas en infecciones agudas. Estos autores encontraron que la MIC90 / MPC90 para la enrofloxacin, contra 285 aislados clínicos de *M. haemolytica* fue de 0.125/1.

Aún en concentraciones por debajo de la CMI las fluorquinolonas inhiben la división celular, reducen la tasa de crecimiento bacteriano, inducen cambios en la ultraestructura de la superficie bacteriana que previenen la colonización a tejidos específicos, interfieren en la expresión de factores de virulencia y aumentan la susceptibilidad de algunos microorganismos a la fagocitosis.

La enrofloxacin penetra y alcanza concentraciones tisulares muy elevadas tanto en células fagocíticas como en las no fagocíticas (Sumano *et al.*, 2015). Esta penetración celular no está relacionada con la liposolubilidad, y aunque en general la fluorquinolonas tienen una pobre penetración a SNC, la enrofloxacin tiene una moderada penetración en presencia de inflamación (Turnidge, 1999).

Tanto la enrofloxacin como la ciprofloxacina tienen un espectro de acción similar. Estos agentes tienen buena actividad contra muchos bacilos y cocos gramnegativos, incluyendo a la mayoría de las especies y cepas de *Aeromonas* spp *Pseudomonas aeruginosa*, *Kebsiella*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Campilobacter*, *Shígella*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Haemophilus*, *Proteus*, *Yersinia*, *Serratia* y *Vibrio*.

De las quinolonas disponibles en el comercio en la actualidad, la ciprofloxacina y la enrofloxacin tienen la concentración inhibitoria mínima más baja para la mayoría de estos patógenos. Otros microorganismos que suelen ser susceptibles

son *Brucella* spp, *Chlamydia trachomatis*, *Staphylococcus* spp. (incluyendo las cepas productoras de penicilinas y las resistentes a la meticilina), *Mycoplasma* y *Mycobacterium* spp. (Plumb, 2010).

2.13 Farmacocinética de la enrofloxacin

La enrofloxacin muestra las características farmacológicas de las fluoroquinolonas que tienen un amplio espectro de acción, buena distribución en los tejidos y un proceso de liberación lenta, que muestra tiempos de vida media relativamente largos, lo que garantiza un intervalo más largo entre las dosis, permitiendo una administración dosis/día única (Lode *et al.*, 1998). Esta, es metabolizada a ciprofloxacina tanto en mamíferos, como en no mamíferos, lo cual contribuye a la actividad antimicrobiana de la enrofloxacin.

Es importante señalar que los parámetros farmacocinéticos después de la administración de antibacterianos en acuicultura muestran gran variación pues dependen de la especie de pez, peso, edad, dosis, frecuencia y vía de administración del fármaco, temperatura del agua durante el estudio, tipo de alimento si esta es la vía de administración, etc. Por ejemplo, la variación de la temperatura de 15°C a 10°C en carpas (*Cyprinus carpio*) redujo la biodisponibilidad de la enrofloxacin administrada con el alimento (10 mg/kg) de 48.8 al 24.0 % (Udomkusonsri *et al.*, 2007).

Por lo tanto, la comprensión fundamental de varias disciplinas, incluyendo la fisiología GI, la farmacocinética, la farmacodinámica y el diseño de la formulación, es esencial para lograr un enfoque sistemático para el desarrollo exitoso de una forma oral de dosificación farmacéutica (Chien, 2009) y llegar en óptimas condiciones al sitio de acción.

Además, el procedimiento de medicación en acuicultura tiene algunas peculiaridades en comparación con otros sistemas de producción animal. A diferencia de los animales terrestres, la medicación para la acuicultura se produce

principalmente por vía oral mediante el uso de pienso que contiene los fármacos incorporados (Noga, 2010). Esto es muy importante y debe ser considerado durante las condiciones de la medicación debido al riesgo de lixiviación de drogas del alimento al agua, lo que podría comprometer la efectividad de la medicación (Fais *et al.*, 2017). Esto presupone diversos ensayos que permitan dicha liberación estratégica en varias partes del tracto digestivo de la tilapia. Todo esto, hace plantearse cierta incertidumbre en relación con el alcance del nivel de dosis deseado.

La liberación del fármaco es un paso crucial y limitante para su biodisponibilidad por vía oral, particularmente para fármacos con baja solubilidad gastrointestinal y alta permeabilidad. Al mejorar el perfil de liberación de estos fármacos, es posible mejorar su biodisponibilidad (F) y reducir los efectos secundarios (Sarmiento y Costa, 2007). Adicionalmente, es factible incluir parte de la dosis en ciclodextrinas para promover su absorción y su hidrosolubilidad al tiempo en que se reduce aún más su sabor.

La farmacocinética de la enrofloxacin ha sido estudiada en diversas especies acuícolas como el salmón del Atlántico, trucha arcoíris, pacú y carpa (Bowser *et al.*, 1992; Hsu *et al.*, 1994; Lewbart *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2013). La biodisponibilidad (F) reportada es de 54 a 78% en los peces teleósteos estudiados (Della Rocca *et al.*, 2004; Koc *et al.*, 2009). El tiempo que tarda en alcanzar la máxima concentración (T_{max}), varía ampliamente en cada especie con rangos de 0.25 a 36 h (Lewbart *et al.*, 2005; Udomkusonsri *et al.*, 2007). Los compuestos extraños al organismo tienden a metabolizarse en dos fases. Las reacciones de fase I conducen a productos de oxidación, reducción e hidrólisis. Las reacciones de fase II conducen a productos sintéticos o de conjugación que son relativamente polares y, por lo tanto, se excretan más fácilmente por el riñón y, en algunos casos, por el hígado a través de la bilis. Dentro de este marco general, sin embargo, hay grandes variaciones de especies, estas las reacciones de Fase I son muy comunes y, a menudo, parecen ser impredecibles. Las reacciones de fase II son mucho más

limitadas que las reacciones de fase I, y es posible identificar patrones de estas (Bischoff, 1986), muy probablemente, por esta razón, existen diferencias farmacocinéticas altamente significativas entre especies de peces.

Con respecto a la calidad del agua, las quinolonas tienen baja F en aguas marinas, en comparación al agua dulce. Esto puede ser atribuido a que los peces de aguas marinas, por osmorregulación, tragan grandes cantidades de agua en comparación a los de agua dulce, lo que resulta en un aumento en cationes y pH en el estómago. Bajo esas condiciones, las quinolonas tienen un alto grado de ionización y forman complejos con estos cationes que reducen su F en orden de 2 a 5 veces (Andriole, 1993).

La temperatura, por otro lado, tiene un importante efecto en la farmacocinética de los fármacos en peces, y las fluorquinolonas no son la excepción (Bowser *et al.*, 1992). Por ejemplo, Stoffregen *et al.* (1997) reportó una vida media de 105.1 h y una C_{max} de 0.2741 µg/mL a 9.7 °C de temperatura, en contraste con Martinsen *et al.* (1993) que obtuvo 34.2 h de vida media y una C_{max} de 1.32 µg/mL a 10.2 °C, ambos en salmón del atlántico, vía oral a una dosis de 10 mg/Kg de pez.

. No obstante se han hecho estudios para definir la farmacocinética de la enrofloxacin en tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Teles *et al.*, 2016). En el Cuadro 1 se presentan las variables farmacocinéticas que se informaron tanto para enrofloxacin como para su metabolito, la ciprofloxacina.

Cuadro 1. Parámetros farmacocinéticos en el plasma y músculo después de una dosis oral única en alimento medicado de 10 mg/Kg de enrofloxacin en tilapia (Teles *et al.*, 2016).

Parámetro	Plasma		Músculo	
	CIP	ENR	CIP	ENR
AUC ₀₋₂₄ (h·µg/mL)	0.53	38.61	2.96	60.19
AUC _{0-∞} (h·µg/mL)	0.92	39.74	3.10	62.79
C _{max(obs)} (µg/mL)	0.015 ± 0.005	1.24 ± 0.37	0.063 ± 0.016	2.17 ± 0.74
T _{1/2 Ke} (h)	36.89	19.36	18.83	50.03
T _{max (obs)} (h)	8	8	24	8
K _e (h ⁻¹)	0.02	0.04	0.04	0.01
K _a (h ⁻¹)	-	0.28	0.48	0.5

(n=8); CIP=Ciprofloxacina; ENR= Enrofloxacin; AUC= Área bajo la curva; C_{max (obs)}= Concentración máxima observada; T_{1/2 Ke}= Tiempo de vida media; T_{max (obs)}= Tiempo observado a la máxima concentración; K_e= Constante de eliminación; K_a= constante de absorción.

Esto nos indica que la enrofloxacin sí se absorbe vía oral en la tilapia y aparentemente tiene buena distribución a músculo, con una vida media bastante prolongada, tanto en plasma, como en músculo, aunque faltaría comprobar si la enro-C, al igual que en otras especies en las que se ha administrado, provee parámetros farmacocinéticos significativamente superiores a la enro base.

2.14 Enrofloxacin recristalizada

En ciencia de los materiales y mineralogía, el polimorfismo es la capacidad de un material sólido de existir en más de una forma o estructura cristalina. Esta forma cristalina en un fármaco le ofrece la ventaja de alta pureza, y estabilidad física y/o química (Baghel *et al.*, 2016).

Por el momento se encuentra en auge el rediseño farmacéutico de moléculas que han existido en el mercado por muchos años. Se han generado nuevas formulaciones que permiten incluso una liberación controlada o sostenida mediante la manipulación de vehículos (Kawakami, 2012).

Una nueva formulación de enrofloxacin solvato recristalizada, de nombre enrofloxacin dihidrato clorhidrato (enro-C) (Patente 472715; Instituto Mexicano de la Protección Industrial, México), ha sido desarrollada (Miranda-Calderón *et al.*, 2014; Gutierrez *et al.*, 2015), y se sabe que es mucho más soluble en agua que la enrofloxacin base. Además, el sabor que posee es menos amargo, presenta mayor biodisponibilidad en hámsters (Carrascosa *et al.*, 2017), pollos de engorda (Gutierrez *et al.*, 2015) y perros (Sumano *et al.*, 2018). Esta no ha sido estudiada en especies acuícolas.

3 Justificación

En estudios previos en aves (Gutierrez *et al.*, 2015), hámsters (Carrascosa *et al.*, 2017) y perros (Sumano *et al.*, 2018), se ha demostrado que la biodisponibilidad de la nueva forma re-cristalizada de enrofloxacin (enro-C) es superior a las presentaciones existentes comerciales a la misma dosis y vía de administración, abriendo las posibilidades de tratamientos más eficaces. Aunado a que existen pocos estudios de farmacocinética en peces y que es una necesidad que se prueben productos novedosos para el tratamiento de las enfermedades bacterianas que atacan a los peces y que permitan obtener una base sólida para la recomendación, o no recomendación de este producto, con base en sus parámetros farmacocinéticos.

Además, considerando que la vía de aplicación que menos estrés causa a los peces y es una forma fácil y barata de medicar a los mismos, y que se desconoce si la característica de la enro-C de alta hidrosolubilidad es una desventaja al cubrir los *pélets* comerciales con una mezcla de gelatina y fármaco, o adicionando el mismo antes de la conformación de los *pélets*, es justificable que se ofrezca de estas dos formas, para recomendar la mejor técnica para su integración al alimento.

4 Hipótesis

Ha₁: La enro-C, al igual que en otras especies, presenta mejores parámetros farmacocinéticos, en particular la AUC y la C_{max}, que la enrofloxacin base.

Ho₁: La enro-C presenta menores o iguales parámetros farmacocinéticos.

Ha₂: Los parámetros farmacocinéticos de la enro-C integrada al alimento antes de peletizar (T1) son superiores a los parámetros farmacocinéticos de la enro-C integrada al alimento cubierto con una mezcla de fármaco-gelatina (T2).

Ho₂: Los parámetros farmacocinéticos de ambos tratamientos son iguales.

5 Objetivo

El objetivo de este estudio es realizar la farmacocinética de la nueva forma recristalizada de enrofloxacin (enro-C) en tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*) a dosis de 10 mg/kg, por vía oral a través del alimento medicado, comparando dos formas de integración de la enro-C, siendo T1= alimento antes de peletizar y T2= integrada al alimento comercial prefabricado cubierto con una mezcla de fármaco-gelatina; ambos con una concentración final de 3000 mg/Kg de alimento y una dosis única de 10 mg/Kg de pez.

6 Material y métodos

La fase experimental se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Campus Sauzal, ubicada en Ensenada, Baja California. El análisis para determinar la cantidad de antibiótico, tanto en el plasma obtenido, como en el alimento de cada tratamiento se llevó a cabo en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), en el Campus de Ciudad Universitaria, ubicado en la Ciudad de México (CDMX). El análisis estadístico de los resultados obtenidos se procesó en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Campus Xochimilco, CDMX.

Los peces en etapa de adaptación se mantuvieron bajo condiciones de calidad de agua de acuerdo con sus requerimientos óptimos con alimentación del 2% de su peso al día divididos en tres raciones. Los procedimientos empleados fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética correspondiente en la UNAM, basados en la norma oficial mexicana NOM-62-ZOO-1999³.

Se preparó un lote de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) como se informó en el nombre de la Patente: "Complejo recristalizado de hidrocloreto de enrofloxacin dihidratado, y método para obtenerlo". Presentado en la Ciudad de México el 11 de diciembre de 2013 ante el Instituto Mexicano de Protección Industrial (INPI) (Ref. No: MX / a / 2013/014605). De acuerdo con esta metodología, se obtiene un rendimiento del 95% de enro-C.

Para la preparación de los tratamientos, se añadió Enro-C a los gránulos de alimentos de dos maneras: el primer tratamiento (T1) se obtuvo recubriendo 1 kg de alimento granulado (Nutripec 3.5 mm, Purina®, Ciudad de México), con una suspensión de gelatina al 10% de enro-C en una tasa de 3.000 mg en 20 ml a 40°C.

³ Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Acuicultura (SAGARPA). Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), [citada el 14 mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>

La mezcla se hizo manualmente en un balde de acero inoxidable. Luego, los gránulos se secaron al aire a 50 ° C.

El segundo tratamiento (T2) utilizó el mismo alimento comercial con 32% de proteína en polvo, posteriormente, se mezclaron 3000 mg de enro-C por kg de alimento con la ayuda de un mezclador industrial, seguido de esto, se humidificó para permitir la extrusión con un acero inoxidable seco máquina extrusora de alimentación (Azeus Fish Feed Machine, Zhengzhou, China). Entonces, los gránulos se secaron a 50 ° C. Se obtuvieron gránulos medicados de 3.5 por 3.5 mm en ambos casos. Se determinaron las concentraciones finales de enrofloxacin de enro-C en los alimentos granulados en ambas formas de tratamiento (T1 y T2), utilizando la metodología a la que se hace referencia en los párrafos siguientes.

El experimento se llevó a cabo en tres fases. Para la primera fase se obtuvieron 56 tilapias clínicamente sanas (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*) que pesaban 155.9 ± 25.8 g de una piscifactoría comercial ubicada cerca de la unidad experimental de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). A los peces se les dio un período de adaptación de dos semanas y se les alimentaron con *pélets* Nutripec de 3,5 mm (Purina®, CDMX).

Después, fueron pesados (Figura 2) y asignados aleatoriamente a un sistema de recirculación con 4 tanques de fibra de vidrio de 450 L (Figura 3) para un total de 14 peces por tanque, de igual manera se aleatorizaron los tratamientos para cada tina. Se utilizó agua dulce con suministro de aire continuo. La calidad del agua se analizó dos veces al día, asegurando que el pH se mantuviera entre 6 y 8,5, con concentraciones de oxígeno entre 4-8 mg / L y con amonio disuelto <1 mg / L (Anexo 2, Calidad de agua). Luego se llevaron a cabo un segundo y tercer períodos, con condiciones similares, para completar 6 repeticiones de cada tratamiento.

En los tres períodos, las tilapias fueron sometidas a ayuno 17 h antes de ofrecer los tratamientos con los alimentos medicados. Luego, la siguiente ración no medicada se administró 4 horas después del procedimiento para evitar interferencia

en la absorción. Se administró una dosis calculada de 10 mg / kg en ambos grupos en función del consumo de alimentos (Cuadro 2) y no se observó pérdida visible de alimentos.

Cuadro 2. Cálculo de dosis de enro-C adicionada al *pélet* (3000 mg/kg de alimento) para cada tina (Sujeto)

Sujeto	Peso promedio + 3g	Dosis enro-C	Cantidad alimento	Tratamiento
1	1885.8	18.8	3.1	T1
2	2435.3	24.3	4.1	T2
3	1801.1	18.0	3.0	T1
4	2346.4	23.4	3.9	T2
5	2039.52	20.3	3.4	T1
6	2543.1	25.4	4.2	T1
7	1955.24	19.5	3.3	T2
8	2565.5	25.6	4.3	T2
9	2348.5	23.4	3.9	T2
10	3310.16	33.1	5.5	T1
11	3504.62	35.0	5.8	T1
12	2658.32	26.5	4.4	T2

Las dosis fueron calculadas aumentando al peso promedio 3 gramos por cada uno de los peces por compensación de crecimiento durante el período de aclimatación

Las tilapias se anestesiaron con eugenol (100 mg / L) (Rucinke *et al.*, 2016). Se obtuvieron muestras de sangre (1 ml / muestra) de la vena caudal usando jeringas de calibre 25 y 3 ml, según lo descrito por Noga (2010). Después de recolectar las muestras basales en peces no medicados, se obtuvieron muestras de sangre en serie a las 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 y 96 h, con asistencia técnica para garantizar el tiempo de muestreo adecuado y en cada toma de muestra se anotó en el Formato 1 (Desarrollo de estudio). La sangre se colocó inmediatamente en tubos de ensayo que contenían 56 USP IU de heparina (Vacutainer®, Becton Dickinson, Ciudad de México) y se centrifugaron a 1500 xg durante 15 minutos. El plasma se transfirió luego a tubos Eppendorf (Figura 4), se etiquetó y almacenó a -20 ° C para su posterior análisis, todo este último procedimiento registrado en el Formato 3 (Separación de muestras).

Las concentraciones de enrofloxacin en plasma se determinaron por triplicado mediante el análisis de difusión de agar microbiológico según lo descrito por Bennett et al. (1966) y modificado por Souza (2004) para enrofloxacin y utilizando *Escherichia coli* ATCC-25922 como microorganismo de prueba y 0.1 ml de plasma de pescado por muestra inoculado en agar TSA (Figura 5). La linealidad se demostró con regresiones de cada uno de los sujetos por haberse hecho los cultivos en diferentes días, por cuestión de tiempo y espacio de la estufa de trabajo, se estandarizaron 6 soluciones con concentraciones entre 0.15 y 10.0 µg/mL, obteniendo coeficientes de correlación de 0.97 a 0.99 (Apéndice 2, Gráficas de linealidad).



Figura 2. Momento de pesaje antes de aleatorización de tilapia en tina de sistema de recirculación

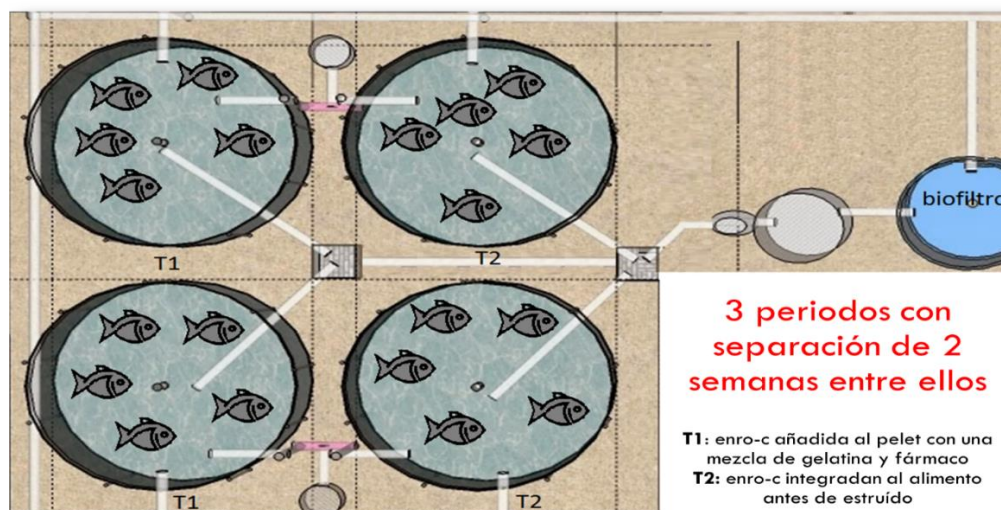


Figura 3. Esquema del sistema de recirculación utilizado para el experimento.

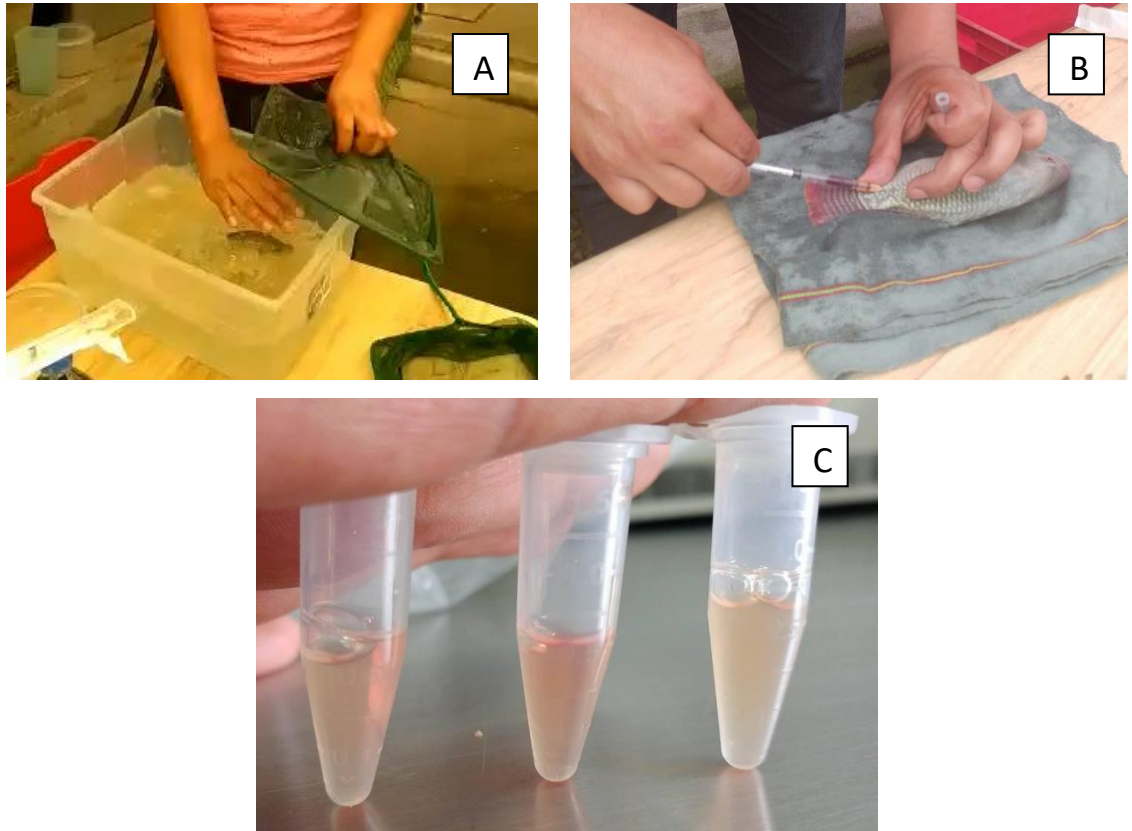


Figura 4. Procedimiento para la obtención de plasma sanguíneo en tilapia. Momento de anestesia del pez (A); toma de muestra de sangre de la vena caudal (B); plasma obtenido después de la centrifugación de la sangre (C).



Figura 5. Inoculación del plasma en agar TSA.

La determinación de enro-C de la alimentación granulada se llevó a cabo mediante la extracción de enrofloxacin, tal como lo sugirieron Idowu y Peggins (2004). Brevemente, se molieron 5 g de alimentación granulada y se añadieron 5 ml de cloruro de metileno y 3 ml de agua destilada. La muestra se centrifugó luego durante 10 minutos a 10.000 xg. El material resultante se agitó con vórtex durante 2 minutos y se filtró al vacío utilizando papel de filtro de flujo medio de grado 1:11 µm (Whatman / Merck, Ciudad de México). La fase acuosa se descartó y la fase orgánica se evaporó. El residuo se reconstituyó en 5 ml de acetonitrilo: metanol: agua (17:3:80) y la muestra se usó para la determinación de la actividad/concentración de enrofloxacin como se detalló anteriormente.

El modelado PK compartimental, y no compartimental se realizó con el software PKAnalyst (MicroMath Scientific Software, St Louis Missouri, USA) los parámetros farmacocinéticos obtenidos fueron casi idénticos para ambos. Eligiendo el mejor modelo ($r \geq 0.99$) para cada grupo utilizando como criterio la suma de cuadrados. El modelo 3 fue el que ajustó más a la enro-C, su fórmula general se muestra en la Figura 6:

$$\text{concentration (time)} = \frac{\text{dose} \times K_{AE} \times \text{time}}{\text{volume}} e^{-K_{AE} \times \text{time}}$$

Figura 6. Fórmula para obtener la concentración de la enro-C a un tiempo “x”.

Donde $K_{AE}=K_{AB}=K_{elim}$. Se obtuvieron los siguientes parámetros: AUC_{0-24} = área bajo la curva durante 24 h; MRT = tiempo de residencia promedio; C_{MAX} : concentración sérica máxima; T_{MAX} = tiempo para llegar a C_{MAX} .

Luego, se calcularon las relaciones farmacocinéticas/farmacodinámicas clave (PK/PD) como funciones de la concentración bactericida sérica óptima para T1 y T2, es decir, $C_{MAX} / MIC_{90} = 10$ y $AUC_{0-24} / MIC_{90} \geq 125$. Para esto, los valores de MIC_{90} arbitrarios derivados de se emplearon los datos disponibles en la literatura formal: *Pseudomonas fluorescens* 0.1 µg/ml, *Francisella* spp. 0.16 µg/ml,

Aeromonas spp. 0.25 µg/ml y *Clostridium perfringens* 0.78 µg/ml (Bowser y Babish, 1991; Inglis y Richards, 1991; Zakiet *al.*, 2011).

Los resultados varían entre el PKAnalyst y JMP, pues en el primero ajusta los modelos farmacocinéticos probables, de acuerdo con el tipo de cinética del propio fármaco, los cuales tanto compartimental como no compartimental resultaron prácticamente indistinguibles, y trata de explicar cómo se comportaría en una población, además que proporciona los valores de Cmax, AUC, vida media y tiempo de retención.

El programa estadístico JMP trabaja con los datos crudos y no calcula los datos farmacocinéticos, pero puede hacer comparaciones en los tratamientos, para saber si estos son estadísticamente diferentes. Para el análisis estadístico se utilizó un modelo lineal mixto, donde la variable de respuesta fue la concentración, el efecto de los peces se incluyó como aleatorio, los efectos fijos del tiempo y tratamiento. Los resultados se presentan con estadísticas descriptivas y para las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo mediante ANDEVA, utilizando el software JMP (JMP, SAS Institute Inc., Versión 14-2017, SAS Campus Drive Cary, NC, EE. UU.). Se asumieron diferencias estadísticamente significativas a usando $\alpha=0.05$. El modelo que se utilizó para dichos cálculos fue el siguiente:

$$\text{Concentración de enro-C} = \mu + \text{Pez}_i + \text{Trat}_j + \text{Tiempo}_k + \text{E}_{ijkl}$$

μ es la media general

Pez_i es el *i*-ésimo efecto aleatorio de pez

Trat_j es el *j*-ésimo efecto de tratamiento

Tiempo_k es el *k*-ésimo efecto de tiempo de medición

E_{ijkl} es el residuo o error experimental (efecto aleatorio).

7 Resultados

Las concentraciones de enrofloxacin en tilapia después de las dos formas de dosificación de enro-C en alimento medicado del programa PK Analyst, se representan en la Figura 9. El Cuadro 3 presenta las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos \pm su desviación estándar obtenidos por análisis no compartimental de la enro-C en plasma. Las diferencias con el análisis compartimental fueron insignificantes. También resultó estadísticamente significativo el análisis de varianza entre tratamientos con el programa JMP, y los resultados se presentan en la Figuras 7, Cuadros 5, 6 y 7. El Cuadro 3 también presenta las proporciones C_{MAX}/MIC_{90} y AUC_{0-24}/MIC_{90} en función de la concentración bactericida sérica óptima para T1 y T2. Para este propósito se utilizaron valores arbitrarios MIC_{90} derivados de datos disponibles en la literatura formal: *Aeromonas salmonicida*, 0.16 $\mu\text{g/ml}$ y *Vibrio spp* 0.08 $\mu\text{g/ml}$ (Bowser y Babish 1991).

Las concentraciones alimentarias de enrofloxacin fueron estadísticamente indistinguibles tanto si se incorporaron como en T1 o en T2 ($P>0.05$).

Cuadro 3. Medias de parámetros farmacocinéticos \pm 1 DE de enro-C en tilapia, después de una dosis única de 10 mg/kg a través de alimento medicado, basado en el consumo de alimento. El T1 con pélets recubiertos con una mezcla de fármaco/gelatina (3000 mg de enro-C/Kg de alimento), y el T2 con el fármaco mezclado antes de peletizar también a 3000 mg de enro-C por kilogramo de alimento.

Parámetro	Tratamiento	
	1	2
AUC_{0-24} ($\mu\text{g/mL/h}$)	25.41 \pm 24	57.91 \pm 30
C_{MAX} ($\mu\text{g/mL}$)	1.35 \pm 0.55	1.92 \pm 0.26
$T_{1/2\beta}$ (h)	5.8 \pm 3.4	7.54 \pm 6.68
T_{MAX} (h)	6.13 \pm 3.72	6.53 \pm 4.76
MRT	14.20 \pm 7.34	24.43 \pm 21.17
$C_{MAX}/MIC_{90, 0.16}\dagger$	8.43	12
$AUC_{0-24}/MIC_{90, 0.16}\dagger$	159	362
$C_{MAX}/MIC_{90, 0.08}\ddagger$	17	24
$AUC_{0-24}/MIC_{90, 0.08}\ddagger$	318	724

n = 3 repeticiones para cada una de las 5 muestras por tiempo; AUC_{0-24} = área bajo la curva de la concentración de fármaco en plasma vs. tiempo de muestreo; C_{max} = concentración máxima; $T_{1/2\beta}$ = tiempo de vida media de eliminación; T_{max} = tiempo en alcanzar la máxima concentración; MRT= tiempo medio de retención (tiempo aproximado que permanece la molécula en el cuerpo); \dagger *Aeromonas salmonicida*; \ddagger *Vibrio spp*

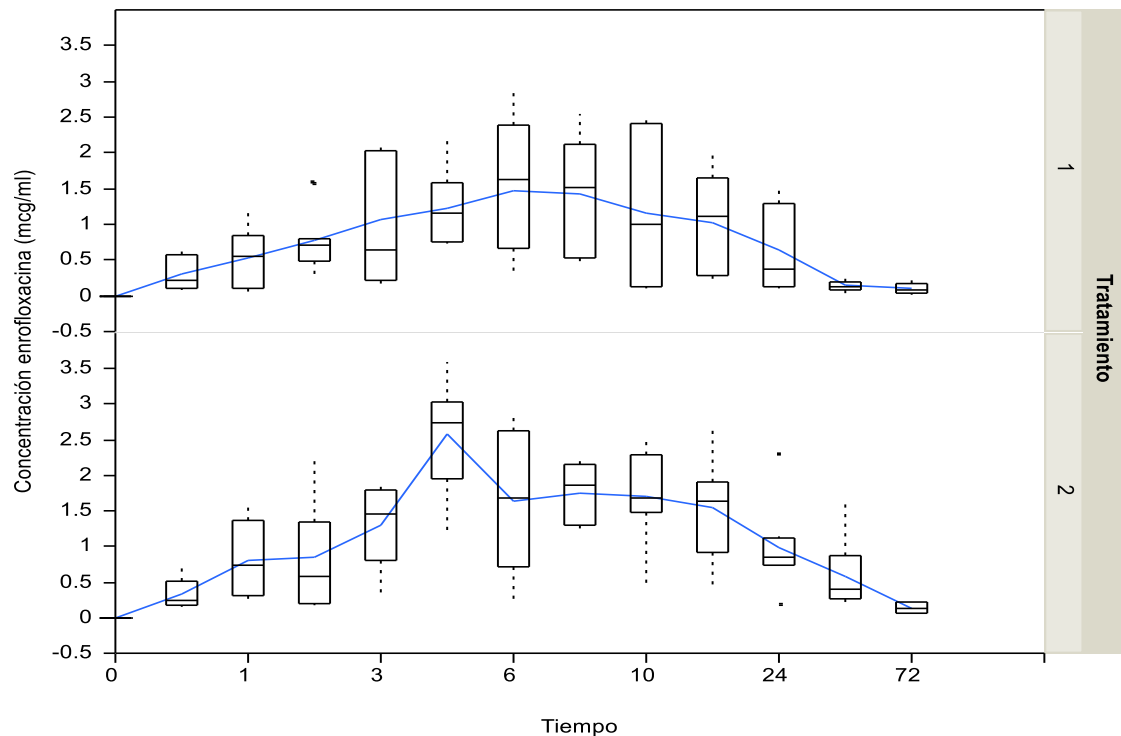


Figura 7 . Medias \pm ee de las concentraciones plasmáticas de enrofloxacin obtenidas a partir de datos arrojados por el programa JMP, en tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*) después de la administración de enro-C con dos distintas formas de adición del fármaco en alimento: T1, cubriendo los pélets prefabricados con una mezcla de gelatina/fármaco (3000 mg/kg de alimento) (A) y T2, incorporando el fármaco al alimento antes de realizar el peletizado, también a 3000 mg/Kg de alimento (B). Las dosis finales para ambos tratamientos fueron calculadas a 10 mg/Kg con base en el consumo diario de alimento.

Cuadro 4 Prueba de efectos fijos

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Grados de libertad del denominador	Razón F	Prob > F
Tratamiento	1	1	110	10.3102	0.0017*
tiempo	12	12	110.8	8.3788	<.0001*

Resumen del ajuste

R cuadrado	0.930895
R cuadrado ajustado	0.926596
Raíz del error cuadrático medio	0.307035
Media de respuesta	0.955874
Observaciones (o suma de pesos)	223

Cuadro 5 Estimaciones de componentes de varianza

Efecto aleatorio	Razón de varianza	Componente de varianza	Error estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%	Valor P de Wald	Porcentaje del total
pez	3.324843	0.3134343	0.0498538	0.2157226	0.4111461	<.0001*	76.878
Residuo		0.0942704	0.0131828	0.0729585	0.1265576		23.122
Total		0.4077047	0.0498403	0.3252729	0.5261695		100.000

Cuadro 6 Detalles de los efectos del tratamiento (medias de mínimos cuadrados)

Nivel	Media de mínimos cuadrados	Error estándar
1	0.7439657	0.07103295
2	1.1031105	0.08670920

Cuadro 7 Prueba t de Student de las diferencias de medias de mínimos cuadrados

Media[i]-media[j] Error estándar de la diferencia Diferencia del límite de control inferior Diferencia del límite de control superior	1	2
1	0 0 0 0	-0.3591 0.11185 -0.5808 -0.1375
2	0.35914 0.11185 0.13748 0.58081	0 0 0 0

Nivel	Media de mínimos cuadrados
2 A	1.1031105
1 B	0.7439657

Media de mínimos cuadrados[i] Por Media de mínimos cuadrados[j]; $\alpha=0.050$

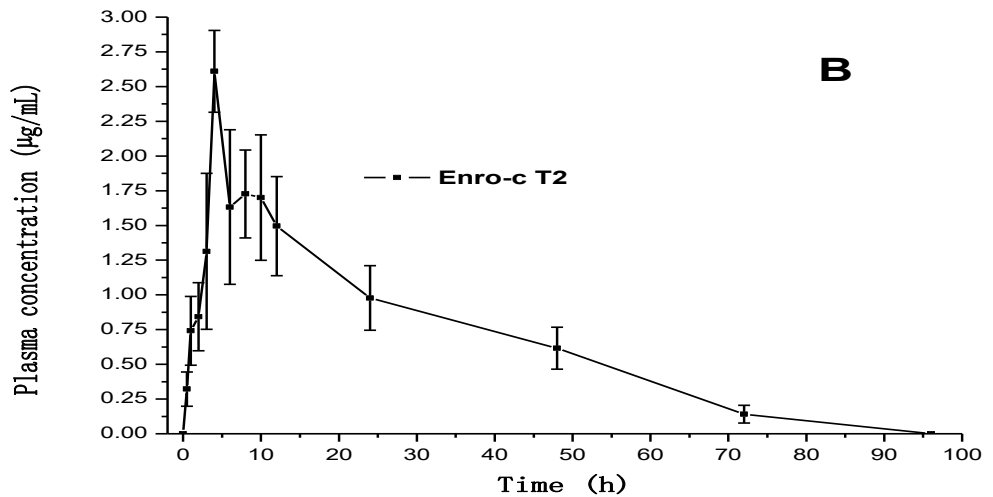
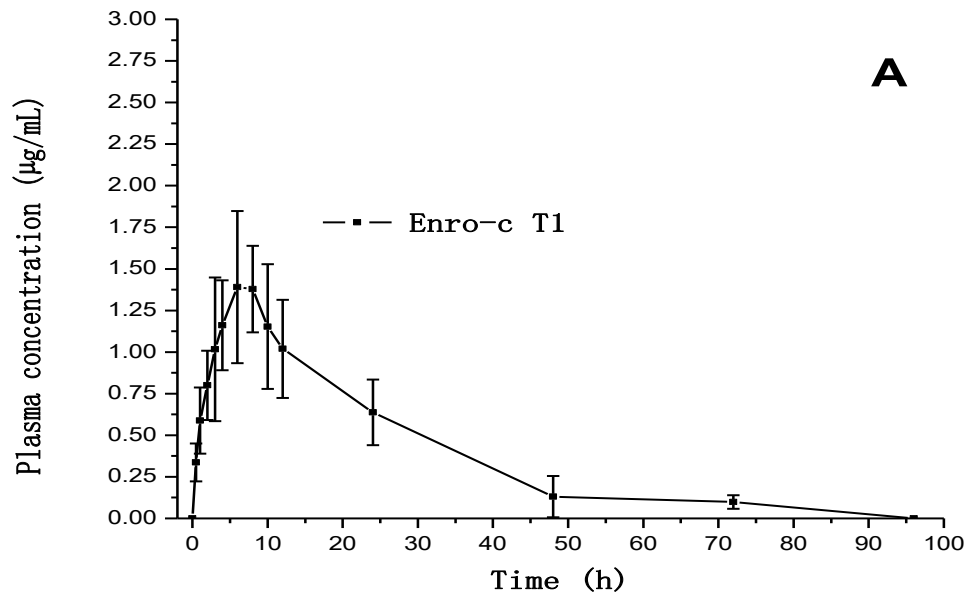


Figura 8. Medias \pm ee de las concentraciones plasmáticas de enrofloxacin, en tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*) después de la administración de enro-C con dos distintas formas de adición del fármaco en alimento: T1, cubriendo los *pélets* prefabricados con una mezcla de gelatina/fármaco (3000 mg/kg de alimento) (A) y T2, incorporando el fármaco al alimento antes de realizar el peletizado, también a 3000 mg/Kg de alimento (B). Las dosis finales para ambos tratamientos fueron calculadas a 10 mg/Kg con base en el consumo diario de alimento.

8 Discusión

Los resultados indican que cuando se usa la dosis de enro-C de 10 mg/kg integrada al alimento antes de peletizar (T2), como en Teles (2016) para enrofloxacin base, la enro-C muestra valores más altos de enrofloxacin de C_{MAX} en plasma (1.92 $\mu\text{g/ml}$ para enro-C y 1.24 $\mu\text{g/ml}$ para enrofloxacin base) Cuadro 4. Aunque ambos estudios se realizaron en especies de tilapia, las condiciones experimentales difieren en muchos aspectos y las comparaciones de estos resultados pueden ser un tanto especulativas. Además, se ha demostrado que los parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración de fármacos antibacterianos en la acuicultura muestran grandes diferencias (Bowser y Babish, 1991; El-Sayed, 2006; Zaki *et al.*, 2011). Esto podría deberse al diseño de experimentos tan variados en los diferentes estudios publicados, además de todas las condiciones de los peces, los sistemas y diseño de fármacos.

Cuadro 8. Comparación con los resultados de Teles et al. (2016). Los tratamientos 1 y 2 alimento medicado con enro-C y el tratamiento de Teles et al. con alimento medicado con enrofloxacin base, los tres tratamientos a una dosis de 10 mg/kg de pez calculado con base en la ingesta diaria de alimento.

Parámetro	Tratamiento		Teles (2016)
	1	2	
AUC ₀₋₂₄ ($\mu\text{g/ml/h}$)	25.41 \pm 24	57.91 \pm 30	38.61
C _{MAX} ($\mu\text{g/ml}$)	1.35 \pm 0.55	1.92 \pm 0.26	1.24 \pm 0.37
T _{1/2β} (h)	5.8 \pm 3.4	7.54 \pm 6.68	19.36
T _{MAX} (h)	6.13 \pm 3.72	6.53 \pm 4.76	8
MRT	14.20 \pm 7.34	24.43 \pm 21.17	
C _{MAX} /MIC _{90, 0.16} †	8.43	12	7.75
AUC ₀₋₂₄ /MIC _{90, 0.16} †	159	362	246
C _{MAX} /MIC _{90, 0.08} ‡	17	24	15.5
AUC ₀₋₂₄ /MIC _{90, 0.08} ‡	318	724	482

n = 3 repeticiones para cada una de las 5 muestras por tiempo; AUC₀₋₂₄ = área bajo la curva de la concentración de fármaco en plasma vs. tiempo de muestreo; C_{max} = concentración máxima; T_{1/2 β} = tiempo de vida media de eliminación; T_{max} = tiempo en alcanzar la máxima concentración; MRT = tiempo medio de retención (tiempo aproximado que permanece la molécula en el cuerpo); † *Aeromonas salmonicida*; ‡ *Vibrio spp*

Con respecto a las posibles interacciones de enro-C con los constituyentes de la alimentación granulada y la lixiviación, se consideró más útil utilizar un método

bacteriológico para cuantificar la actividad/concentración de enro-C en comparación con otros métodos químicos, Küng *et al.* (1993) menciona que cuando existe un fármaco que se sufre biotransformación a otras moléculas, también microbiológicamente activas, tiene propiedades PK que difieren de la técnica de HPLC, pero proporciona información valiosa de las relaciones PK/PD que se asocian más fácilmente con la eficacia antibacteriana a diferencia de Teles (2016) que utilizó HPLC en sus cuantificaciones.

Fuera de protocolo, se realizó una prueba para obtener valores de HPLC con la técnica específica para enro-C desarrollada por Aldana y Gutiérrez (2013). Sin embargo esta se debe ajustar para plasma en tilapia, pues la recuperación fue baja (33%) con respecto a la reportada por los autores (70%), esto nos puede dar una visión errónea de lo que está sucediendo dentro del organismo, pues no es la primera vez que los resultados varían, en términos reales, entre el HPLC y el ensayo microbiológico, por ejemplo, McKellar *et al.* (1999) realizaron un estudio en el cual observaron diferencias significativas tanto en plasma como en secreción bronquial comparando estos dos métodos y concluyeron que los bioensayos miden la actividad microbiológica total de un antimicrobiano, que puede ser un predictor más preciso de la actividad PK/PD que la HPLC.

Evidentemente, con esta metodología, la actividad/concentración de enrofloxacin y su metabolito activo, la ciprofloxacina, se miden juntas. Sin embargo, debe notarse que la biotransformación de enrofloxacin a ciprofloxacina es mínima en la tilapia (1.3%), aparentemente debido a una actividad muy baja del citocromo P450 en la tilapia (Tang *et al.*, 2006; Teles *et al.*, 2016). Por lo tanto, es razonable afirmar que las actividades/concentraciones plasmáticas encontradas en este estudio reflejan el perfil de plasma versus tiempo de enro-C.

La dosis establecida en este estudio, basada en el consumo de alimentos, se calculó en 10 mg/kg y el fármaco se incorporó al alimento recubriendo los *pélets* prefabricados con gelatina preparada con enro-C (T1), o cuando la enro-C se añadió

a los ingredientes del alimento durante el proceso de peletización (T2). Este estudio muestra que se pueden obtener mejores parámetros PK con T2 en comparación con T1. Se ha informado una mayor biodisponibilidad de enro-C en comparación con la enrofloxacin estándar en hámsters (Carrascosa *et al.*, 2017), pollos (Gutierrez *et al.*, 2015) y perros (Sumano *et al.*, 2018). Sin embargo, no se sabía si la mayor condición de solubilidad en agua exhibida por enro-C lo haría más propenso a la lixiviación en un ambiente acuoso, y si esto sería una desventaja contra su derivado parental: enrofloxacin, que es más liposoluble (Gutierrez *et al.*, 2015).

Por otro lado, se sabe que el tránsito GI en la tilapia fluctúa entre 3 y 7.5 h (Riche *et al.*, 2004, Uscanga *et al.*, 2010), lo que deja un intervalo muy corto para absorberse y por ello la adición de un vehículo gastro-retentivo puede promover su absorción y con ello optimizar su biodisponibilidad y reducir la cantidad de enrofloxacin que no se absorbe que queda como elemento para impacto ambiental directo. Se propone entonces una micro-encapsulación con ácidos grasos que envuelvan el medicamento y no permitan su lixiviación antes de ser consumidos.

Por lo tanto, es importante ampliar la información obtenida en este estudio, con investigaciones PK en otras condiciones y sin duda en otras especies importantes para la acuicultura. Sin embargo, los valores de PK obtenidos para enro-C indican una farmacocinética favorable para tratar muchas infecciones bacterianas, como se muestra en el cuadro 2 para las relaciones C_{MAX}/MIC_{90} y AUC_{0-24}/MIC_{90} . Es decir, para bacterias sensibles como *Pseudomonas fluorescens*, *Francisella* sp y *Aeromonas* sp (MIC_{90} = 0.01 µg/ml a 0.16 µg/ml) (Bowser *et al.*, 1994), las relaciones C_{MAX}/MIC_{90} variarían de 8 a 192; mientras que las mismas proporciones para bacterias medianamente sensibles como *Aeromonas* sp y *Clostridium perfringens* (MIC_{90} = 0.25 µg / mL a 0.78 µg / mL) (Inglis y Richards, 1991; Zaki *et al.*, 2011), variarían de 2.46 a 7.68. De forma similar, con los valores de MIC_{90} y AUC_{0-24}/MIC_{90} referidos, las relaciones variarían de 158.81 a 5791 y de 32.57 a 231.64, respectivamente.

En cualquier caso, este estudio confirma la superioridad farmacocinética de T2 sobre T1. Esto puede deberse a la solubilidad en agua de enro-C. Es muy factible suponer que el contacto directo del agua con la superficie de los gránulos puede causar una mayor lixiviación del fármaco, antes de ser ingerido por los peces en T1.

A pesar de lo anterior, se pueden generar mejores preparaciones farmacéuticas para incorporar enro-C a la alimentación de los peces. Además, las condiciones de uso deben definirse dentro de los múltiples escenarios presentados por la acuicultura para limitar lo más posible un impacto ambiental negativo, como la generación de cepas de patógenos resistentes importantes tanto para la acuicultura como para la salud pública (Fais *et al.*, 2017).

En conclusión, dados los datos obtenidos en este estudio, es factible proponer que, si se requiere enrofloxacin para el tratamiento de una enfermedad bacteriana en tilapia, agregar enro-C al alimento antes de la granulación como en T2 parece ventajoso en cuanto a las variables PK y Relación PK/PD. No obstante, es necesario realizar estudios de impacto ambiental para evaluar la viabilidad del uso de enro-C en acuicultura.

9 Referencias:

- Aldana, M. y Gutiérrez, W. (2013) “Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar el contenido de ciprofloxacino y enrofloxacino en plasma sanguíneo y leche de vaca”. Tesis de licenciatura, CDMX. UNAM.
- Andriole, V. T. (1993) “The Future of the Quinolones.”, *Drugs*, 45(3), pp. 1–7.
- Andriole, V. T. (2005) “The Quinolones: Past, Present, and Future”, 41(Suppl 2), pp. 113–119.
- Austin, B. Austin, D. (2007) *Bacterial Fish Pathogens_ Disease of Farmed*. 4th ed. Editado por P. Dobbins. Chichester, UK: Springer.
- Badiola, M., Mendiola, D. y Bostock, J. (2012) “Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges”, *Aquacultural Engineering*. Elsevier B.V., 51, pp. 26–35. doi: 10.1016/j.aquaeng.2012.07.004.
- Baghel, S., Cathcart, H. y Reilly, N. J. O. (2016) “Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization , Solid-State Characterization , and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Ltd., 105(9), pp. 2527–2544. doi: 10.1016/j.xphs.2015.10.008.
- Bautista-Covarrubias, J. C. y Ruiz, J. M. (2011) “Calidad de agua para el cultivo de Tilapia en tanques de geomembrana”, *Revista Fuente*, 3(8).
- Benli, A. Ç. K., Köksal, G. y Özkul, A. (2008) “Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology”, *Chemosphere*, 72(9), pp. 1355–1358. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.04.037.

Bennett, J. V., Brodie, J. L., Benner, E. J., Kirby, W. M. (1966) "Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens.", *Applied microbiology*, 14(2), pp. 170–7.

Bischoff, K. (1986) "Physiological pharmacokinetics", *Bulletin of Mathematical Biology*, 48(3), pp. 309–322.

Blondeau, J. M., Borsos, S., Blondeau, L. D., Blondeau, B. J.J., Hesje, C. E. (2012) "Comparative minimum inhibitory and mutant prevention drug concentrations of enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin and tulathromycin against bovine clinical isolates of *Mannheimia haemolytica*", *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 160(1–2), pp. 85–90. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.05.006.

Bowser, P. R. Wooster, G. A., Stleger, J., Babish, J. G. (1992) "Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 15(1), pp. 62–71. doi: 10.1111/j.1365-2885.1992.tb00987.x.

Bowser, P. R. y Babish, J. G. (1991) "Clinical pharmacology and efficacy of fluoroquinolones in fish", *Annual Review of Fish Diseases*, 1(C), pp. 63–66. doi: 10.1016/0959-8030(91)90022-C.

Bowser, P. R., Wooster, G. A. y Hsu, H. M. (1994) "Laboratory efficacy of enrofloxacin for the control of *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout", *Journal of Aquatic Animal Health*, 6(4), pp. 288–291. doi: 10.1577/1548-8667(1994)006<0288:LEOEFT>2.3.CO;2.

Boyd, C. E. y Toker, C. S. (1998) *Pond aquaculture water quality management*. Stoneville, Mississippi.

Carrascosa, A., Gutierrez, L., De la Peña, A., Candanosa, I., Tapia, G., Sumano, H. (2017) "Efficacy of a New Recrystallized Enrofloxacin Hydrochloride-Dihydrate against Leptospirosis in a Hamster Model", *Antimicrob Agents Chemeoterp*, 61(11), pp. 1–10. doi: doi.org/10.1128/AAC.01285-17.

Chapman, F. A. (1992) "Culture of hybrid tilapia: a reference profile", *IFAS Extension University of Florida*, pp. 1–5.

Chien, Y. (2009) "Novel Drug Delivery Systems", en Swarbrick, J. (ed.) *Journal of Neuroscience Nursing*. 2nd ed. Chapel Hill, North Carolina, pp. 139–196. doi: 10.1097/JNN.0b013e318193458b.

Della Rocca, G., Di Salvo, A., Malvisi, J., Sello, M. (2004) "The disposition of enrofloxacin in seabream (*Sparus aurata* L.) after single intravenous injection or from medicated feed administration", *Aquaculture*, 232(1–4), pp. 53–62. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00455-1.

Done, H. Y. y Halden, R. U. (2015) "Reconnaissance of 47 antibiotics and associated microbial risks in seafood sold in the United States", *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V., 282, pp. 10–17. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.08.075.

Duis, K., Inglis, V. Beveridge, M. C. M., Hammer, C. (1995) "Leaching of four different antibacterials from oil and alginate coated fish feed pellets", *Aquaculture Research*, 26(8), pp. 549–556. doi: 10.1111/j.1365-2109.1995.tb00945.x.

E Souza, M. J., Bittencourt, C. F. y E Souza Filho, P. D. S. (2004) "Microbiological assay for enrofloxacin injection", *International Journal of Pharmaceutics*, 271(1–2), pp. 287–291. doi: 10.1016/j.ijpharm.2003.11.012.

El-Sayed, A.-F. M. (2006) *Tilapia culture*. Wallingford, Oxfordshire. doi: 10.1079/9780851990149.0000.

Fais, A. P. Scarpino, R., Baldo, A. F., de Freitas, O., Rizzato, J. A. (2017) "LC-MS/MS methods for sulfadimethoxine and ormetoprim analysis in feed and fish fillet and a leaching study for feed after alternative procedures for the incorporation of drugs", *Food Additives & Contaminants: Part A*. Taylor & Francis, 34(4), pp. 501–508. doi: 10.1080/19440049.2016.1267875.

FAO (2015) *FAO Global Aquaculture Production statistics database updated to 2013: Summary information*. doi: 14899E./1/08.15.

FAO (2018) *Estado Mundial De la pesca y la acuicultura: Cumplir los Objetivos de Desarrollo Sostenible*. Roma: FAO.

Gutierrez, L., Miranda-Calderon, J. E., Garcia-Gutierrez, P., Sumano, H. (2015) "Physicochemical characterization and pharmacokinetics in broiler chickens of a new recrystallized enrofloxacin hydrochloride dihydrate", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38(2), pp. 183–189. doi: 10.1111/jvp.12153.

Hena, A., Kamal, M. y Mair, G. C. (2005) "Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids", *Aquaculture*, 247, pp. 189–201. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.02.008.

Hsu, H., Wooster, G. A. y Bowser, P. R. (1994) "Efficacy of enrofloxacin for the treatment of salmonids with bacterial kidney disease, caused by *Renibacterium salmoninarum*", *Journal of Aquatic Animal Health*, 6(3), pp. 220–223. doi: 10.1577/1548-8667(1994)006<0220:EOEFTT>2.3.CO;2.

Idowu, O. R. y Peggins, J. O. (2004) "Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(1), pp. 143–153. doi: 10.1016/j.jpba.2004.01.006.

Inglis, V. y Richards, R. H. (1991) "The in vitro susceptibility of *Aeromonas salmonicida* and other fish-pathogenic bacteria to 29 antimicrobial agents", *Journal of Fish Diseases*, 14(6), pp. 641–650. doi: 10.1111/j.1365-2761.1991.tb00622.x.

Jiménez, R. (2007) "Enfermedades de Tilapia en Cultivo (tilapia diseases in culture)". Guayaquil, Chile: Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil.

- Kawakami, K. (2012) "Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs", *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 64(6), pp. 480–495. doi: 10.1016/j.addr.2011.10.009.
- Koc, F., Uney, K., Atamanalp, M., Tumer, I., Kaban, G. (2009) "Pharmacokinetic disposition of enrofloxacin in brown trout (*Salmo trutta fario*) after oral and intravenous administrations", *Aquaculture*. Elsevier B.V., 295(1–2), pp. 142–144. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.06.004.
- Küng, K., Riond, J. L. y Wanner, M. (1993) "Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 16, pp. 462–468. doi: 10.1111/j.1365-2885.1993.tb00212.x.
- Leshner, G. Y., Froelich, E. J., Gruett, M. D. Bailey, J. H., Brundage, R. P. (1962) "1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents", *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 5(5), pp. 1063–1065. doi: 10.1021/jm01240a021.
- Lewbart, G., Vaden, S., Deen, J., Manaugh, C., Whitt, D., Doi, A., Smith, T., Flammer, K (1997) "Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration.", *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 20, pp. 124–128. doi: 10.1046/j.1365-2885.1997.00814.x.
- Lewbart, G., Papich, M. y Whitt-smith, D. (2005) "Pharmacokinetics of florfenicol in the Red Pacu (*Colossoma brachypomum*) after single dose intramuscular administration", *Aquaculture* (May 1999), pp. 142–144.
- Lode, H., Borner, K. y Koeppe, P. (1998) "Pharmacodynamics of fluoroquinolones", pp. 33–39.

Lozano, I. et al. (2018) "Antibiotics in Chilean Aquaculture: A Review", *Antibiotic Use in Animals*. doi: 10.5772/intechopen.71780.

Martinsen, B., Horsberg, T. E., Varma, K. J., Sams, R. (1993) "Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater at 11°C", *Aquaculture*, 112(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/0044-8486(93)90153-P.

McKellar, Q., Gibson, I., Monteiro, A., Bregante, M. (1999) "Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma, inflammatory exudate, and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(8), pp. 1988–1992.

Miranda-Calderón, J. E., Gutiérrez, L., Flores-Alamo, M., García-Gutiérrez, P., Sumano, H. (2014) "Enrofloxacin hydrochloride dihydrate", *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, 70(4). doi: 10.1107/S1600536814006059.

Noga, E. J. (2010) *Fish Disease: Diagnosis and Treatment, Second Edition*. 2nd ed, North. 2nd ed. Editado por E. J. Noga. Iowa, USA. doi: 10.1002/9781118786758.

OIE (2017) *Principles for responsible and prudent use of antimicrobial agents in aquatic animal, Aquatic Animal Health Code*. Disponible en: http://www.oie.int/index.php?id=171&L=0&htmfile=chapitre_antibio_resp_prudent_use.htm (Consultado: el 8 de agosto de 2018).

Otero, J. L., Mestorino, N. y Errecalde, J. O. (2001) "Enrofloxacin una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria parte II: farmacocinética y toxicidad.", *Analecta Veterinaria*, 21(3080), pp. 42–49.

Oyebanji, M. y Omoregie, E. (2002) "Oxytetracycline-Induced Blood Disorder in Juvenile Nile Tilapia", *Journal Of The World Aquaculture Society*, 33(3), pp. 0–5. doi: 10.1111/j.1749-7345.2002.tb00514.x.

Plumb, D. (2010) *Manual de farmacología veterinaria*. 6a ed. Buenos Aires.

- Quesada, S. P., Paschoal, J. A. R. y Reyes, F. G. (2013) "A simple method for the determination of fluoroquinolone residues in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) employing LC-MS/MS QToF", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(5), pp. 813–825. doi: 10.1080/19440049.2013.791750.
- Rey, A., Iregui, C. y Verján, N. (2002) "Diagnóstico clínico patológico de brotes de enfermedad en tilapia roja (*Oreochromis spp*)", *Rev Med Vet Zoot*, 49(13–21), p. 9.
- Riche, M., Haley, D. I., Oetker, M., Garbrecht, S., Garling, D. L. (2004) "Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia *Oreochromis niloticus* (L.)", *Aquaculture*, 234(1–4), pp. 657–673. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.12.012.
- Rucinque, D. S., Polo, G., Borbón, J., González, Jaime Fernando (2016) "Anesthetic use of eugenol and benzocaine in juveniles of red tilapia", *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 60(57), pp. 60–66. doi: 10.17533/udea.rccp.v30n1a07.
- SAGARPA (2012) "Carta Nacional Acuícola", *Diario Oficial de la Federación*, pp. 33–112.
- SAGARPA (2017) *Alcanza producción pesquera y acuícola nacional*. Ciudad de México. Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/alcanza-produccion-pesquera-y-acuicola-nacional-las-1-8-millones-de-toneladas>.
- Samuelsen, O. B. (2006) "Pharmacokinetics of quinolones in fish: A review", *Aquaculture*, 255(1–4), pp. 55–75. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.12.008.
- Sarmento, B. y Costa, P. (2007) "Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs", 12(December). doi: 10.1016/j.drudis.2007.09.005.
- SENASICA (2017a) *Listado de productos aprobados para su uso en acuicultura*. [Disponible en línea]:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/246871/Productos_registrados_para_uso_en_la_acuacultura_8_ago_17.pdf.

SENASICA (2017b) *Respuesta de petición de agentes patógenos reportados a SENASICA en los últimos 3 años Vol. 855. No de oficio B00.02.0426/2018*. Ciudad de México.

Shao, Z. J. (2001) "Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: Current perspectives and future possibilities", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(3), pp. 229–243. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00159-4.

Singh, S., Ebeling, J. y Wheaton, F. (1999) "Water quality trials in four recirculating aquacultural system configurations", *Aquacultural Engineering*, 20(2), pp. 75–84. doi: 10.1016/S0144-8609(99)00003-5.

Soto-Rodríguez, S., Armenta, M. y Gomez-Gil, B. (2006) "Effects of enrofloxacin and florfenicol on survival and bacterial population in an experimental infection with luminescent *Vibrio campbellii* in shrimp larvae of *Litopenaeus vannamei*", *Aquaculture*, 255(1–4), pp. 48–54. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.035.

Stoffregen, D. A., Wooster, G. A., Bustos, P. S., Bowser, P. R., Babish, J. G. (1997) "Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile Atlantic salmon.", *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 20, pp. 111–123. doi: 10.1046/j.1365-2885.1997.81531.x.

Sumano, H., Ocampo, L. y Gutierrez, L. (2018) "Comparative pharmacokinetics of a new solvate of enrofloxacin as HCl-2H₂O (enro-C) in dogs and pk/pd simulations against *Leptospira* spp", *Dados*, (52), pp. 3499–3504.

Sumano, H., Ocampo, L. y Gutiérrez, L. (2015) *Farmacología Veterinaria*. 4 th. Mexico City.

Tang, J., Yang, X., Zheng, Z., Yu, W., Hu, K., Yu, H. (2006) "Pharmacokinetics and the active metabolite of enrofloxacin in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir*

sinensis)”, *Aquaculture*, 260(1–4), pp. 69–76. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.05.036.

Teles, J. A., Castello Branco, L.C., Del Bianchi, M., Pilarski, F., Reyes, F.G.R. (2016) “Pharmacokinetic study of enrofloxacin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after a single oral administration in medicated feed”, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 39(2), pp. 6–9. doi: 10.1111/jvp.12257.

Timmons, M., Ebeling, J.M., Wheaton, F., Summerfelt, S., Vinci, B. (2012) *Recirculating Aquaculture Systems*. Editado por G. Prada y M. Hevia. Santiago: Quebecor World Chile S.A. doi: 10.1002/9781118250105.

Tran-Duy, A., Schrama, J. W., Van Dam, A. A., Verreth, J. A. J. (2008) “Effects of oxygen concentration and body weight on maximum feed intake, growth and hematological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*”, *Aquaculture*, 275(1–4), pp. 152–162. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.12.024.

Turnidge, J. (1999) “Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Fluoroquinolones”, *Drugs*, pp. 29–36.

Udomkusonsri, P., Arthitvong, S., Klangkaew, N., Kusucharit, N. (2007) “Pharmacokinetics of Enrofloxacin in Koi Carp (*Cyprinus carpio*) after Various Routes of Administration”, *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 41, pp. 62–68.

Uscanga, A., Moyano, F. J. y Alvarez, C. A. (2010) “Assessment of enzymatic efficiency on protein digestion in the tilapia *Oreochromis niloticus*”, *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(4), pp. 10791085. doi: 10.1007/s10695-010-9385-8.

Valbuena-Villareal, R. D. y Cruz-Casallas, P. E. (2006) “Efecto del peso corporal y temperatura del agua sobre el consumo de oxígeno de tilapia roja (*Oreochromis* sp) Effect of body weight and water temperature on the oxygen consumption of red tilapia (*Oreochromis* sp.)”, *Orinoquía*, 10, pp. 57–63.

Vinatea, L. (1994) “Principios Químicos de la Calidad de Agua en Acuicultura. Una Revisión para Peces y Camarones”, p. 92.

Woo, P. T. K. (2006) [Book Review: *Fish Diseases and Disorders. Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. Second Edition.*], *The Quarterly Review of Biology*. doi: 10.1086/513384.

World Health Organization (2015) “Antibiotic Resistance: Multi-Country Public Awareness Survey”, *WHO Press*, pp. 1–51.

Xu, L., Wang, H., Yang, X., Lu, L. (2013) “Integrated pharmacokinetics/pharmacodynamics parameters-based dosing guidelines of enrofloxacin in grass carp *Ctenopharyngodon idella* to minimize selection of drug resistance”, *BMC Veterinary Research*, 9. doi: 10.1186/1746-6148-9-126.

Zaki, M. M., Eissa, A. E. y Saeid, S. (2011) “Assessment of the Immune Status in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Experimentally Challenged with Toxogenic / Septicemic Bacteria During Treatment Trial with Florfenicol and Enrofloxacin”, *World Journal of fish and Marine Sciences*, 3(1), pp. 21–36.

10 Apéndices

2.15 Apéndice 1 Formatos

Desarrollo del estudio

Formato de muestreo

○

Tina	Basal 07:00	Admco. 08:00	M1 08:30	M2 09:00	M3 10:00	M4 12:00	M5 14:00	M6 16:00	M7 18:00	M8 20:00	M9 08:00	M10 08:00	M11 08:00	M12 08:00	Observaciones
1															
2															
3															
4															

Formato 1
Enro-c en tilapia

Formato 1. Se utilizó para anotar en tiempo y forma el horario en el que se realizaba cada acción importante para la toma de muestra y administración de los tratamientos.

CALIDAD DE AGUA

FECHA:

RESPONSABLE:

TINA O ESTANQUE:

Fecha:	Resultado	Fecha:	Resultado
Temperatura		Temperatura	
Oxígeno		Oxígeno	
Amonio		Amonio	
Nitratos		Nitratos	
pH		pH	
Fecha:	Resultado	Fecha:	Resultado
Temperatura		Temperatura	
Oxígeno		Oxígeno	
Amonio		Amonio	
Nitratos		Nitratos	
pH		pH	
Fecha:	Resultado	Fecha:	Resultado

OBSERVACIONES: _____

Formato 2

Formato 2. Se utilizó para registrar en tiempo y forma los valores obtenidos de calidad de agua.

SEPARACIÓN DE MUESTRAS

Periodo:

FECHA: _____ RESPONSABLE: _____
 TINA O ESTANQUE: _____

NÚMERO DE TOMA Y TIEMPO:

NÚMERO MUESTRAS	HORA RECEPCIÓN	HORA COMIENZO CENTRIFUGACIÓN	HORA TÉRMINO CENTRIFUGACIÓN	COMIENZO SEPARACIÓN	TÉRMINO SEPARACIÓN	HORA DE ALMACENAMIENTO	RESPONSABLE

SEPARACIÓN DE MUESTRAS
 RESPONSABLE: _____

FECHA: _____
 TINA O ESTANQUE: _____
 NÚMERO DE TOMA Y TIEMPO:

NÚMERO MUESTRAS	HORA RECEPCIÓN	HORA COMIENZO CENTRIFUGACIÓN	HORA TÉRMINO CENTRIFUGACIÓN	COMIENZO SEPARACIÓN	TÉRMINO SEPARACIÓN	HORA DE ALMACENAMIENTO	RESPONSABLE

SEPARACIÓN DE MUESTRAS
 RESPONSABLE: _____

FECHA: _____
 TINA O ESTANQUE: _____
 NÚMERO DE TOMA Y TIEMPO:

NÚMERO MUESTRAS	HORA RECEPCIÓN	HORA COMIENZO CENTRIFUGACIÓN	HORA TÉRMINO CENTRIFUGACIÓN	COMIENZO SEPARACIÓN	TÉRMINO SEPARACIÓN	HORA DE ALMACENAMIENTO	RESPONSABLE

OBSERVACIONES: _____

Formato 3

Formato 3. Se utilizó para registrar en tiempo y forma cada uno de los pasos del proceso de separación de muestras, hasta su llegada a refrigeración.

2.16 Apéndice 2 Gráficas de regresión lineal de los estándares de cada uno de los cultivos que se realizaron.

