



Casa abierta al tiempo

DESARROLLO DE UN EMULGEL DE USO VETERINARIO PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIANAS

Asesores: Jorge Esteban Miranda Calderon.
No. Eco. 38889

Norma Angélica Noguez Méndez.
No. Eco. 17902

Autor: Joel Jimenez Adame
Matricula 20923577

CONTENIDO

INTRODUCCION	2
1. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
2. HIPOTESIS.....	3
3. OBJETIVOS.....	3
4. Objetivos específicos	4
5. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO.....	5
5.1 Emulsión	5
5.2 Emulgel.....	7
5.3 Enrofloxacin.....	8
5.4 El sistema de liberación de fármacos autoemulsionables	10
6. MATERIAL Y METODOS	13
7. RESULTADOS Y DISCUSION	18
8. CONCLUSIONES	34
9. REFERENCIAS	35

INTRODUCCION

La enrofloxacin es un antibi3tico de amplio espectro de uso veterinario en peque1as especies, eficaz para la mayor1a de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y algunas bacterias anaerobias, que tiene una biodisponibilidad oral excelente en los mam1feros monog1tricos como los perros, hasta con un 80% de la dosis ingerida, puede ser absorbida en la circulaci3n sist3mica, la cual es alcanzada de 1 a 2 horas despu3s administraci3n por lo cual la solubilidad tiene un papel importante para que la enrofloxacin sea absorbida en un menor tiempo con una mayor biodisponibilidad. ¹

Existen muchas estrategias para poder incrementar la solubilidad de la enrofloxacin como sistemas de solventes, surfactantes, complejos con ciclo dextrinas los cuales han demostrado que incrementan la solubilidad de principios activos clase II como la enrofloxacin, mejorando la solubilidad del principio activo en agua y medios 1cidos como en el est3mago.

Al tomar en cuenta las caracter1sticas fisicoqu1micas del principio activo se puede obtener una visi3n de una estrategia para lograr solubilizar la enrofloxacin y dosificarla en una forma farmac3utica, donde el punto de partida ser1 las caracter1sticas de calidad del f1rmaco.

Con base a lo anterior, el prop3sito de este proyecto fue asegurar la calidad, seguridad y eficacia del efecto de los excipientes cr1ticos de una emulsi3n previamente formulada utilizando dise1os factoriales adoptando una estrategia para el mitigar el riesgo del fracaso al modificar la formaci3n base y asegurar la liberaci3n de la enrofloxacin, desarrollando una forma farmac3utica "emulgel".

1. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El abuso de los antibióticos y la automedicación ha sido un problema en el tratamiento de infecciones bacterianas en animales, ya sea de compañía o dedicados para el consumo humano, incluso en la mayoría de los casos el origen de la patología es viral y remite por sí misma, causando resistencia de los microorganismos a los antibióticos y cuando el paciente llega a consulta es más difícil identificar el origen del problema convirtiéndose cada día en un peligro latente para la salud derivado de que en casos de animales dedicados a consumo humano se encuentra en la carne restos de antibiótico la cual es consumida por el humano. Los antibióticos para animales se administran acorde al peso del animal y el uso irresponsable provoca que existan cepas multirresistentes.

Una incorrecta prescripción y dosificación de antibióticos en las clínicas veterinarias ya sea para cumplir los objetivos comerciales o para satisfacer a los dueños conduce a la resistencia de los antibióticos, incluyendo a las bacterias oportunistas que infectan también a los humanos por lo cual es necesario desarrollar nuevas formas farmacéuticas que aseguran que los animales sean dosificados de forma eficaz con la finalidad de proteger su salud y su bienestar, asimismo la de sus dueños.

2. HIPOTESIS

Si la fórmula farmacéutica del emulgel con enrofloxacin desarrollada es estable, homogénea con una disolución rápida entonces será capaz de usarse como un medicamento antiinfeccioso de uso veterinario.

3. OBJETIVOS

Desarrollar un emulgel con un principio activo de clase biofarmacéutica II (enrofloxacin), que sea capaz de mantener sus atributos de calidad a lo largo de su vida de anaquel para ser usado para tratar enfermedades de origen bacteriano en animales de compañía.

4. Objetivos específicos

- 4.1.** Desarrollar un emulgel oral partiendo de una formulación previamente desarrollada identificando los excipientes críticos en la formulación para descartar los excipientes que no son necesarios.
- 4.2.** Seleccionar excipientes adecuados para obtener una micro emulsión para obtener una disolución homogénea de la enrofloxacina en el emulgel.
- 4.3.** Realizar un estudio de estabilidad para la formulación desarrollada, cuantificando en los periodos de inicio de fabricación hasta los 3 meses, evaluando su pH, ensayo de principio activo y disolución.

5. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO

5.1 Emulsión

Las emulsiones son dispersiones formadas por dos fases líquidas inmiscibles entre sí, que se mezclan mediante la aplicación de fuerza mecánica y un agente tensoactivo o surfactantes que son responsables de reducir las fuerzas de atracción en la superficie de contacto entre ambas fases reduciendo la fuerza repelente entre los dos líquidos y disminuyendo la atracción entre las moléculas del mismo líquido debido a que los agentes surfactantes se orientan alrededor de una gota de líquido de una manera que refleje su solubilidad en ese particular.

Existen varios tipos de emulsiones, agua en aceite (w/o), aceite en agua (o/w), agua en aceite en agua (w/o/w) y aceite en agua en aceite (o/w/o).

Durante la preparación de la emulsión, el surfactante debe ser capaz de reducir la tensión interfacial lo más cercano a cero para facilitar la dispersión de todos los componentes. Estos tensioactivos pueden ser no iónico, aniónico, catiónica y neutro.²

5.1.1 Tensoactivos No iónicos

Carecen de carga electrostática, apenas alteran la barrera cutánea, aunque en contrapunto, forman poca espuma. Algunos ejemplos son: alquil-poliglucósidos, de todos los tensioactivos no iónicos, éstos son los que mejor capacidad espumante tienen, a menudo se combinan con otros tensioactivos como los aniónicos para aminorar las propiedades irritantes cutáneas de estos últimos.³

5.1.2 tensoactivos Aniónicos

Están formados por grupos cargados negativamente, por lo que atraen sustancias con carga positiva con mayor eficacia. Son poco afines a la piel. Algunos ejemplos son: sales de lauril éter sulfato (alquil éter sulfatos): especialmente la sal sódica

(lauril sulfato de sodio); o la sal magnésica (lauril sulfato de magnesio) que es menos irritante.³

5.1.3 Tensoactivos Catiónicos

Están formados por grupos cargados positivamente, presentan gran afinidad con capacidad detergente muy limitada. Algunos ejemplos son derivados del amonio cuaternario como: el metoulfato de behentrimonio y Cloruro de behentrimonio.

5.1.4 Tensoactivos Neutros

Su carga varía en función del pH del medio, pues poseen grupos funcionales con capacidad de ionizarse con carga positiva (catión) o con carga negativa (anión). Se suelen utilizar en combinación con los tensoactivos aniónicos, de modo que se compensa su poca capacidad espumante y mejor tolerancia cutánea.

Algunos ejemplos son derivados betaínicos: Cocamidopropil Betaina, Lauril Betaina. La elección del surfactante se debe basar sobre el valor del equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) para poder desarrollar la emulsión deseada.

El HLB es la proporción de partes hidrofílicas e hidrofóbicas de la molécula de surfactante. Los tensoactivos con valores HLB 3-8 bajos, como se muestra en la imagen 1, son útiles para formar emulsiones W/O y con valores HLB altos 8-18 se utilizan para formar una emulsión O/W.³

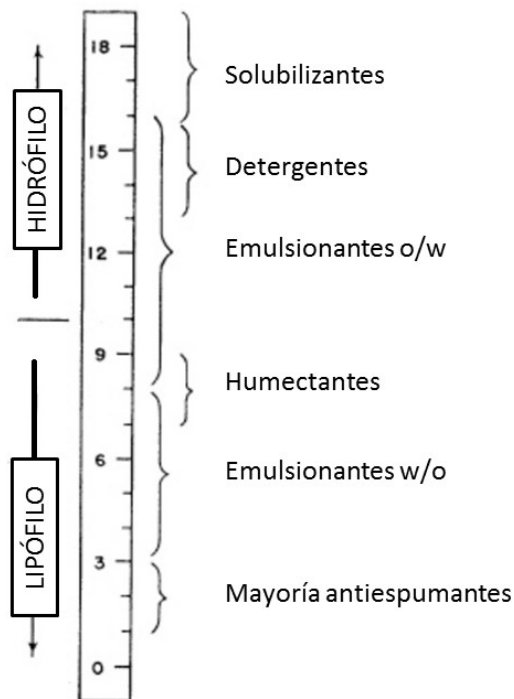


Imagen 1. Escala de HBL y la función que desempeñan.²

5.1.4 Micro emulsión

La micro emulsión es una mezcla líquida isotrópica transparente, termodinámicamente estable, se prepara usando aceite, agua, surfactante y un co-surfactante el cual incorpora partículas de tamaño muy pequeño hasta nanopartículas en comparación con emulsión convencional con un diámetro de dominio disperso que varía aproximadamente de 1 a 100 nm, generalmente de 10 a 50 nm.

Las nano emulsiones son muy similares a las micro emulsiones que son dispersiones de partículas a escala nanométrica pero obtenidas por métodos mecánicos a diferencia de las micro emulsiones que se forman espontáneamente.⁴

5.2 Emulgel

El emulgel es una emulsión tipo aceite en agua o agua en aceite, que se gelifica mezclándola con agente gelificante, la incorporación del agente gelificante aumenta la estabilidad y se convierte en un sistema de liberación controlada, debido a la carencia de bases oleosas y excipientes insolubles, muestra una mejor liberación del fármaco y la presencia del agente gelificante hace que su consistencia no sea grasosa favoreciendo la conformidad del paciente.

La administración del emulgel es común que sea por vía tópica pero la aplicación directa del fármaco de la piel al sitio de acción tiene limitaciones, de modo que el fármaco tiene cruzar las barreras de la piel para llegar a la circulación sistémica, para superar este problema se han diseñado diferentes vías de administración tales como bucal, nasal, vaginal etc.

En donde la aplicación del emulgel en estas vías de administración se ha visto un aumento en la absorción del fármaco y su eficacia. Desde años atrás los emulgel han ido ganando importancia en formas farmacéuticas tópicas, su amplia utilización como forma de dosificación farmacéutica proviene de la utilización de sistemas de emulsiones que en sí forman un sistema de liberación controlada donde el fármaco queda en la fase externa de la piel y se absorbe lentamente, debido a su propiedad mucho adhesiva del emulgel prolonga el tiempo de contacto sobre la piel actuando como un sistema de liberación.^{5,6}

5.2.1 Agente emulsificante

Un agente emulsificante debe ser capaz de producir emulsiones estables, tener un equilibrio razonable entre sus grupos hidrófilos y lipófilos. Los tensoactivos no iónicos tales como los emulsionantes tienen valores de HLB mayores de 8 y se usan en la formulación de emulsiones de aceite en agua, mientras que los aceites minerales tales como parafina líquida tienen valores de HLB inferiores a 8 y por lo tanto se emplean en la formulación de emulsiones de agua en aceite.⁵

5.2.2 Agente gelificante

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, utilizando agentes emulsionantes apropiados, para disminuir la tensión interfacial, se puede aumentar significativamente la estabilidad de este sistema. La incorporación del agente gelificante a un sistema lo hace tixotrópico o fluido no newtoniano, debido a los cambios dependientes del tiempo en la viscosidad inducida por la temperatura, pH u otros componentes mantienen los sistemas de emulsiones sin cambios mejorando la estabilidad, así como biodisponibilidad del sistema.^{5,6}

5.3 Enrofloxacin

La enrofloxacin es un miembro de la familia de las quinolonas que tiene una actividad bactericida contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos y su biodisponibilidad oral es excelente en mamíferos monogástricos y terneros, absorbiendo de forma rápida hasta 80% de la dosis ingerida en la circulación sistémica, con concentraciones séricas máximas alcanzadas de una a dos horas después de la administración además no hace complejos fácilmente con las proteínas plasmáticas, lo que permite a los metabolitos de la enrofloxacin cruzar fácilmente las membranas celulares distribuyéndose en todo el cuerpo, incluidos los riñones, el hígado, la próstata, el útero y los huesos.

La enrofloxacin se puede encontrar en cuatro formas diferentes: catión, especie neutral no ionizada, anfótera, y anión dependiendo del pH ($pK_{a1} = 5.88 - 6.06$ y un $pK_{a2} = 7.70 - 7.74$; el primer pK_a se debe al grupo ácido carboxilo y el segundo a la amina terciaria básica). La forma anfótera provoca que la enrofloxacin sea una

molécula lipofílica a un pH neutro y su forma de catión y anión la enrofloxacin es más soluble sobre todo en un pH ácido como el del estómago.

La enrofloxacin actúa inhibiendo en forma irreversible la enzima ADN-girasa, responsable de una serie de funciones vitales para la bacteria, que durante la fase de multiplicación de las bacterias el ADN se pliega y despliega en forma alternada, este proceso es controlado por la enzima ADN-girasa y al inhibir este sistema enzimático ocurre un colapso en el metabolismo, ya que la información del ADN no puede ser copiada, esto provoca la muerte inmediata del microorganismo.

Un segundo mecanismo de acción estaría descrito en la inhibición de otra enzima la topoisomerasa IV responsable de la separación de las cromátidas hermanas en la replicación del ADN bacteriano.⁷

5.3.1 Absorción

Hay una alta variación de la biodisponibilidad después de la administración. La biodisponibilidad intramuscular es del 96%, la biodisponibilidad oral de enrofloxacin entre los animales poligástricos y monogástricos es de 10% a 80% y las presentaciones orales están reservadas para cerdos, aves, caninos, felinos y sólo hay soluciones inyectables disponibles para el ganado. Además, la biodisponibilidad depende de si los animales se encuentran en ayunas y de la presencia de cationes que pueden formar un complejo con la fluoroquinolona que no puede permear a través de la barrera digestiva. Por otro lado, los compuestos lipofílicos en los alimentos pueden mejorar la biodisponibilidad oral de la fluoroquinolona, además de la difusión pasiva permitida por la parte lipídica de la enrofloxacin.^{7,8}

5.3.2 Metabolismo

Después de la administración el primer paso hepático no tiene mucho efecto, sólo el 7% de la enrofloxacin se metaboliza y una gran parte de la enrofloxacin se metaboliza en ciprofloxacina en la mayoría de las especies (perros 40%, vacas lecheras 59%, bueyes 64%, pollos <10%, cerdos 51% y cabras 34%) y otros metabolitos, pero no tienen efectos antimicrobianos.^{7,8}

5.3.3 Distribución

La distribución de la enrofloxacin y la ciprofloxacina a los tejidos depende de la concentraci3n libre del f3rmaco, que depende de la concentraci3n de uni3n a prote3nas y de la fuerza de esta uni3n, los vol3menes de distribuci3n de enrofloxacin y ciprofloxacina en diferentes especies, ver tabla 1. As3, la enrofloxacin y su metabolito difunden fuertemente en los tejidos como pulm3n y ri3n. ^{7,8}

5.3.4 Eliminaci3n

La eliminaci3n de la enrofloxacin es principalmente renal, esto se ha demostrado en un modelo experimental en ratas con insuficiencia hep3tica, por otro lado, la eliminaci3n de ciprofloxacina es hep3tica y renal. Para ambas mol3culas hay una recirculaci3n intestinal a trav3s de la excreci3n biliar, adem3s, a las dos horas de la administraci3n, no hay diferencia significativa en la concentraci3n de enrofloxacin en el contenido intestinal en la administraci3n oral e intramuscular. ^{7,8}

TABLA 1. La distribuci3n de enrofloxacin y la ciprofloxacina en diferentes especies de animales. (ND, no disponible).⁸

Especie	T 1/2(h)		CL mL/min/Kg		Vss L/Kg	
	Enrro	Cipro	Enrro	Cipro	Enrro	Cipro
Perro	2.3	2.8	12.6	7.8	2.45	1.92
Vaca lechera	3.69	2.96	24.16	ND	1.56	ND
toro	5.5	7.6	11.6	ND	1.59	ND
Pollo	6.99	3.11	3.3	15.45	1.98	4.04
Cerdo	26.6	2.6	3	17.3	6.4	3.8

5.4 El sistema de liberaci3n de f3rmacos auto emulsionables

Los sistemas de liberaci3n de f3rmacos auto emulsionables (SEDDS por sus siglas en ingl3s) surgieron como una alternativa ante la necesidad de superar problemas en la solubilizaci3n acuosa de principios activos a una absorci3n gastrointestinal limitada por la disoluci3n y a su vez en una biodisponibilidad baja y variable, generalmente, estos compuestos se encuentran categorizados como clase II o clase IV en el Sistema de Clasificaci3n Biofarmac3utica (SCB).

Los SEDDS han ganado atenci3n derivado de que, en comparaci3n de las formas farmac3uticas, como emulsi3n, han mostrado que el activo tiene una mejor

biodisponibilidad, en casos como geles o parches son más consistentes la absorción del fármaco ya sea en tracto gastrointestinal o dermis.

Las SEDDS son mezclas de excipientes oleoso, cosolventes y tensioactivos, de naturaleza isotrópica y que producen emulsiones finas de aceite en agua cuando se introducen en la fase acuosa bajo agitación suave. La movilidad del tracto gastrointestinal proporciona esa agitación para la auto emulsificación, por lo cual estos sistemas emulsionan espontáneamente al exponerse a los fluidos gastrointestinales. Las potenciales ventajas que ofrecen estos sistemas incluyen: una biodisponibilidad oral aumentada, posibilidad de reducción en la dosis, perfiles de absorción del fármaco más reproducibles, evitar el metabolismo de primer paso hepático, orientación selectiva del fármaco a sitios de absorción específica en el tracto gastrointestinal, mayor capacidad de carga del fármaco en torrente sanguíneo y finalmente, selección de formas de dosificación sólidas y líquidas. Sin embargo, estos sistemas presentan algunas desventajas entre las que se pueden mencionar: precipitación del fármaco luego de dilución, falta de modelos in vitro adecuados, oxidación y polimorfismos de los lípidos usados en la formulación.⁹

5.4.1 Composición

Los SEDDS están constituidos por tres componentes básicos: un principio activo, una fase oleosa y un tensioactivo, Sin embargo, en algunas ocasiones puede presentarse la incorporación de excipientes adicionales para mejorar algunas características o el desempeño del sistema, como, por ejemplo, cosolventes, mucoadhesivos, inhibidores de la precipitación etc.

La fase oleosa representa uno de los principales componentes en los SEDDS, puesto que es la encargada de solubilizar el principio activo y de esta dependerá la cantidad máxima que puede soportar el sistema, una mayor solubilidad del principio activo en la fase oleosa reduce los requerimientos de tensioactivos minimizando así los efectos tóxicos causados por las altas concentraciones de estos, Generalmente, son utilizados como fase oleosa aceites constituidos por triglicéridos con diferentes longitudes de cadena carbonada y grados de saturación, ver tabla 2.

Los lípidos de cadena larga son menos susceptibles a la degradación enzimática por lo cual son menos propensos a presentar precipitación del fármaco en comparación con los aceites de cadena media, debido a que los ácidos grasos productos de su digestión, tienen mayor afinidad por la interfaz aceite-agua, bloqueando así la actividad enzimática. Sin embargo, los lípidos de cadena media son hidrolizados con mayor rapidez y permiten una absorción más rápida del fármaco, aunque esto implica un mayor riesgo de presentar precipitación del fármaco.

Por lo tanto, la longitud de la cadena de la fase oleosa influye en la estabilidad de la dispersión resultante, aunque los lípidos de cadena larga forman dispersiones más estables, evitando la precipitación del principio activo son bien tolerados fisiológicamente debido a su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad lo que les otorga una menor toxicidad.

Otro aspecto es la absorción la cual también es determinada por la longitud de la cadena en la fase oleosa, los lípidos con cadena media son transportados hacia la circulación sistémica por medio de la sangre portal, mientras que los de cadena larga son transportados a través del sistema linfático intestinal.^{9,10}

Tabla 2. Lípidos usados en formulaciones SEEDS.⁹

Lípido	HLB	Composición
Capmul MCM	5-6	Glicéridos de ácido cáprico/caprílico
Miglyol 812	6	Triglicéridos del ácido caprílico/ cáprico
Aceite de soya	7	Ácido linoleico (54%) / oleico (22%)
Captex 355	7	Mezcla de caprato/ caprilato de glicerol
Capryol 90	6	Monocaprilato de propilenglicol
Aceite de ricino	14	Ácido ricinoleico (95%)
Ácido oleico	1	Ácido cis-9-octadecanoico
Labrafil	4	Oleoyl macroglicéridos
Maisine 35-1	4	Gliceril monolinoleato

6. MATERIAL Y METODOS

A partir de la formulación base, ver tabla 3 se realizaron estudios de disolución para cuantificar la liberación de la enrofloxacin, se realizaron evaluaciones de los perfiles de disolución para analizar como afectaba cada uno de los excipientes en la formulación, para poder disminuir el número de excipientes sin perder la estabilidad de la formulación y mejorar la disolución de la enrofloxacin.

Tabla 3 Formulación base de Emulgel

Formulación inicial	
Nombre	Cantidad (g)
Enrofloxacin	10
Goma xantana	0.8
Etanol	5
Transcutol	5
Labrasol	5
Gelucire	2
Bisulfito de sodio	0.35
Labrafill	10
Labrafac	10
Poloxámero F68	2
Ciclodextrina	2
Tefose	1
Agua	CBP 100g

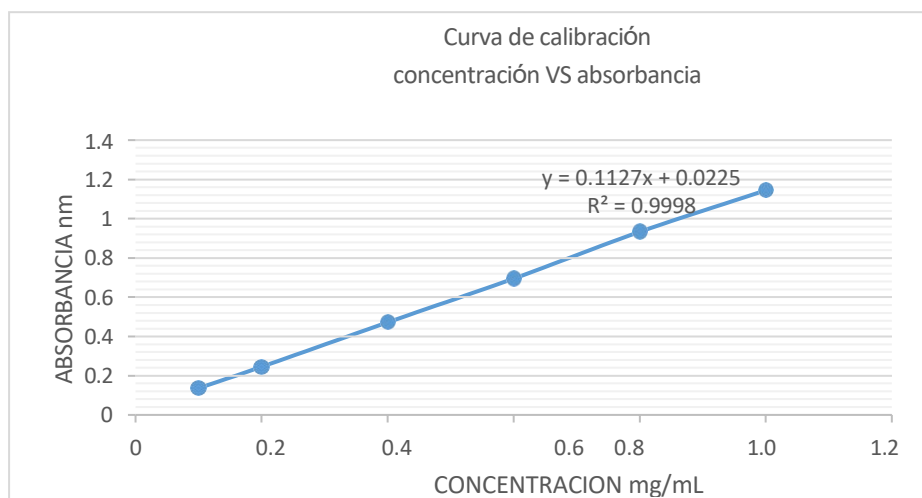
6.1. Preparación del emulgel.

En la fase de oleosa de la emulsión (labrasol, labrafill, transcutol, poloxamero F68, gelucire, labrafac y tefose) se disolvió la enrofloxacin, por otro lado, la fase acuosa se preparó disolviendo en una solución agua: glicerina; β -ciclodextrina etanol y bisulfito de sodio. ambas fases se calentaron a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la fase oleosa se añadió a la fase acuosa con temperatura y agitación continua a 500 rpm, la emulsión obtenida se dejó enfriar a temperatura ambiente para adicionarle la goma xantana lentamente con agitación a para obtener el emulgel.

6.1.2 Proceso de análisis del principio activo

Se realizó una adaptación del artículo *Physicochemical properties of enrofloxacin Pharmaceutical and biomedical analysis, Volume 15, pp. 1845-1849* el cual tiene resultados de máximos de absorbancias de $272 \pm 3\text{nm}$, se realiza un barrido en el equipo UV y se realizó una curva de calibración por

espectroscopía UV por triplicado con concentraciones conocidas de enrofloxacin disuelta en HCl 0.1N de 1, 2, 4, 6, 8 y 10mg de enrofloxacin por cada 100ml haciendo la lectura a 273nm, ver gráfica 1.



Gráfica 1. Curva de calibración de enrofloxacin en solución de ácido clorhídrico 0.1N

6.2. Análisis de la Disolución del emulgel

Se tomó como referencia el artículo *An Alternative Method for the Dissolution of Enrofloxacin Tablets G. R. Foresti, 2015, pp. 23-27.* realizando una adaptación del método analítico para la cuantificación de la disolución para las tabletas de patente baytril de 100mg y la comparación del emulgel formulado, usando las condiciones experimentales siguientes:

Condiciones de operación para disolución	
Condiciones	Parámetros
Temperatura	37 °C±0.5°C
Aparatos II	Paletas
Velocidad	50 rpm
Medio de disolución	HCl 0.1N
Volumen del medio	900 mL
Tiempo de muestreo	45 min
Detección UV	273 nm

6.3 Selección de excipientes lipofílicos

Se realizó una recopilación de información en donde se utilizaron los excipientes lipofílicos para evaluar su efecto en la disolución del emulgel, emulsiones o formulaciones tópicas para descartar excipientes que podrían estar afectando la liberación de la enrofloxacin, los cuales fueron descartándose uno a uno de la formulación, tomando como referencia su apariencia y disolución.

6.4 Solubilidad de la enrofloxacin en el sistema autoemulsificante

Se tomaron 10mL del sistema emulsificante seleccionado en el diagrama ternario y se llevó a la temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por una hora y se adicionó un con exceso de enrofloxacin, al término las muestras fueron centrifugadas a 500 rpm por 10 minutos, al sobrenadante se le hicieron las diluciones necesarias para determinar el contenido de enrofloxacin por espectrofotometría UV-Visible a 273 nm.

6.5 Construcción del diagrama de fases ternario para la preparación del SEDDS

Fue realizado un diseño de mezclas que permitiera un mayor incremento en la solubilidad de la enrofloxacin, por lo cual se realizaron combinaciones de cada uno de los excipientes a temperatura ambiente con HCl 0.1N para asegurar las condiciones ácidas del estómago y se agitaron suavemente para promover la autoemulsificación, las muestras se diluyeron en agua y se observó el tamaño de la gota de las emulsiones, estas fueron determinadas por difracción de luz láser con un índice de refracción de 1.38.

6.6 Preparación del emulgel

En la fase de oleosa de la emulsión (Labrasol, Labrafill, trasncutol, Poloxámero F68 y etanol) se disolvió la enrofloxacin, por otro lado, la fase acuosa se preparó disolviendo en una solución agua: glicerina; β -ciclo dextrina y bisulfito de sodio. ambas fases se calentaron a $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la fase oleosa se añadió a la fase acuosa con temperatura y agitación continua a 5000 rpm, la emulsión obtenida se dejó enfriar a temperatura ambiente para adicionarle la goma xantana lentamente con agitación a 200 rpm para obtener el emulgel. Las formulaciones preparadas de emulgel se inspeccionaron visualmente por su color, apariencia, consistencia, así como sus propiedades fisicoquímicas pH, viscosidad y valoración del principio activo.

6.7. Optimización de la formulación Diseño factorial 2²

Las formulaciones de la enrofloxacin fueron comparadas con el producto comercial (tabletas Baytril), el ensayo de disolución se llevó a cabo usando un aparato de disolución II, con 1000 mL de solución 0.1 N de ácido clorhídrico como medio de disolución, a 37 ± 0.5 °C, la velocidad de agitación de las paletas se ajustó a 50 rpm.

Durante el estudio se tomaron alícuotas de 5 mL y se retiraron a intervalos de tiempo de 5, 10, 15, 20, 30 y 45 min. La cantidad de enrofloxacin disuelta en el medio de disolución se determinó por espectroscopia UV a $\lambda_{\text{max}} = 273$ nm.

Cuatro formulaciones de emulgel fueron preparadas de acuerdo con un diseño factorial 2² empleando los factores afectaban de manera directa la disolución del emulgel, los niveles cuantitativos para la goma xantana y Poloxámero F68 se muestran en la Tabla 4. Las formulaciones preparadas de emulgel se inspeccionaron visualmente por su color, apariencia, consistencia, así como sus propiedades fisicoquímicas pH, viscosidad y valoración del principio activo.

Tabla 4. combinación de goma xantana y poloxamero F68 en el diseño factorial 2²

Número de corrida	Goma Xantana	Poloxámero
1	-1	-1
2	1	1
3	1	1
4	-1	-1
5	-1	1
6	1	-1
7	1	-1
8	-1	1

6.8 Estudios de estabilidad acelerada y a largo plazo

Los emulgeles fueron sometieron a temperaturas de 25 ° C 60% HR y 40 ° C 75% HR durante un período de 3 meses. Se extrajeron muestras a intervalos de tiempo de 1 mes y se evaluó la apariencia, propiedades fisicoquímicas y disolución.

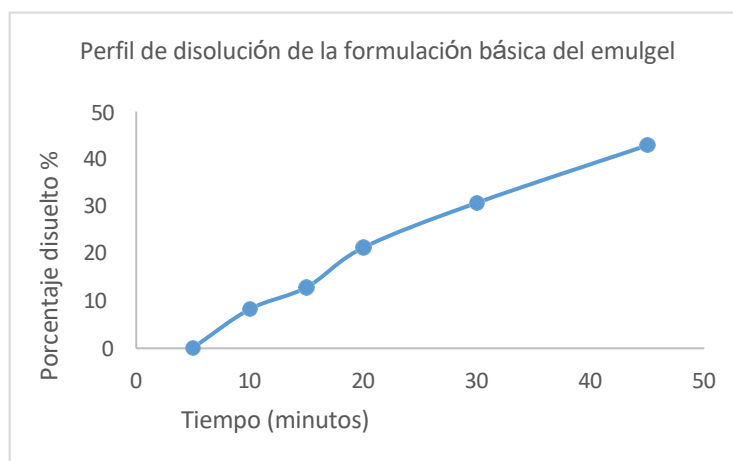
6.9 Prueba de estabilidad por ciclado

Para determinar los cambios en las propiedades físicas y químicas del emulgel este fue almacenado a temperaturas de 4°C por 24 horas y a 40°C las siguientes 24 horas siguiendo este procedimiento por 14 días.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

Al realizar 100mL de la formulación inicial indicada en la tabla 3 se observó que a pesar de tener excipientes lipídicos en que se solubilizaba la enrofloxacin la emulsión era inestable, la cual mostraba separación las fases o floculación en un periodo de 10 días bajo condiciones de temperatura ambiente.

Con la finalidad de impedir la separación de la formulación fue necesario incrementar la temperatura de mezclado de ambas fases de la emulsión pasando de 60°C a 70°C aplicando fuerza mecánica de mezclado a 1500rpm, la separación de fases se atribuye al exceso de excipientes lipídicos además el perfil de disolución de la formulación inicial tiene una Q= 40 en más de 45 min, ver grafica 2.



Gráfica 2. Perfil de disolución de la formulación básica del emulgel

7.1. Efecto de los excipientes auto emulsificantes

El Gelucire es un surfactante soluble en agua que se puede usar en diferentes tipos de formulaciones basadas en lípidos, sin embargo, para que el Gelucire se incorpore dentro de la formulación debe alcanzar una temperatura mayor a los 37°C¹¹ y al decrecer la temperatura en el caso de la emulsión elaborada desfavorece la estabilidad, debido a que el Gelucire no se logró incorporar de manera homogénea y aunque el Gelucire ayuda incrementar la solubilidad de principios activos como la enrofloxacin para el emulgel confiere características físicas no deseadas como una alta viscosidad y baja disolución en el emulgel, además de que se requiere una

temperatura mayor de 37°C para incorporar la fase oleosa y acuosa, a una menor temperatura no se logró realizar una emulsión estable. Ver imagen 2.

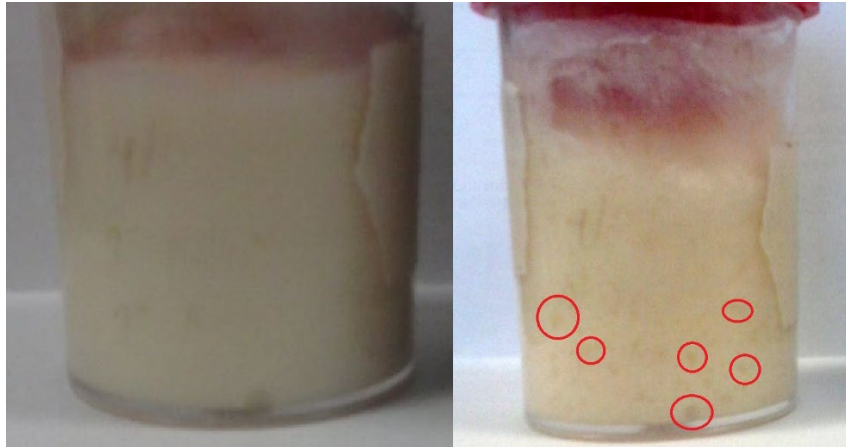


Imagen 2. La imagen de la izquierda es la formulación sin gelucire, a la derecha muestra la formulación con gelucire y este no se incorpora de manera homogénea.

El auto emulsificador Tefose ha mostrado ser un emulsionante compatible con varios tipos de fase oleosa y ayuda a la estabilización de las emulsiones¹², pero al agregar el Tefose a la emulsión formaba aglomerados que precipitaban lentamente ver imagen 3, aunque se estabilizan con ayuda del agente gelificante (goma xantana) el emulgel no era homogéneo, debido a que presentaba puntos transparentes al finalizar el proceso del emulgel.

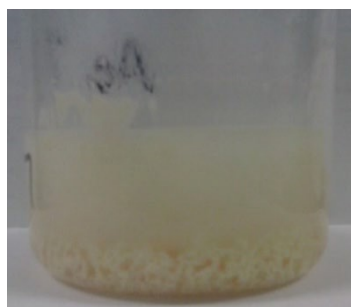


Imagen 3. Formación de aglomerados en el emulgel con tefose

Al eliminar el Auto emulsificador labrasol de la formulación el aspecto de la emulsión parecía más estable debido a que emulgel se notó más homogéneo con respecto a la formulación base, sin embargo a las 24hrs el emulgel se separó lo que sugiere que el labrasol es un excipiente clave en la fase lipídica ver imagen 4.



Imagen 4. Efecto del Labrasol, no se alcanza a estabilizar la emulsión

EL efecto del Poloxámero al estar presente en la formulación hubo una mejor incorporación de la emulsión, sin embargo, al pasar el tiempo se la emulsión de separar y al observar el emulgel sin poloxamero este carece de viscosidad y estabilidad, aunque el Labrasol también probablemente ayude pero no logro estabilizar la emulsión, por lo cual el Poloxamero F68 es un tensoactivo importante que ayuda a la estabilización del sistema. Ver imagen 5.

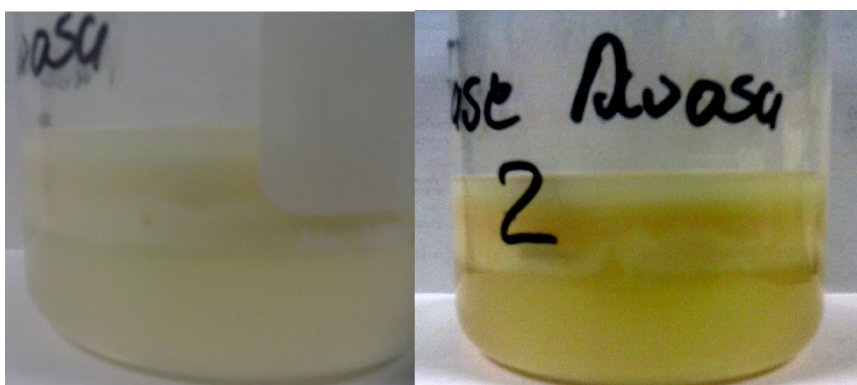


Imagen 5. La imagen de la izquierda muestra una emulsión homogénea con poloxamero, la imagen de la derecha muestra la separación de la emulsión sin poloxamero

El auto emulsificador Labrafac se usa en la fase oleosa ayudando a disolver los

principios activos como la enrofloxacina¹³, el emulgel muestra el mismo comportamiento que la formulación base cuando se omite, se observaron los aglomerados en la agitación que al dejar de agitar precipitaban, pero se aprecia una mayor solubilización de la enrofloxacina indicando que ayuda a solubilizar al principio activo, pero aportando un exceso de fase lipídica, ver imagen 6.

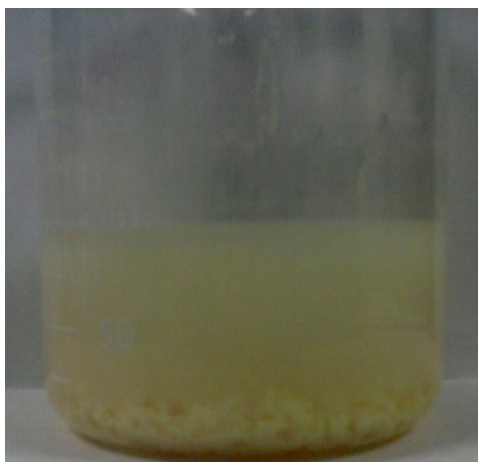
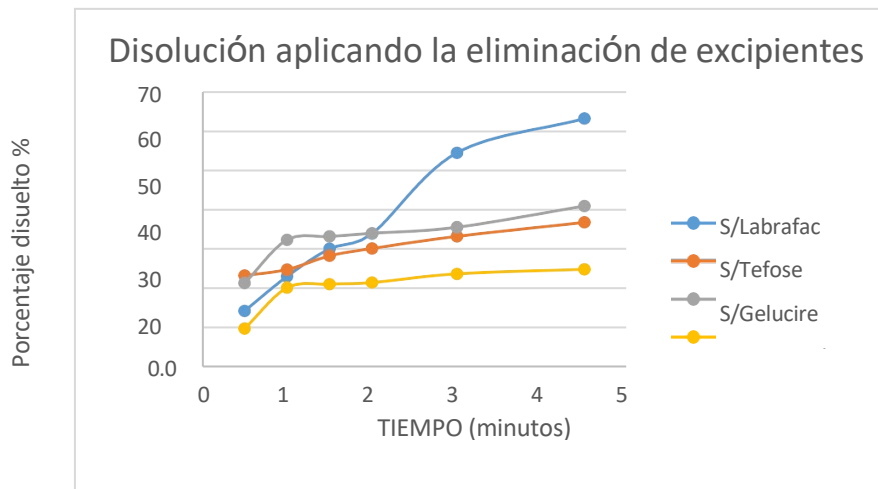


Imagen 6. formación de aglomerados al agregar Labrafac

7.2. Comparación de formulaciones

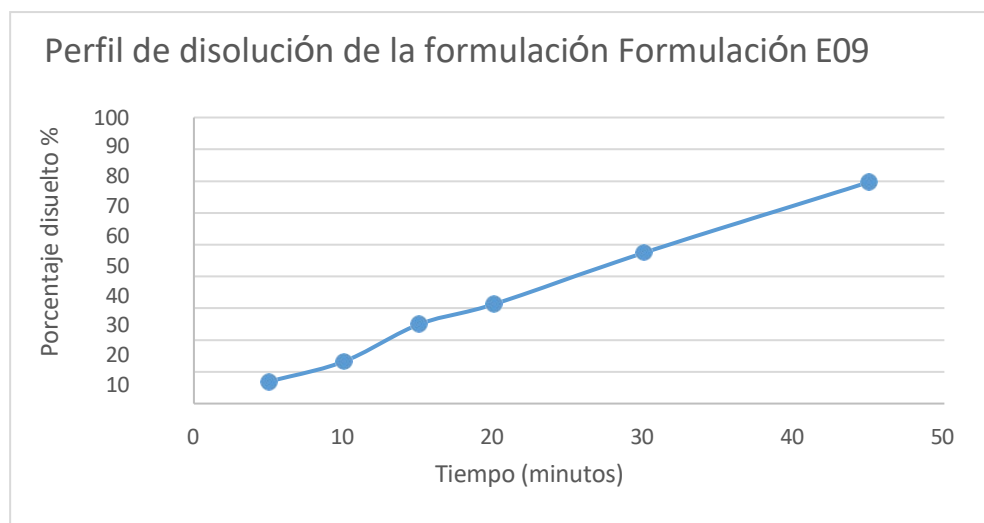
Posterior al análisis de los excipientes autoemulsificantes se decidió eliminarlos algunos de la formulación base, los cuales fueron Labrafac, Gelucire y Tefose. Por otra parte, el Labrasol y Poloxamero F68 mostraban tener atributos críticos para la emulsión ya que sin ellos la emulsión era inestable a las 24hr de su preparación, lo que podría deberse a la elaboración incorrecta de la emulsión, incompatibilidad con los excipientes o un diseño incorrecto de excipientes.

Por lo cual se estableció tener el emulgel con los autoemulsificantes Labrasol, Labrafil y Transcutol debido a que se logra solubilizar la enrofloxacina y se tenía un sistema más estable al contrario de cuando se incorpora Gelucire, Tefose y Labrafac en los que el sistema tenía problemas de disolución en solución 0.1 N de ácido clorhídrico, ver grafica 3.



Grafica 3. Perfiles de disolución de la formulación base, sin gelucire, labrafac y tefose.

Tras eliminar el Gelucire, Labrafac y Tefose del emulgel, denominada como la formulación E09 se observó más estable, menos viscosa que la formulación base y se formaban algunos grumos durante la preparación y el perfil de disolución incremento hasta el 80%, pero no se alcanzaba la disolución al 100% (grafica 4) y la disolución dependía de la superficie de contacto ya que se formaba una especie de “gusano” que no lograba disolverse en su totalidad ver Imagen 7, por lo que se cambiaron las condiciones de elaboración del emulgel



Grafica 4. Perfil de disolución de la formulación sin gelucire, labrafac y tefose



Imagen 7. Formación de forma de gusano. La preparación con forma de gusano no se alcanza a disolver en la disolución

7.2 Condiciones de operación

para la incorporación adecuada de las fases en la emulsión se decidió incrementar la temperatura de las fases de 60°C a 70°C, lo cual tuvo una mejora en la incorporación de las fases ver Imagen 8. Los gránulos transparentes, los cuales se atribuyen a la goma xantana, se incorporaron de manera homogénea.



Imagen 8. Emulsión sin separación de fases al incrementar la temperatura

Además, se incrementó la velocidad de agitación y se observaron cambios en la apariencia. Cuando se cambia el equipo de mezclado con capacidad de 500 rpm, por otro con capacidad de hasta 2000rpm, se observó una mejor incorporación de fases en la emulsión, ver Imagen 9 al contrario de los grumos que se formaron en la formulación E09, a esta nueva preparación se le colocó el ID E10, la cual mostraba un aspecto homogéneo y debido a que la goma xantana se incorporó de manera

homogénea, el emulgel incrementó la viscosidad,

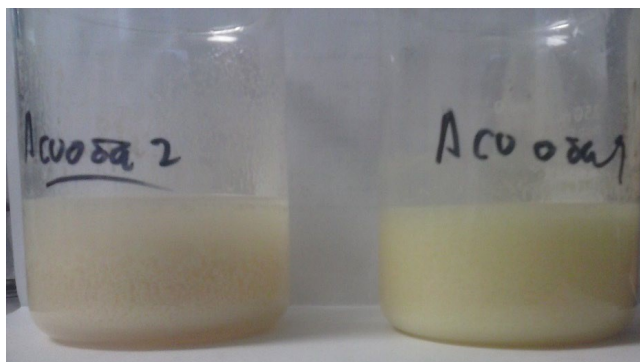
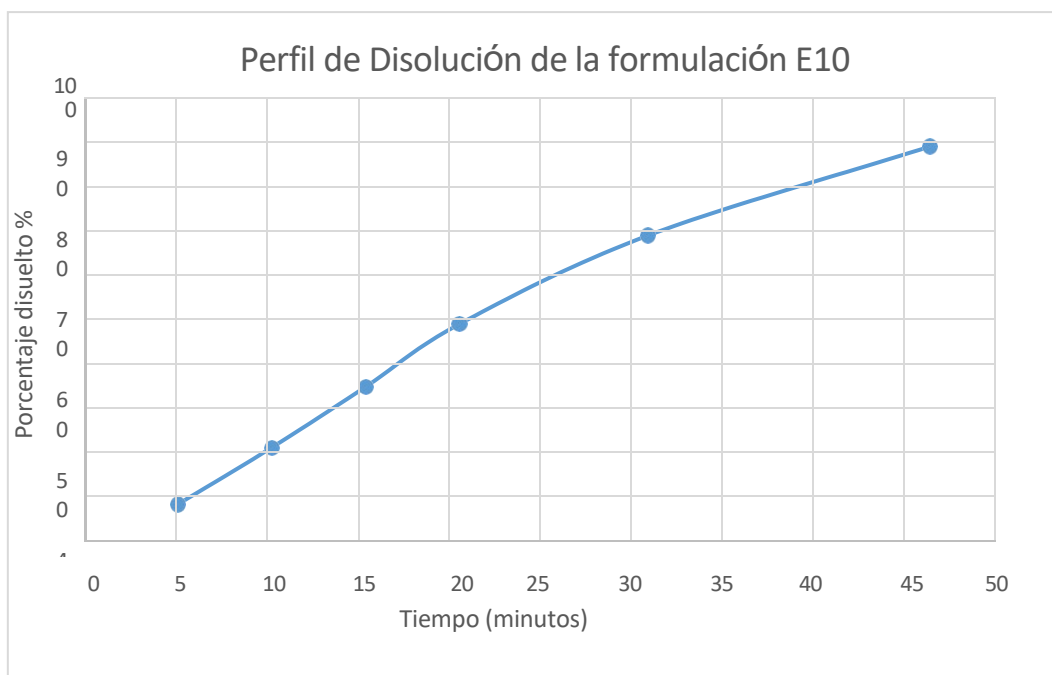


Imagen 9. Izquierda, imagen emulsión con agitación de 500rpm, a la derecha emulsión homogenizada a 2000rpm

El perfil de disolución de la formulación denominada E10 mostró un mejor comportamiento que a diferencia de la formulación base. El perfil liberó más del 90% de enrofloxacin en los 45min ver grafica 5



Grafica 5. Perfil de la formulación E10, la cual tiene un incremento en la temperatura en ambas fases e incrementa la velocidad de agitación de la emulsión.

7.3 Solubilidad de la enrofloxacin en el sistema autoemulsificante

La solubilidad de la enrofloxacin en el sistema auto emulsificante fue de 19.37mg/mL, la cual es mayor que la solubilidad acuosa (0.42mg/mL) y que la del

Labrasol (11.35mg/mL) y Trasncutol (7.96mg/mL) por separado sin embargo se buscaba una liberación del 100% en un tiempo menor.

Para corroborar que el emulgel tuviera un tamaño de partícula óptimo para ser absorbido en el sistema gastro intestinal se diseñó un diagrama de fases ternario para tener evidencias del tamaño de partícula de la emulsión encontrando la combinación óptima de excipientes lipídicos en el emulgel.

7.4 Construcción del diagrama de fases ternario para la preparación del SEDDS

El sistema de excipientes lipofílicos Labrasol, Labrafil y transcutool HP reflejan un mayor incremento en la solubilidad de la enrofloxacin y un tamaño de partícula adecuado para asegurar que la enrofloxacin será absorbida en el TGI (tracto gastro intestinal), por lo cual se realizaron las diferentes combinaciones en un diseño de mezclas o diagrama de fase ternario para determinar el tamaño de gota y así asegurar una micro emulsión, la cual es más estable (Tabla 5).

Tabla 5. Combinación de excipientes autoemulsificantes con valores de 0.1 a 0.75 con el tamaño de partícula obtenido.

Fórmula	Labrafil (g)	Labrasol (g)	Transcutol (g)	d ₉₀
DS1	0.5	0.375	0.125	7.70
DS2	0.5	0.125	0.375	10.58
DS3	0.625	0.125	0.25	9.50
DS4	0.625	0.25	0.125	13.46
DS5	0.75	0.125	0.125	10.62
DS6	0.5	0.25	0.25	7.73
DS7	0.25	0.5	0.25	10.07
DS8	0.25	0.25	0.5	14.13
DS9	0.125	0.75	0.125	10.96
DS10	0.125	0.125	0.75	9.64

Todas las combinaciones de Labrafil, Labrasol y Transcutol mostraban que el tamaño de partícula estaba alrededor de 10µm (tabla 5), sin embargo, la incorporación de altas concentraciones de Labrafil provocaba que el tamaño de

partícula aumentara a más de 15 μm en función de la moda (Gráfica 6). Las formulaciones con alta concentración Labrasol y Transcutol tienen un menor tamaño de partícula. Estas formulaciones con una alta concentración de Transcutol se tornaban transparentes a las 24hrs y en la parte superior de la solución se observaba la separación de fases, a diferencia de las formulaciones con una concentración mayor de Labrafil, las cuales presentaban un aspecto lechoso sin separación de fases de modo visual y al analizar el tamaño de partícula estas tenían un tamaño de gota de $d_{90}=7\ \mu\text{m}$ por lo que se eligió la combinación DS6 para el sistema autoemulsificable que es la que se había estado trabajando. Adicionalmente, la combinación de Labrasol y Transcutol en otros fármacos han mejorado su solubilidad ¹³. Sin embargo, para una formulación semisólida, siempre van acompañados de un excipiente lipofílico para poder proveer la viscosidad, la permeabilidad y la estabilidad de las emulsiones.¹⁴

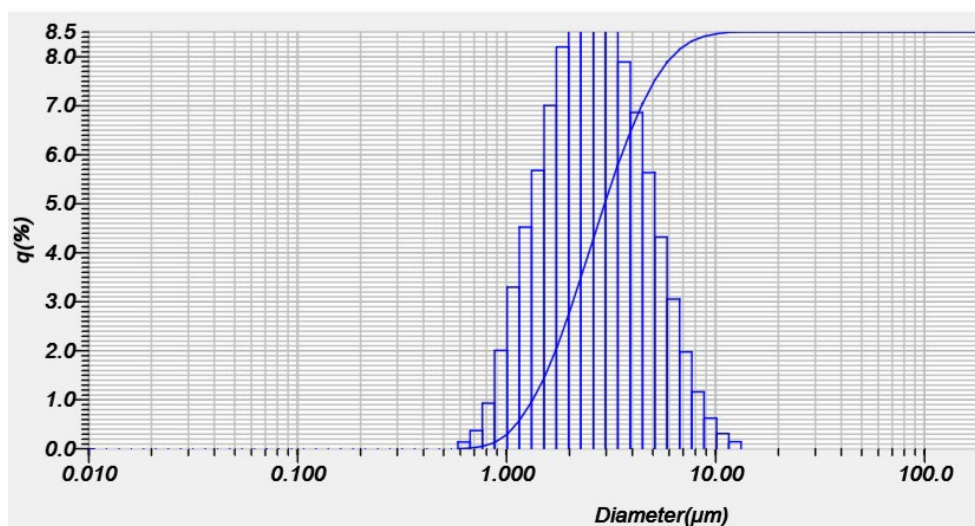


Gráfico 6. distribución del tamaño de partícula del emulgel DS6

7.5 optimización de la formulación Diseño factorial 2²

Al evaluar el emulgel con la fórmula DS6 se observó que el comportamiento del tamaño de gota era uniforme con tamaño de partícula alrededor de los 7 μm . Además, el sistema mejoró la solubilidad de la enrofloxacin, ya que esta estaba completamente homogénea y como la autoemulsificación tiene un tamaño de partícula menor a las 10 μm la enrofloxacin podría ser absorbida con mayor eficacia.

Sin embargo, la formulación no garantiza que la enrofloxacin es adecuada para su

liberación y alcanzar las dosis terapéuticas, por lo cual se decidió comparar el emulgel con las tabletas de enrofloxacin comercial (Baytril) mediante perfiles de disolución. Debido a que en los estudios de excipientes lipídicos se observó que el Poloxámero F68 juega un papel importante como tensoactivo y por sus propiedades para producir fluidos no newtonianos para la estabilidad y la viscosidad del emulgel, así como la goma xantana que está involucrada en la estabilidad y viscosidad, se tomaron estos excipientes para un diseño factorial 2². Los niveles de prueba fueron goma en 0.4g y en 0.8g, Poloxámero F68 en 1g y 2g (Tabla 6).

Tabla 6. Niveles altos y bajos para la goma xantana y Poloxámero F68 en el diseño factorial 2².

Excipientes/ API	Enrofloxacin (g)	Labrafil (g)	Labrasol (g)	Transcutol (g)	Ciclo dextrina (g)	Benzoato de sodio (g)	Etanol (g)	Poloxamero F68	Goma Xantana (g)	Agua:glicerina 1:1 (g)
Control	10	10	5	5	2	0.35	5	1.5	0.8	60.35
DOE1	10	10	5	5	2	0.35	5	1	0.4	61.25
DOE2	10	10	5	5	2	0.35	5	2	0.8	59.85
DOE3	10	10	5	5	2	0.35	5	2	0.8	59.85
DOE4	10	10	5	5	2	0.35	5	1	0.4	61.25
DOE5	10	10	5	5	2	0.35	5	2	0.4	60.25
DOE6	10	10	5	5	2	0.35	5	1	0.8	60.85
DOE7	10	10	5	5	2	0.35	5	1	0.8	60.85
DOE8	10	10	5	5	2	0.35	5	2	0.4	60.25

Al evaluar los perfiles de disolución de las diferentes formulaciones obtenidas del diseño de experimentos se observó en el análisis de variancia (ANOVA) que en la Q =90 la goma xantana tiene el mayor efecto sobre la disolución del emulgel, seguido de la combinación del Poloxámero F68 y goma xantana con un valor-p de 0.0037 y 0.0063 respectivamente (Tabla 7).

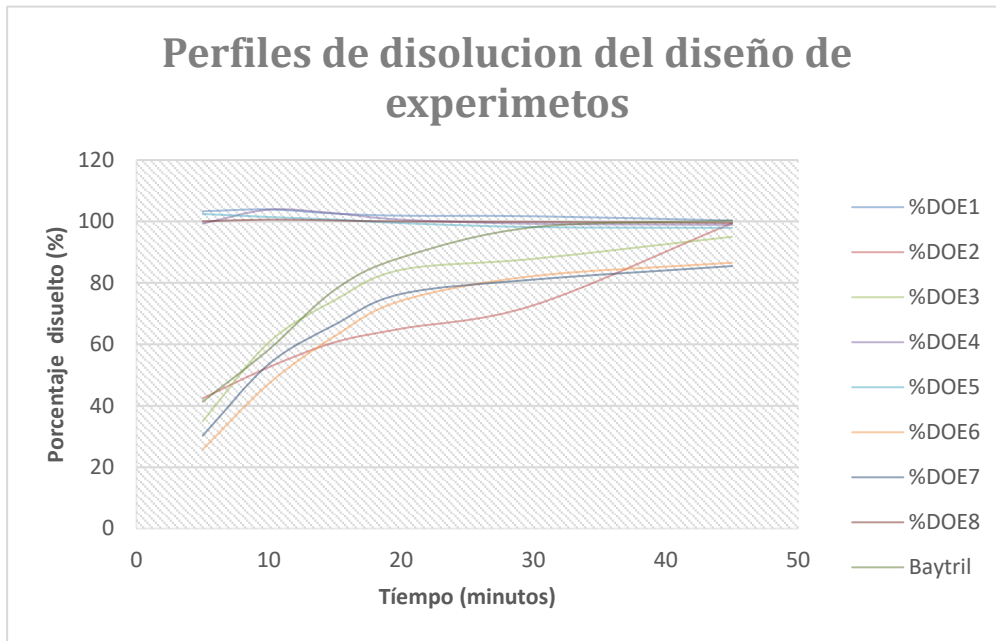
Tabla 7. ANOVA para la disolución Q = 90

Factor	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Poloxámero	47.5313	47.5313	16.61	0.0152
B: Goma Xantana	105.851	105.851	36.99	0.0037
AB	78.7513	78.7513	27.52	0.0063
Error total	11.445	2.86125		

Total (corr.)	243.579			
---------------	---------	--	--	--

En los perfiles de disolución la goma xantana tiene un mayor impacto en la disolución que el Poloxámero F68 sin embargo cuando el Poloxámero se mantiene en su nivel más bajo la disolución depende exclusivamente de la goma xantana y por lo tanto no se obtiene un perfil similar a la tableta Baytril y cuando la goma xantana está en el nivel bajo la disolución se incrementa de manera drástica como en la corrida DOE 1,4,5,8 (Gráfica 7).

Sin embargo, cuando el Poloxámero F68 y la goma xantana están en los niveles altos, (DOE 2 y 3), los perfiles de disolución de ambas formulaciones tienen una pendiente semejante a las tabletas Baytril.



Gráfica 7. Perfiles de disolución de las 8 combinaciones del diseño de factorial.

Al comparar los tiempos del perfil de disolución se observa que las correlaciones no son constantes con el tiempo de disolución debido a que trabajar con la goma xantana tiene la característica de no ser tan predecible en su disolución *in vitro* y al ser combinada con el Poloxámero F68 en su nivel alto hace un diseño factorial con una correlación mayor al 90% a los 5 y 45 min del perfil de disolución, lo cual se confirma en el análisis de ANOVA (Tabla 8).

Tabla 8. Comportamiento de la goma xantana y Poloxámero durante el perfil de disolución.

Tiempo min	Correlación	DER	Valor de F goma Xantana	Valor de F factor AB	Valor de F Poloxámero F68
5	99.5	2.3	758.45	4.71	4.62
10	98.9	1.9	362.83	3.1	0.42
15	96.2	2.3	101.9	0.44	0.03
20	87.4	2.9	27.71	0.05	0.01
30	85.7	2.5	23.84	0	0.14
45	95.3	0.9	36.99	27.52	16.61

El factor AB por otra parte tiene un efecto liberación paulatina entre los 10 y 30 min, físicamente el emulgel pasa de tener la forma de un gusano a una desintegración casi total dando la pauta a que el perfil optimizado con la goma xantana sea predecible (Imagen 10).

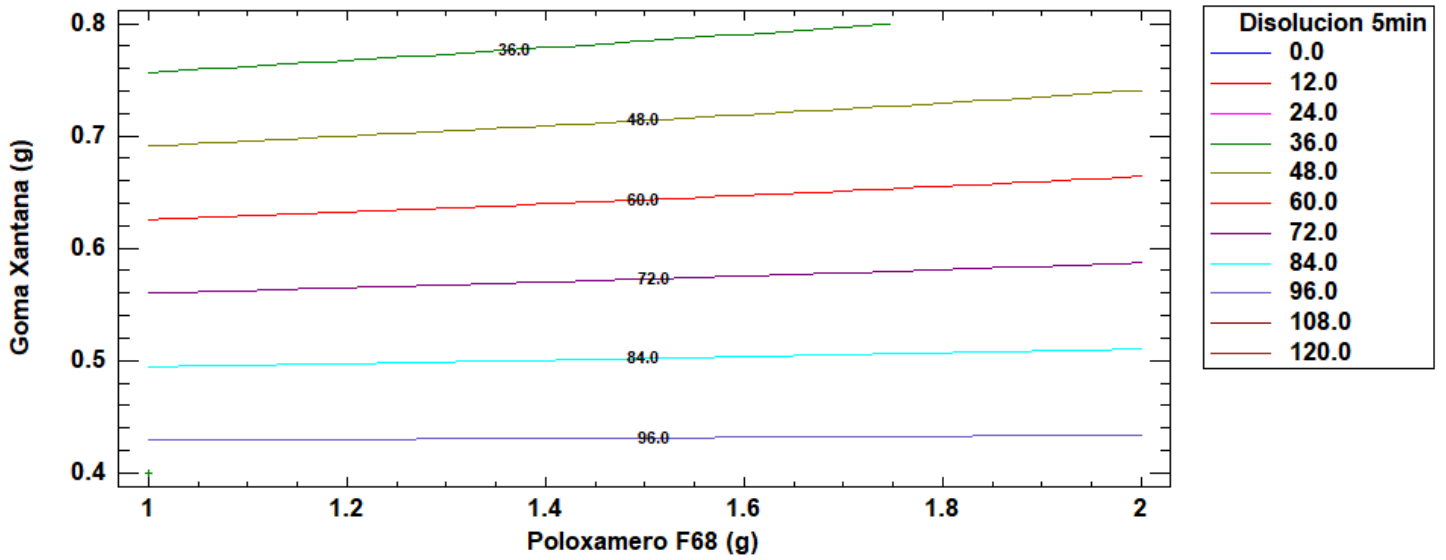


Imagen 10. El emulgel se logra incorporar y tiene una completa disolución en el medio

7.6 optimización de la formulación

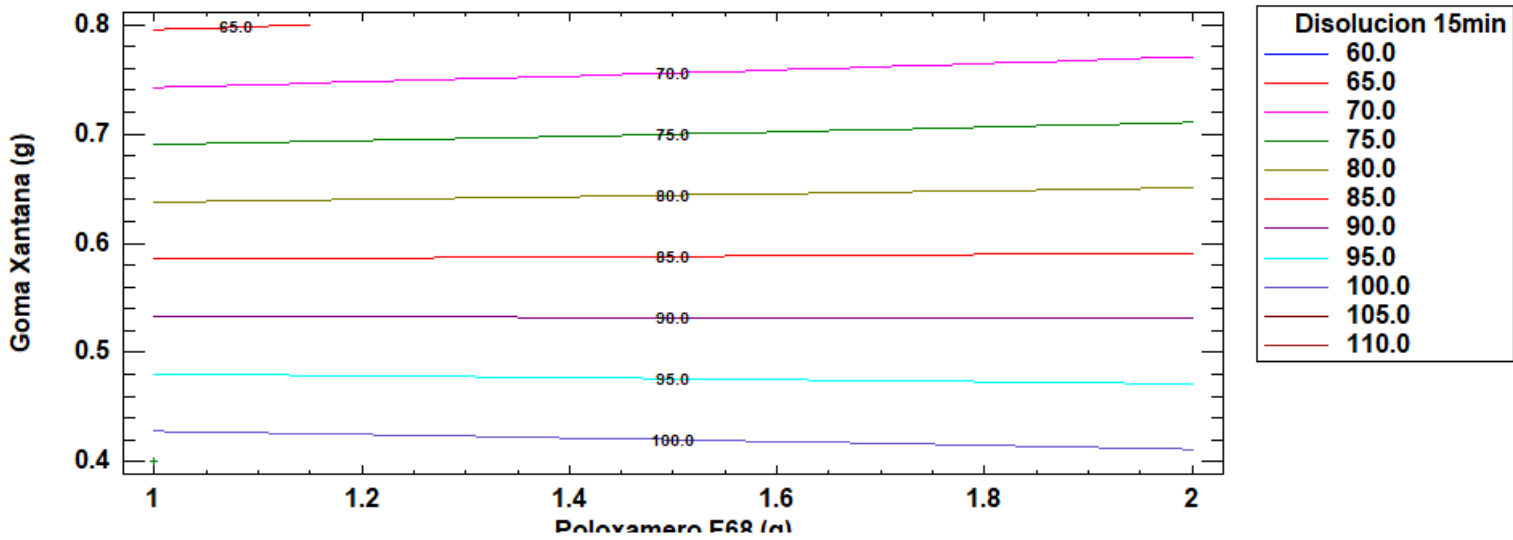
Se realizó un modelo basado en el diseño factorial con el diagrama de superficie de respuesta a los 5, 15 y 45 min, colocando 0.70g de goma xantana y 1g de Poloxámero F68 por cada 100mL de emulgel, para poder buscar una combinación que liberara entre el 35% y 40% de la enrofloxacin en los primeros 5 min (Gráfica 8).

Influencia de Goma xantana/poloxamero F68 en la liberación de enrofloxacina



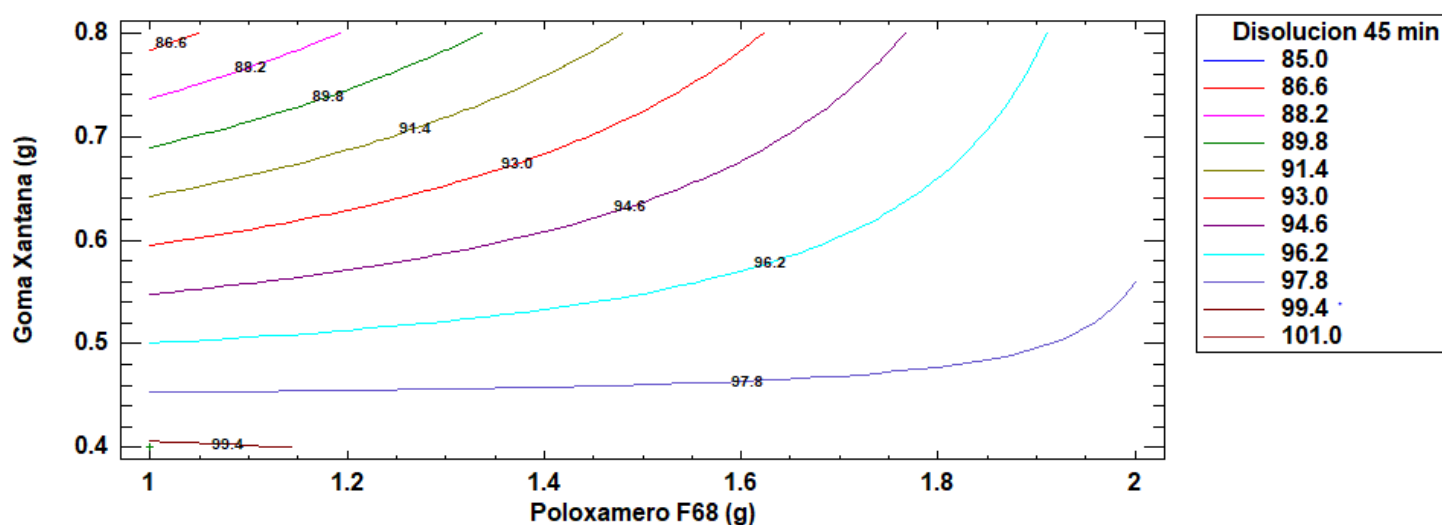
Grafica 8. Diagrama de superficie de contornos a los 5 min de disolución.

Influencia de Goma xantana/poloxamero F68 en la liberación de enrofloxacina



Grafica 9. Diagrama de superficie de contornos a los 15 min de disolución

Influencia de Goma xantana/poloxamero F68 en la liberación de enrofloxacin



Grafica 10. Diagrama de superficie de contornos a los 45 min de disolución

Entre los primeros minutos la liberación de la enrofloxacin depende casi de la goma xantana por lo cual se buscó un valor con el cual la goma xantana mantuviera una liberación entre el 70 y 75 % para los 15 minutos (Grafica 9). Después se buscó que se liberará el 80% (Gráfica 10), pero esta combinación debía ser lo más semejante al efecto de la goma xantana, y el Poloxámero al tener un efecto menor sobre la liberación este no presenta oposición y libera el resto de la enrofloxacin.

Al término de los diseños de experimentos se realiza la formulación del Emulgel con los excipientes indicados en la tabla 9.

Tabla 9. Formulación final para el emulgel de enrofloxacin.

Formulación	
Nombre	Cantidad (g)
Enrofloxacin	10.00
Goma xantana	0.80
Etanol	6.00
Labrasol	4.00
Bisulfito de sodio	0.35
Labrafil	5.00
Poloxamero F68	1.50
Ciclodextrina	2.00
Agua	C.b.p. 100g

7.7 Estudio de estabilidad

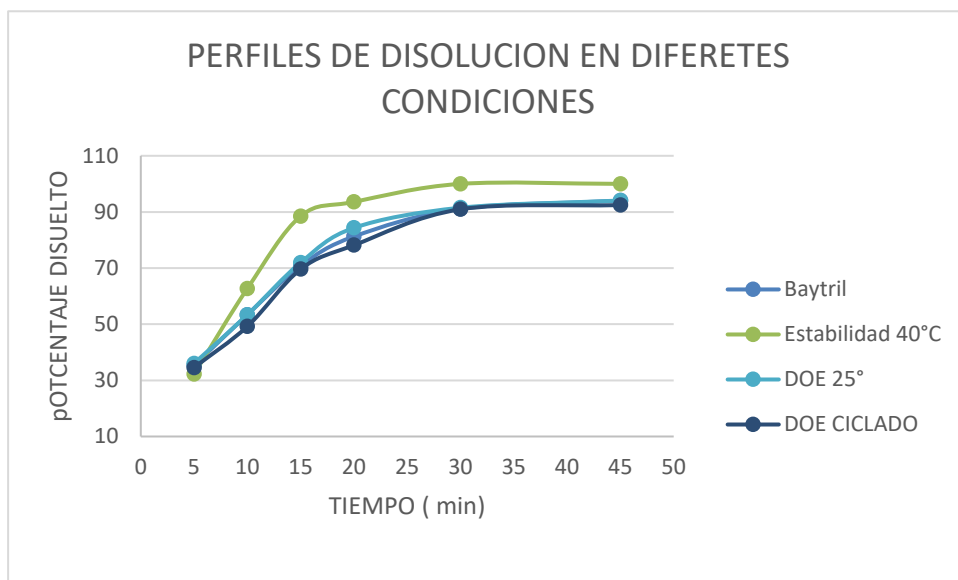
La estabilidad del emulgel desarrollado no se afectó de manera significativa en las condiciones experimentales tanto de manera física como química (Tabla 10).

En todas las formulaciones se observó que las características organolépticas se mantenían, a excepción de la estabilidad del emulgel a 40 °C, la cual se apelmazaba, posiblemente debido a la goma xantana, la cual ha mostrado ese comportamiento, haciendo de la valoración más elevada y al tener un comportamiento no newtoniano se puede aplicar fuerza de cizalla y esta vuelve a las características organolépticas de origen sin embargo se decidió realizar el perfil de disolución con el emulgel sin aplicar fuerza de cizalla.

Tabla 10. Condiciones de almacenamiento y estabilidad aplicadas al emulgel

Evaluación de la estabilidad del Emulgel			
Condición	Tiempo	Valoración	pH
T0	0 días	100.63	6.36
Temperatura 25°C	30 días	102.5	6.30
Test Ciclado	14 días	103.7	6.31
Temperatura 40°C	30 días	102.8	6.33

La nueva combinación tiene un factor calculado de similitud de F2 80.48 en su perfil de disolución y las muestras de control químico no se vieron afectadas. Sin embargo, la muestra de a 40°C incrementa su perfil de disolución, sin embargo, su valoración entra dentro de un rango de $\pm 5\%$ comparado con el tiempo inicial (Gráfica 11).



Gráfica 11. Comparación de las diferentes condiciones de almacenamiento del emulgel contra las tabletas Baytril.

El uso de excipientes lipídicos sin duda incrementan la solubilidad de la enrofloxacin, sin embargo podrían utilizarse de una mejor manera basándonos en estudios de solubilidad para poder tener soluble la enrofloxacin en su totalidad en tan solo estos excipientes (Labrafil, Labrasol) y así poder eliminar la β -ciclodextrina y glicerina. Los excipientes lipídicos son dispersables en agua ya que están compuestos de esteres de polietilenglicol y glicéridos capaces de autoemulsificar al ponerse en contacto con medios acuosos y formar una microemulsion, bajo estos principios se podría reducir los excipientes y por ende tiempo máquina, mano de obra y costos no necesarios por excipientes innecesarios.

8. CONCLUSIONES

- Al término del reporte se lograron eliminar tres excipientes de la formulación base Gelucire, Tefose y Labrafac.
- El emulgel desarrollado demostró ser homogéneo a lo largo de los estudios de estabilidad, bajo condiciones de estabilidad acelerada y ciclado de temperatura, comprobada por los resultados en las disoluciones y ensayos de valoración.
- Se incrementó la solubilidad de la enrofloxaciná con excipientes lipídicos autoemulsificables los cuales daban lugar a la formación de una microemulsión con tamaño de partícula menor de 15µm
- Al modificar las condiciones de operación se produce una formulación en emulgel que cumple con las pruebas de ensayo, disolución y pH, que en comparación con las tabletas comerciales Baytril, muestra un factor de similitud (f2) de 80.48, lo que indica una equivalencia *in vitro* entre las tabletas baytril y el emulgel.
- Por lo tanto, se cumplen con los objetivos planteados realizando un Emulgel que es equivalente con un producto comercial ver tabal 9 demostrando que es seguro y eficaz cumpliendo con las características de calidad atribuibles al producto.

9. REFERENCIAS

1. Agubata, C. O. (2014). Effect of Oil, Surfactant and Co-Surfactant Concentrations on the Phase Behavior, Physicochemical. *Journal of Drug Discovery, Development*, vol 1: 01-07.
2. Ajazuddin, A. A. (2013). Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel . *Journal of Controlled Release*, 122–132.
3. CharanPanigrahi, K. (2018). Gelucire: A versatile polymer for modified release drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102-108.
4. I.Minkov. (2005). Reorganization of lipid nanocapsules at air–water interface: Properties of the formed surface film. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol 44, 167-228.
5. Kale, S. N. (2017). ELF-EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM: A NOVEL APPROACH. *journal in the field of Pharmacy*, vol 8:39-47.
6. Kallakunta, V. R. (2013). A Gelucire 44/14 and labrasol based solid self emulsifying drug delivery system: Formulation and evaluation. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 43-48.
7. Kazutami Sakamoto, R. Y. (2017, Paginas 231-244). *Cosmetic Science and Technology, Surfactants*. Copyright © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.
8. Khorshed, G. S. (2016). Self microemulselfing and non-self microemulselfing liquisolid tablet. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Vol. 6:125-132.
9. NabieeID, R. (2018). In vitro and ex-vivo evaluation of topical formulations designed to minimize transdermal absorption of Vitamin K1. *Journal PLOS ONE* , 1-14.
10. Naisarg Pujara, V. P. (2012). Emulsified gel A Novel approach for delivery of hydrophobic. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, Vol 4 18-23.
11. Papich, M. G. (2016). *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. Copyright © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.
12. Puvačca, N. (2015). *Optimization of Veterinary Antimicrobial Treatment in Companion and Food Animals*. Editorial Office MDPI.
13. S. J. Thakkar Pharmacy College, R. (2012). ELF-EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM: A NOVEL APPROACH. *J Curr Pharm Res*, Vol 4, 18-23 .
14. Santosh Nemichand Kale, S. L. (2017). Emulsion Micro Emulsion and Nano

Emulsion: A Review. *Sys Rev Pharm multifaceted Review journal in the field of Pharmacy*, 39-47.

15. Tessa Troughon, S. L. (2016). A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Journal of Veterinary Medicine*, Vol 6, 40-58.