



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“DISEÑO Y FARMACOCINÉTICA DE UN NUEVO PREPARADO DE LIBERACIÓN
MODIFICADA DE CLINDAMICINA PARA VÍA ORAL EN PERROS”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

ELIZABETH ORTEGA MOLINA

TUTOR PRINCIPAL: DINORAH VARGAS ESTRADA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA.FMVZ. UNAM

COMITÉ TUTOR: LILIA GUTIÉRREZ OLVERA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA.FMVZ. UNAM

MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD
DEPARTAMENTO DE FARMACIA. FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM

MÉXICO, D.F., MARZO DE 2015



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

En especial a mi madre que ha entregado más de su tiempo, su apoyo y su cariño para mi superación profesional y personal.

A mis hermanas Ana Lilia y Alejandra que también me han dado su tiempo y su apoyo.

A mi familia en general, tíos, primos; a mi abuelita, que estuviste en el principio del proyecto y me dijiste que ya no me verías en el examen. Descansa en paz, nena. Siempre te extrañaremos.

A mis amigos de la maestría, incluyendo una gran asesoría por parte de la Dra. Dinorah, a Sara, Claudia Ledesma, Claudia Alarcón, Itzcoatl, Linaloé, Diana, Camilo, etc.

A mis amigas del hospital de la condesa: Carmen, Esther, Eva y Gaby, las quiero.

A César, gracias por estar ahí, te quiero demasiado.

A mi leal amigo Rock, ese pequeño schnauzer que me da mucha alegría.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a la Dra. Dinorah Vargas Estrada ya que sin ella no hubiera podido realizar este trabajo, gracias por su ayuda en la parte experimental, gracias por su asesoría y por su apoyo en estos 2 años de maestría.

A la Laboratorista Felisa González González por su ayuda en la parte técnica durante la metodología.

A los QFB's María Josefa Bernad Bernad y a Jorge Miranda por su asesoría química.

A la MC MVZ Diana Pérez Covarrubias y al MVZ León Arturo Santa Cruz por su ayuda en la parte experimental para la obtención de muestras.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Departamento de Farmacología y Fisiología, incluyendo a mis compañeros con los que llegue a dar clase, ya que fueron de ayuda en los momentos que lo requería.

Al Dr. Luis Ocampo Camberos por aportar material para de la metodología de este proyecto.

A la MPA. MVZ Frida Salmerón Sosa por su asesoría en el análisis estadístico.

A Laboratorios Halvet S.A. de C.V. por la donación del principio activo.

A CONACYT por el apoyo económico durante el periodo de maestría.

RESUMEN

La clindamicina es un antibiótico de elección por su amplia distribución a órganos y tejidos para tratamientos como la osteomielitis, infecciones periodontales y heridas cutáneas. Sin embargo la medicación resulta ser un inconveniente en el caso de tratamientos largos, debido a que la mayoría de los propietarios no tienen la disciplina ni el tiempo para completar el tratamiento, situación que afecta la respuesta terapéutica. Con la administración de un nuevo formulado de liberación modificada se alargará el tiempo de redosificación y reducirá el número de tomas del medicamento. En este contexto, se diseñaron dos formulados orales para perros a una dosis de 20 mg/Kg de clindamicina a base de Hidroxipropilmetilcelulosa + Poloxámero 188 y otro de Hidroxipropilmetilcelulosa + Carbopol, mismos que fueron comparados con un tratamiento control de clindamicina sin excipientes. Las concentraciones sanguíneas del fármaco se determinaron a través del método de difusión en agar, colectadas a diferentes tiempos posteriores a la administración. Se realizó el análisis farmacocinético con ayuda del software pkAnalyst. Con los resultados obtenidos se evaluó la normalidad, mediante la prueba de ANOVA y las diferencias entre grupos por la prueba de Tukey. Efecto logrado gracias a la adición de los excipientes que formaron una matriz polimérica innovadora de liberación modificada de clindamicina, la cual, logró mantener las concentraciones mínimas inhibitorias bacterianas (CMI) hasta por 60 horas a diferencia de la clindamicina de liberación inmediata, que presentó una duración de 12 horas.

PALABRAS CLAVE: Canino, hidroxipropilmetilcelulosa, liberación prolongada, lincosamida.

ABSTRACT

Clindamycin is an antibiotic by choice, because of its wide distribution into organs and tissues, it is used in the treatment of osteomyelitis, periodontal infections and cutaneous wounds; however the medication can be an inconvenient in the case of long treatments, because the owners of dogs does not have the time and the discipline necessary to complete the treatment, affecting therapeutic response. The innovation of polymeric matrix made of hydroxypropylmethylcellulose, poloxamer 188 and-or Carbopol with the addition in different proportions of Clindamycin to the polymeric matrix, will result in modified release formulations, this matrix may lengthen the time of dosages and lower the number of take medicine. Two formulations of 20 mg/Kg orally made of hydroxypropylmethylcellulose with poloxamer 188 and hydroxypropylmethylcellulose with Carbopol were designed; they were compared with a control treatment of clindamycin of conventional release. The clindamycin concentration in the serum was determined by the diffusion method in agar, and the pharmacokinetic analysis was made with the software PKAnalyst. The results were analyzed by the ANOVA test, and the difference between the groups was analyzed by the Tukey test. Both formulations reach clindamycin therapeutic concentrations until of sixty hours with one dose. An Innovative clindamycin design of controlled released was achieve, they obtained antimicrobial effect, and they kept the bacterial inhibitory minimum concentrations (IMC), unlike conventional release clindamycin with a duration of 12 hours.

KEYWORDS: Canine, hydroxypropylmethylcellulose, lincosamides, long-acting, osteomyelitis.

6.2.1.1.3 Hidroxipropilmetilcelulosa.....	36
6.2.1.1.4 Poloxámero 188.....	39
6.2.1.1.5 Carbopol.....	40
6.2. Fase de Laboratorio.....	42
6.2.1 Estudio de preformulación.....	42
6.2.1.1 Estudios estructurales.....	43
6.2.1.1.1 Espectroscopía Infrarroja (IR).....	43
6.2.1.1.2 Calorimetría Diferencial de Barrido.....	44
6.2.1.1.3 Difracción de Rayos X.....	45
6.2.1.2 Propiedades reológicas.....	46
6.3 Fase de formulación.....	51
6.4 Tratamiento y determinación de la actividad de la Clindamicina.....	52
6.5 Análisis farmacocinético.....	53
6.6 Análisis estadístico.....	54
VII RESULTADOS.....	55
7.1 Curva de calibración del clorhidrato de clindamicina.....	55
7.2 Estudios estructurales.....	56
7.2.1 Espectroscopia infrarroja.....	56
7.2.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	57
7.2.3 Difracción de Rayos X.....	58
7.3 Pruebas Reológicas.....	59
7.4 Resultados de Validación del Método Microbiológico.....	62
7.5 Variables farmacocinéticas.....	73
VIII. DISCUSIÓN.....	76
IX. CONCLUSIONES.....	81
X. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estructura química de la clindamicina.....	13
Figura 2 Estructura química de la hidroxipropilmetilcelulosa.....	38
Figura 3 (a) y (b) Microscopía de barrido de Hidroxipropilmetilcelulosa.....	39
Figura 4 Estructura química de Poloxámero 188.....	40
Figura 5 Microscopía de barrido de Poloxámero 188.....	41
Figura 6 Estructura química del Carbopol	41
Figura 7 (a) y (b) Microscopía de barrido del Carbopol.	42
Figura 8 Curva de calibración del clorhidrato de clindamicina.....	55
Figura 9 Espectroscopia Infrarroja del clorhidrato de clindamicina.....	56
Figura 10 Calorimetría diferencial del clorhidrato de clindamicina.....	57
Figura 11 Difracción de Rayos X del clorhidrato de clindamicina.....	58
Figura 12 Gráfica de concentraciones plasmáticas de clindamicina.....	75

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Enfermedades tratadas con clindamicina.....	22
Cuadro 2 Pruebas de Validación.....	27
Cuadro 3 Características del polvo de acuerdo a su Compresibilidad.....	48
Cuadro 4 Relación de propiedades de flujo según Índice de Hausner.....	49
Cuadro 5 Relación del flujo según el Ángulo de Reposo.....	50
Cuadro 6 Composición de los formulados.....	51
Cuadro 6 Variables farmacocinéticas de los 3 formulados.....	47
Cuadro 8 Composición de formulados.....	54
Cuadro 9 Resultados de Densidad Aparente y Densidad Compactada.....	59
Cuadro 10 Resultados de porcentaje de compresibilidad del clorhidrato de clindamicina.....	59
Cuadro 11 Resultado de datos del Índice de Hausner.....	60
Cuadro 12 Valores del Ángulo de Reposo.....	60

Cuadro 13 Valores de Velocidad de Flujo.....	61
Cuadro 14 Valores de Higroscopicidad.....	61
Cuadro 15 Resultados sobre la linealidad.....	62
Cuadro 16 Resultados sobre la exactitud de la curva de linealidad.....	63
Cuadro 17 Resultados sobre la linealidad del método analítico.....	64
Cuadro 18Valores que determinan la curva de linealidad del clorhidrato de clindamicina.....	64
Cuadro 19 Repetibilidad y exactitud del método analítico.....	65
Cuadro 20 Reproducibilidad al quintuplicado.....	66
Cuadro 21 Reproducibilidad entre analistas.....	67
Cuadro 22 Recobro absoluto por quintuplicado.....	68
Cuadro 23Efecto de dilución del clorhidrato de clindamicina.....	70
Cuadro 24 Estabilización de la muestra procesada.....	71
Cuadro 25 Concentración de muestras de clorhidrato de clindamicina.....	72
Cuadro 26 Estabilidad del clorhidrato de clindamicina por 15 días.....	72
Cuadro 27 Variables farmacocinéticas de los 3 formulados.....	74

I. INTRODUCCIÓN

En la clínica de perros es común que se presenten casos de osteomielitis, siendo esta la complicación más grave y frecuente en el tratamiento de las fracturas; otras enfermedades como las periodontales y las heridas cutáneas infectadas; son enfermedades cuyo tratamiento de elección es la clindamicina por su amplia distribución a órganos y tejidos ⁽¹⁾.

Estas patologías requieren de tratamientos crónicos, con una administración de 2 veces al día por vía oral, intramuscular o intravenosa y con un tiempo de tratamiento de hasta 15 o 21 días ^(2,3), sin embargo, la medicación resulta ser un inconveniente debido a que la mayoría de los propietarios no tienen la disciplina ni el tiempo para realizar dicho tratamiento ⁽⁴⁾, no respetan los tiempos de redosificación, lo que afecta la respuesta al tratamiento, esto debido a que la clindamicina es un fármaco considerado bactericida y tiempo-dependiente ⁽²⁾, lo que significa que para lograr su efecto terapéutico, requiere lograr concentraciones 4 veces arriba de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) dependiendo del patógeno, ⁽⁵⁾.

En las últimas décadas, han aparecido un número cada vez mayor de nuevas formas farmacéuticas, se han logrado formulaciones de liberación modificada por parte de la industria farmacéutica que han mejorado el perfil farmacocinético y reducido los efectos adversos de los principios activos, comparados con los fármacos de liberación inmediata o convencional ^(6,7).

Se ha observado un éxito en las formulaciones de liberación prolongada para uso humano, por esta razón también en medicina veterinaria se han venido diseñando, con el fin de

reducir el manejo y el estrés al paciente, además de lograr que se cumpla el efecto terapéutico sin que llegue a ser tóxico ⁽⁸⁾.

Las formas de dosificación de los antibióticos desempeñan un papel crítico para lograr una buena relación farmacocinética-farmacodinamia del antibiótico y mejorar su uso clínico ⁽⁹⁾. Así, un sistema de liberación convencional, produce una liberación inmediata en el organismo, manteniendo las concentraciones plasmáticas terapéuticas efectivas por tiempo variable, con la desventaja de que se requiere administrar varias tomas del medicamento durante todo el tiempo, y en el caso de no cumplirse cabalmente puede ocasionar que los niveles caigan por debajo de los valores de la concentración mínima inhibitoria requerida por los agentes etiológicos infecciosos, o bien, que se genere resistencia o toxicidad ⁽⁶⁾.

En las últimas décadas, tanto en la industria farmacéutica humana como en la veterinaria, se han buscado formulaciones de liberación modificada, la vía oral es la más utilizada debido a que es económica, no requiere la esterilización del producto y además si se utiliza un vehículo adecuado, se puede controlar tanto la velocidad y el sitio de liberación en el tracto gastrointestinal ^(9,10).

Una liberación efectiva del principio activo requiere una fácil desintegración de la tableta en fluidos del tracto gastrointestinal, dependiendo de la vía de administración a la que se destine. Un comprimido que no se disgregue adecuadamente limitará la disolución y absorción del fármaco y, en consecuencia, la respuesta terapéutica no será la esperada.

Generalmente, la disgregación de un comprimido incluye las siguientes etapas:

1. Humectación del comprimido.

2. Penetración del disolvente en el espacio poroso.
3. Absorción de agua e hinchamiento del disgregante.
4. Ruptura del comprimido en gránulos debido al hinchamiento.

El tipo de desintegración de una tableta está controlado por un conjunto de factores experimentales independientemente que incluyen el tipo de aglutinante, el uso de lubricantes, el tipo y cantidad de disgregante y la fuerza utilizada en el proceso de compresión ⁽¹¹⁾.

La liberación modificada comienza con la hidratación del polímero una vez que entra en contacto con el agua, posteriormente forma una solución concentrada alrededor de la cápsula que hace alusión a una capa de gel. Esta capa actúa simultáneamente como una barrera de difusión/erosión para la liberación del fármaco ⁽¹²⁾.

Las propiedades fisicoquímicas del polímero, están estrechamente relacionadas con su capacidad para hidratarse rápidamente y proveer al gel de suficiente integridad mecánica.

En las formulaciones orales se puede lograr este efecto debido a las características fisicoquímicas que tienen los polímeros en una formulación final, por ejemplo, los fármacos que están diseñados con una cubierta entérica, pueden liberar el fármaco directamente en el intestino delgado, esto permite proteger al estómago de la acción del fármaco y al mismo tiempo proteger el fármaco de la acción del medio gástrico ⁽¹⁰⁾.

Las formas de liberación modificada pretenden proporcionar concentraciones plasmáticas casi constantes en periodos de tiempo prolongados, disminuyendo la velocidad de absorción del fármaco ⁽¹³⁾.

Se ha reportado una gran variedad de sistemas de liberación modificada mediante formas farmacéuticas recubiertas ⁽¹²⁾.

La tecnología se aprovecha de este tipo de sistemas para su elaboración, que se enfatiza generalmente en los avances de la ciencia, un ejemplo es el uso de los polímeros y el conocimiento sobre sus características fisicoquímicas y el comportamiento que adquieren en las formulaciones ⁽¹³⁾.

Las matrices de Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) son muy utilizadas por los formuladores, debido a sus propiedades de hinchamiento y solubilidad que permiten la interacción fármaco-polímero en este tipo de sistemas de liberación ⁽¹⁴⁾. Son excipientes que poseen una elevada capacidad de gelificación ^(15, 16, 17) y a su vez tiene un efecto en la cinética de liberación del fármaco incorporado en un sistema farmacocinético ⁽¹⁸⁾.

Los Poloxámeros son usados principalmente en formulaciones farmacéuticas de liberación modificada ⁽¹⁹⁾.

Por otro lado, los carbómeros se caracterizan por contener un material bioadhesivo, se consideran para liberación modificada y como modificadores de las características reológicas, principalmente ⁽²⁰⁾.

El objetivo del presente trabajo fue formular dos matrices poliméricas utilizando como base la hidroxipropilmetilcelulosa, Poloxámero y otra matriz polimérica con Carbopol en diferentes proporciones y mezclas.

II. ANTEDECENTES

2.1 Clindamicina

2.1.1 Monografía

La clindamicina es un derivado del ácido *trans-L-4-n-propilhigrínico*, un aminoácido, que está unido a un derivado de una octosa que contiene azufre. Pertenece al grupo de la familia de la lincomicina y es producido por *Streptococcus lincolnensis* var. *lincolnensis* ⁽²¹⁾. La sustitución del grupo hidroxilo en el carbono 7 de la molécula de lincomicina por un átomo de cloro da como resultado una mayor actividad antimicrobiana de la clindamicina. La estructura del clorhidrato de clindamicina tiene un pH de 3 – 5.5 y pK_a de 7.6 ⁽⁴⁾. (Figura 1)

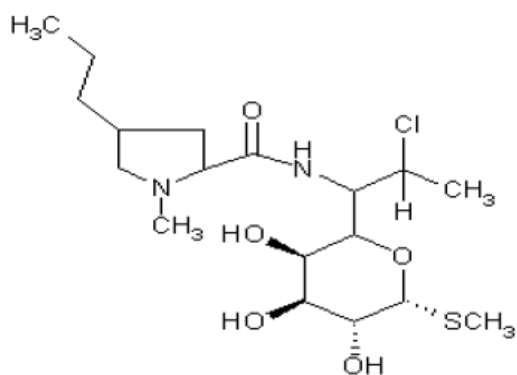


Figura 1: Estructura química de la clindamicina

2.1.2 Farmacocinética

La clindamicina posee una alta distribución a órganos y tejidos, es de baja toxicidad, pero posee un efecto terapéutico muy reducido en el organismo, ya que su tiempo de efecto es de 12 horas ⁽²⁾.

La clindamicina se absorbe mejor que la lincomicina en el tracto gastrointestinal, tanto en los seres humanos como en los animales, produce concentraciones más elevadas en el suero (Cmax de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$), y es más activa que la lincomicina debido a la sustitución del radical hidróxilo por cloro ⁽²²⁾.

La vida media de la clindamicina es de casi 2.9 h y de este modo se administra a intervalos de seis horas ⁽²⁾.

A diferencia de la lincomicina, la presencia de alimento no parece afectar la absorción oral de la clindamicina. Existe una buena penetración en las secreciones respiratorias, al fluido pleural, la próstata, los huesos y las articulaciones, y posee una baja penetración en el líquido cefalorraquídeo. Las concentraciones de clindamicina en los fagocitos son de 10-20 veces superiores a las concentraciones del plasma ⁽²³⁾.

La clindamicina ingresa a los macrófagos mediante un mecanismo de transporte activo y la concentración intracelular del principio activo en los macrófagos es 50 veces superior a la concentración extracelular ⁽²¹⁾. La clindamicina atraviesa la barrera placentaria, pero su seguridad durante la gestación todavía no se ha determinado ⁽²⁴⁾.

El clorhidrato de clindamicina no requiere un proceso metabólico para activarse cuando se administra por vía oral, sin embargo el fosfato de clindamicina requiere una hidrólisis, que tiene lugar en el plasma, para ser activo ⁽²²⁾.

Se sabe que la clindamicina se une a las proteínas plasmáticas en un 90% ⁽²⁾. En el perro, el 36% de la dosis administrada se excreta sin cambios en la bilis y la orina. Se elimina un 90% por vía biliar y un 10 % por vía renal. El 28% de la dosis es excretada por el hígado en forma de glucurónido (sin actividad antimicrobiana), un 28% se elimina como sulfóxido de clindamicina (que conserva sólo un 25% de la actividad antimicrobiana del antibiótico original) y el 9% es eliminado como *N-desmetil-clindamicina* la cual tiene de 4-8 veces la actividad antimicrobiana del compuesto original⁽³⁾. La vía biliar es la principal ruta de excreción ⁽²⁾.

2.1.3 Farmacodinamia

La clindamicina se liga exclusivamente a la subunidad 50s de los ribosomas bacterianos y suprime la síntesis proteínica. Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo por el que inhibe la síntesis de proteína, parece que inhiben a la peptidil-transferasa, interfiriendo en la unión del sustrato aminoacil-ARNt al sitio *A* de la subunidad ribosómica ⁽⁴⁾.

2.1.4 Espectro

La clindamicina es mucho más utilizada que la lincomicina debido a su mayor actividad frente a microorganismos anaerobios, tal como *Bacteroides spp.*, debido a su mayor potencia antibiótica y por su mejor absorción oral. La clindamicina es hasta 20 veces más potente que la lincomicina en el tratamiento de infecciones producidas por *Staphylococcus* y *Streptococcus* en el ser humano ⁽²¹⁾.

La clindamicina es una buena opción para el tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos anaerobios en las pequeñas especies, su espectro de actividad incluye a *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium spp*, *Streptococcus spp* y *Clostridium perfringens* ⁽²³⁾.

La clindamicina es también activa frente a microorganismos aerobios tal como *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Actinomyces spp*, *Nocardia spp*, *Mycoplasma spp* y *Toxoplasma spp* ⁽²³⁾.

2.1.5 Efectos Adversos

En general la clindamicina se considera un antibiótico poco tóxico. El efecto secundario más serio en el ser humano es la colitis pseudomembranosa causada por el crecimiento desmedido de *Clostridium difficile* ⁽²³⁾ con una incidencia publicada de un 2 al 20%. Sin embargo la colitis pseudomembranosa no se ha observado en los animales. En perros y gatos se han reportado sólo casos leves de vómitos y diarrea ⁽²²⁾. En rumiantes, caballos, conejos y roedores sí se han observado trastornos gastrointestinales. Los gatos pueden ser renuentes en aceptar la administración oral de la clindamicina por su mala palatabilidad ⁽²⁾.

2.2 Liberación Modificada

Se define como liberación modificada a cualquier forma de dosificación que permita liberar el fármaco durante un periodo de tiempo prolongado (constante, sostenida o prolongada). Se implica que el sistema es capaz de proporcionar algún tipo de control terapéutico, que puede ser de tipo temporal, espacial, o ambos tipos a la vez. Se entiende así que la liberación temporal es el control de la velocidad de liberación del fármaco ⁽²⁵⁾. Liberación modificada, se define como aquella presentación farmacéutica en las que la velocidad y el

lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas son diferentes al de la forma farmacéutica de liberación convencional, administrada por una misma vía ⁽⁶⁾.

Existen numerosas clasificaciones basadas en la forma de liberar el fármaco o bien en los mecanismos que gobiernan dicha liberación: tales como, sistemas de liberación acelerada, sistemas de liberación diferida, sistemas de liberación prolongada y sistemas flotantes o bioadhesivos ⁽⁶⁾. Teniendo en cuenta estos factores, es posible conseguir sistemas de liberación que actúen lentamente y de forma continua durante largos periodos de tiempo ⁽⁹⁾.

En los últimos años han aparecido un número cada vez mayor de nuevas formas farmacéuticas o de liberación modificada, que se presentan como dispositivos que aportan mejores pautas posológicas, mejor perfil farmacocinético e incluso reducción de efectos adversos ⁽⁶⁾.

La velocidad de liberación del fármaco, está prácticamente modificada por las propiedades de los excipientes que se incluyen en la formulación, aunque también existen otros factores tales como el pH del medio en el que se va a realizar la liberación ⁽⁶⁾.

Por la vía oral, se han hecho intentos para mantener los sistemas de liberación en el tracto gastrointestinal durante largos periodos de tiempo; por medio de vehículos que se adhieren a las paredes del estómago; tabletas y cápsulas que flotan en los fluidos del tracto gastrointestinal o con formas y tamaños diferentes que logran retener por un tiempo más prolongado al principio activo. Los sistemas de liberación modificada emplean

recubrimientos de distintos espesores y tamaños, para alcanzar un tiempo de tránsito más predecible y reducir el peligro de dosis efectivas ^(6, 9, 10).

En general, se considera ideal una cinética de liberación de orden cero, para cualquier sistema de liberación. Se debe tener en cuenta que cinéticas que *in vitro* son de orden cero, no necesariamente *in vivo* deben tener una cinética de orden cero. Esto sólo ocurrirá si el tracto gastrointestinal se comporta como un modelo de comportamiento único, que significaría que todos los segmentos a lo largo del tracto gastrointestinal fueran homogéneos respecto a la absorción y la liberación del fármaco. Se puede considerar que el tiempo de liberación del fármaco es la etapa limitante de la velocidad en el proceso de absorción ⁽²⁵⁾.

La liberación oral ofrece una accesibilidad excelente, de modo que los sistemas de liberación de fármacos pueden ser incorporados y eliminados con facilidad. La adhesión a la mucosa se puede conseguir empleando un polímero o la combinación de polímeros, tal como la Hidroxipropilmetilcelulosa, pues presenta propiedades adhesivas en contacto con la saliva ⁽²⁶⁾.

2.3 Excipientes (Polímeros)

Para lograr un buen formulado de liberación modificada es importante evaluar cuidadosamente las propiedades físico-químicas del fármaco y de los excipientes, esta evaluación se basa en las características del sistema de liberación y en la fisiología y/o anatomía de la zona de aplicación en el organismo ⁽²⁷⁾.

Así pues, se deben conocer algunas propiedades de los materiales, tales como propiedades organolépticas (color, olor); densidad (densidad verdadera, densidad compactada, entre otras); forma cristalina (si la tiene) ⁽²⁰⁾. En el presente trabajo, con el fin de realizar la mezcla de los ingredientes del formulado se utilizó la granulación, la cual se alude en el siguiente apartado.

Como ya se mencionó, el uso de los excipientes tales como hidroxipropilmetilcelulosa, carbopol y poloxámero 188, logra un efecto de liberación modificada debido a sus características bioadhesivas o de retención gástrica.

Cabe mencionar, que la combinación de hidroxipropilmetilcelulosa y carbopol como polímeros mucoadhesivos, adicionados en un mismo formulado, ya se ha reportado en la literatura ⁽²⁸⁾. En correspondencia con este argumento, en seguida se listarán algunas de las publicaciones que se han realizado sobre el uso de estos excipientes.

En un estudio, se reportó la formulación de tabletas flotantes, no efervescentes de liberación controlada de glipizida fueron desarrolladas utilizando polímeros en forma de gel como hidroxipropilmetilcelulosa y carbopol ⁽²⁹⁾.

En otro estudio, Ximing Liu, menciona que la hidroxipropilmetilcelulosa es usada frecuentemente para productos de liberación sostenida, y que no es sensible a ningún tipo de pH y que además es compatible con el carbopol, al diseñar un gel de tolterodina para los seres humanos ⁽³⁰⁾.

En el estudio de Ahmed, se menciona que se utilizó hidroxipropilmetilcelulosa y carbopol para la elaboración de un parche transdermal para la especie humana ⁽³¹⁾.

En el estudio de Mukherjee se experimentó la combinación de excipientes para un formulado de liberación modificada de ofloxacina en ratas, el cual tiene características mucoadhesivas de retención gástrica por ciertos polímeros biodegradables: hidroxipropilmetilcelulosa con carbopol ⁽³²⁾.

La combinación de hidroxipropilmetilcelulosa con poloxámero 188 también es referida en la literatura como a continuación se presenta:

Mansour refiere en un estudio experimental, el uso de poloxámero con hidroxipropilmetilcelulosa, que es un formulado gelificante de clorhidrato de ciprofloxacina de liberación controlado para su uso en la córnea ⁽³³⁾.

Por otro lado, Radivojša, reportó la adición de hidroxipropilmetilcelulosa con poloxámero 188 para un formulado gelificante por vía subcutánea de heparina de liberación prolongada, con el cual obtuvo una liberación de 9 días ⁽³⁴⁾.

2.4 Granulación

La granulación es un proceso de aglomeración de partículas primarias de polvo para formar estructuras mayores denominadas gránulos. Generalmente, este granulado se utiliza como producto intermedio en la fabricación de comprimidos y cápsulas, aunque también puede ser empleado como producto final ⁽³⁵⁾.

Las principales razones por las cuales se recurre a la granulación en una mezcla de polvos son las siguientes:

- Prevenir la segregación de sus componentes.

- Mejorar las propiedades de flujo.
- Mejorar las características de compactación.

La preparación de un granulado puede realizarse por vía seca o vía húmeda según se adicione o no, un solvente a la mezcla de polvos. La elección del método de granulación dependerá por un lado de la aplicación que se quiera dar al granulado y por otro de las propiedades físico químicas del principio activo y de los excipientes de la formulación, en particular de su sensibilidad a la humedad y al calor ⁽³⁶⁾.

En el presente proyecto, la técnica que se realizó para mezclar los excipientes fue por medio de granulación seca. La técnica de granulación seca es también conocida como “granulación por doble compresión”, se produce mediante la agregación de los componentes en polvo sometidos a alta presión seguida de una fragmentación o troceado y la posterior granulación mediante tamización para conseguir el tamaño de granulo deseado. Esta vía se puede utilizar como alternativa a la vía húmeda cuando el fármaco que se va a granular llega a ser alterado por la humedad, a los líquidos de granulación, o no es estable a altas temperaturas de secado. Sus principales inconvenientes son que la mezcla debe presentar ciertas propiedades cohesivas, la formación de polvo y la baja reproducibilidad en las propiedades finales del granulado ⁽³⁵⁾.

2.5 Uso terapéutico de la clindamicina

Las enfermedades que son tratadas en perros por medio de clindamicina se muestran en el cuadro 1

Cuadro 1: Enfermedades en perros tratadas comúnmente con clindamicina

ENFERMEDAD	AGENTE ETIOLÓGICO	Referencias bibliográficas
Osteomielitis	<i>Staphylococcus aureus</i> ⁽³⁷⁾	38
Enfermedad periodontal	<i>Staphylococcus spp</i> <i>Streptococcus spp</i> ^(38,39)	40,41,42,43,44
Infecciones cutáneas	<i>Staphylococcus</i> <i>pseudointermedius</i> ⁽⁴⁵⁾	46,47

2.6 Fisiología digestiva del perro.

Una vez que el medicamento administrado por vía oral es absorbido a través del tracto gastrointestinal, es necesario comprender la fisiología digestiva de la especie por estudio. En líneas generales, se presenta un breve resumen de la digestión canina.

La digestión es la función primaria del tracto gastrointestinal, que consiste en la degradación de los grandes compuestos de los alimentos hasta formar partículas más sencillas que puedan ser absorbidas en el tracto digestivo, transportadas a los tejidos y utilizadas para el mantenimiento, reparación, crecimiento o aporte de energía ^(48,49).

Existen dos tipos de digestión: digestión mecánica y digestión química. La digestión mecánica implica la masticación por medio de los molares, mezcla y desplazamiento del

alimento por el tracto gastrointestinal y favorecidos por contracciones de las paredes intestinales llamados movimientos peristálticos ^(48,49, 50). La digestión química consiste en la hidrólisis de los enlaces con catálisis enzimática. Los tres tipos de nutrientes que requieren digestión son los lípidos o grasas que son hidrolizadas hasta glicerol, ácidos grasos libres y algunos monoglicéridos y diglicéridos; los carbohidratos complejos que se hidrolizan a azúcares simples como glucosa, galactosa y fructosa; y las proteínas que se hidrolizan hasta aminoácidos. ^(48,49, 50).

El proceso comienza por la boca, donde se segrega saliva, la saliva actúa como un lubricante para facilitar tanto en masticación como en deglución y solubiliza los componentes que estimulan las papilas para conferir el sabor ⁽⁴⁹⁾. El perro cuenta con 4 pares de glándulas salivares: las parótidas, situadas delante de cada oreja, las sublinguales, ubicadas bajo la lengua, las mandibulares, debajo de la mandíbula inferior y las zigomáticas, situadas sobre la mandíbula superior debajo del ojo ⁽⁵¹⁾. Los perros disponen de una dentadura adecuada, como corresponde a una configuración carnívora, para desgarrar, roer y masticar sus alimentos ⁽⁴⁸⁾. El número de dientes del perro son 42 ⁽⁵⁰⁾.

El alimento pasa desde la boca hasta el estómago a través del esófago ^(48,49). Es un tubo relativamente corto. Las células de la capa mucosa secretan un moco que contiene mucina para lubricar al bolo alimenticio y así se facilite su desplazamiento al estómago ^(48,49, 50). La presencia de los alimentos estimula los movimientos peristálticos de las paredes del esófago que los conducen hasta el estómago. En la base del esófago, a su entrada en el estómago, existe un anillo muscular, conocido como esfínter del cardias ^(48, 49, 52). Cuando el alimento llega al término del esófago, el cardias se relaja y permite su entrada al estómago. Este

anillo se relaja en respuesta a los movimientos peristálticos del esófago, pero una vez el alimento en el estómago, se ejerce una presión que no da lugar a la relajación, sino por el contrario, se contrae para prevenir el reflujo del contenido gástrico ^(48,52).

El estómago participa en las fases iniciales de la digestión con la secreción de ácido clorhídrico y de pepsinógenos. Los músculos del antro pilórico trituran las partículas alimentarias y el movimiento peristáltico se desplaza desde el cuerpo del estómago al antro en dirección a un píloro que suele estar parcialmente cerrado. A continuación, un fuerte movimiento retrógrado desplaza los alimentos de nuevo hacia el antro proximal, con lo cual se trituran hasta quedar convertidos en partículas lo suficientemente pequeñas como para pasar por el píloro. El vaciado gástrico puede iniciar de 15 a 30 minutos luego de que se administra la comida y puede tardar en vaciarse de 1 a 4 horas ^(51,53).

Las principales enzimas digestivas del estómago del perro son la pepsina y la lipasa. La pepsina inicia la digestión de las proteínas y la convierte en péptidos, y desarrolla su función en condiciones óptimas cuando el pH es de 2.0, de modo que su función disminuye cuando los alimentos llegan al intestino delgado. Su actividad es más importante en la digestión de las proteínas cárnicas que en las vegetales.

La lipasa gástrica contribuye a descomponer los ácidos grasos de cadena larga, pero, comparada con la lipasa pancreática, su contribución resulta muy pequeña.,

La mayor parte de la digestión enzimática de los alimentos se produce en el intestino delgado que se divide en duodeno, yeyuno e íleon. El intestino delgado del perro presenta

una longitud que oscila entre los 1.8 y los 4.8 m ⁽⁵¹⁾. El intestino está cubierto por enterocitos, los cuales sufren un recambio celular completo de 3 a 6 días ⁽⁵³⁾.

La motilidad del intestino delgado mezcla el paso del contenido y lo desplaza en una dirección. Las contracciones rítmicas hacen más lento el movimiento, mientras que el peristaltismo empuja el contenido en dirección opuesta a la boca, de modo que existe una coordinación de efectos “de rotura y aceleración”. La duración de la transferencia de los alimentos al intestino delgado en el perro parece oscilar entre una y tres horas ^(51,53).

El intestino grueso está compuesto por el colón, el ciego y el recto. El de un perro de tamaño medio tiene una longitud de 0.6 m. La principal función del colón es la absorción de electrolitos y agua, y la fermentación bacteriana de los nutrientes que no han sido absorbidos. Los alimentos no digeridos permanecen aproximadamente 12 horas en el intestino grueso del perro, aunque depende de la composición de los alimentos, sobretodo de la cantidad y el tipo de fibra ⁽⁵³⁾.

2.7 Validación de Métodos Microbiológicos

La validación es un requisito con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo método microbiológico; sin embargo, los métodos descritos en farmacopeas u otros textos oficiales se consideran validados, aunque debe aclararse que ellos se refieren solamente a métodos generales y a materia primas. Estos no precisan la validación, aunque deben de ser comprobados antes de su utilización rutinaria con la verificación de la idoneidad en las condiciones del laboratorio ⁽⁵⁴⁾.

En la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 se establecen las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, tales requisitos a los que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas, misma que establece lo que a continuación se refiere ⁽⁵⁵⁾. Esta Norma Oficial Mexicana se refiere al área farmacológica para la especie humana, sin embargo para la medicina veterinaria a pesar de que no existe una Norma como tal, que establezca y obligue realizar este tipo de pruebas de validación, fueron realizadas como a continuación se presenta.

Se define como método analítico, a la adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado. La validación de un procedimiento analítico es un procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño (exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo de linealidad) que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales ⁽⁵⁶⁾.

La valoración microbiológica de antibióticos es un método analítico que permite bajo las condiciones adecuadas demostrar la actividad (potencia) de los antibióticos por medio de su efecto inhibitor sobre los microorganismos. Su métodos general es la valoración en difusión en gel en agar (cilindro placa).

Básicamente en los dos métodos la potencia de un antibiótico se estima mediante la comparación de la actividad de un producto (problema) y la de una muestra estándar de referencia (patrón) en presencia de un microorganismo testigo ⁽⁵⁷⁾.

A partir del criterio de que no existe un modelo único para validar y de que existe una gran variedad de métodos microbiológicos, la validación de los métodos microbiológicos se fundamentan en diversos parámetros.

2.7.1 Pruebas de Validación

Los criterios de aceptación para cada prueba de validación del clorhidrato de clindamicina se observa en el cuadro 2.

Cuadro 2: Pruebas de validación para clorhidrato de clindamicina

PRUEBAS DE VALIDACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Linealidad del método	El coeficiente de correlación (r) debe ser mayor o igual 0.99.
Exactitud de la curva de linealidad	Para cada punto de la curva el %CV y %DEA deberán ser menores o igual al 15% excepto para el valor más bajo, que puede ser hasta del 20%
Repetibilidad	El coeficiente de variación no debe ser mayor del 15 %
Reproducibilidad	El coeficiente de variación no debe ser mayor del 15%
Exactitud	El valor promedio de las desviaciones absolutas de las determinaciones en cada nivel de concentraciones de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro de $\pm 15\%$ del valor nominal de

	concentración
Selectividad	No deben existir interferencias en el tiempo de retención del compuesto a cuantificar
Límite de detección	La concentración obtenida, cumple con los criterios de precisión y exactitud. El %CV no debe ser mayor al 20%
Límite de cuantificación	El valor promedio de la concentración evaluada debe estar dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal (exactitud) y no debe tener una variación mayor al 20%
Estabilidad de la muestra	Los resultados obtenidos para los puntos control deben de cumplir con los criterios de repetibilidad y exactitud
Recobro absoluto	El porcentaje de recobro no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en los diferentes niveles de concentración ⁽⁵⁵⁾ .

- Linealidad del Método:** Capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o promedio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se busca una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación. La linealidad se refiere a la relación entre la concentración y la medida de valoración
- Repetibilidad:** Repetibilidad del sistema industrial, este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces. La repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y mismo

analista. Se proponen dos alternativas para realizar este estudio: un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal.

- **Reproducibilidad:** Estudia la variedad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas pero siguiendo el procedimiento descrito en el procedimiento.
- **Exactitud:** Es un procedimiento que expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como el valor verdadero o un valor referencia y el valor experimental encontrado.
- **Selectividad:** Es la capacidad de un método para determinar el analito sin interferencia de impurezas, productos de degradación, excipientes u otras sustancias presentes en la muestra. La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra.
- **Límite de detección:** Es la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales descritas, la cantidad mínima de la muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas.
- **Límite de cuantificación:** Término cuantitativo mientras que el límite de detección es sólo cualitativo, encontrándose en ambos términos un rango de concentraciones

en el que si bien no puede cuantificarse en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos.

- **Estabilidad de la muestra:** Se refiere a la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis ⁽⁵⁷⁾.

III. JUSTIFICACIÓN

La clindamicina pertenece al grupo de las lincosamidas, fármacos de tipo tiempo-dependientes, que para lograr un mejor efecto terapéutico requiere mantener durante un tiempo prolongado, que la concentración del antibiótico, supere 4 veces la concentración mínima inhibitoria durante el intervalo de administración ⁽²²⁾.

Con el fin de mejorar la relación farmacodinámica-farmacocinética se diseñaron formulados de liberación modificada a través de la adición del principio activo con excipientes con características de bioadhesión en el organismo para lograr mantener las concentraciones plasmáticas del fármaco por un tiempo mayor que el alcanzado por la clindamicina sin excipientes después de su administración por vía oral y con una sola dosis.

Así mismo se ha demostrado en la literatura que la adición en conjunto de hidroxipropilmetilcelulosa con poloxámero 188 y de hidroxipropilmetilcelulosa con carbopol ha logrado formulaciones de liberación prolongada con éxito.

La liberación modificada de la clindamicina podría resultar ser benéfica para tratamientos tales como osteomielitis, enfermedades periodontales e infecciones cutáneas que son enfermedades que requieren de tratamientos largos de hasta 21 días y con una frecuencia de administración de 2 veces al día principalmente por vía oral ^(2,5).

La medicación para estas enfermedades se realiza normalmente en casa por los propietarios a través de la vía oral, 2 veces al día durante 21 días, lo que suma un total de 42 dosificaciones, esto resulta complicado y produce estrés al paciente por el manejo ^(3,4). En el presente trabajo, el fin de diseñar un formulado de clindamicina de liberación

modificada se realizó para ayudar a reducir el número de redosificaciones o tomas, durante el periodo del tratamiento.

Además se buscó mantener la concentración sérica del fármaco en un nivel terapéutico adecuado durante un intervalo prolongado de tiempo y con esto, ayudar a reducir los efectos adversos del fármaco, al disminuir el tiempo de contacto del principio activo con el tracto gastrointestinal.

Esta situación podría beneficiar la economía del médico sin afectar el tiempo de tratamiento total.

Por estas razones, se diseñó y se evaluó la farmacocinética de dos formulados poliméricos de clindamicina, con el fin de generar un sistema de liberación modificada para lograr una nueva presentación farmacéutica que será administrada por vía oral en perros y que logre una mejor eficacia en relación a su farmacodinamia-farmacocinética.

IV. HIPÓTESIS

Con la adición de los excipientes, Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), Poloxámero 188 y Carbopol a la clindamicina se logrará un formulado polimérico de liberación modificada que permitirá mantener las concentraciones terapéuticas séricas por 60 horas después de la administración de una sola dosis por vía oral en perros, mejorando así la relación farmacocinética-farmacodinamia.

V. OBJETIVOS

- Desarrollar un formulado de clindamicina a base de una matriz polimérica compuesta por hidroxipropilmetilcelulosa + Poloxámero 188 y otro constituido por Hidroxipropilmetilcelulosa + Carbopol con el fin de obtener sistemas de liberación modificada en perros.
- Aumentar el tiempo de permanencia sérica de la clindamicina de hasta 60 horas.
- Mejorar el perfil farmacocinético-farmacodinámico de la clindamicina por un periodo 6 veces mayor.

VI. MATERIAL Y METODOS

6.1 Equipo, materia prima y unidad experimental

6.1.1 Equipo: En la fase de laboratorio se utilizo:

- Balanza analítica
- Espátula química
- Cápsulas de gelatina dura.
- Báscula (para medir el peso de los perros)
- Termobalanza OHAUS MB 2000

6.1.2 Materia prima:

Se utilizaron los siguientes materiales obtenidos por diversas empresas manufactureras:

- Clorhidrato de clindamicina ® (Halvet, México)
- Hidroxi-Propil-Metil-Celulosa (HPMC) (Vivapharm K -100) ® JRS Mexicana
- Poloxámero 188 ® (Lutrol 127) BASF, ciudad de México, y
- Carbopol ® 971 P NF polimero (Lubrizol, México).

6.1.3 Unidad experimental:

Este estudio fue aprobado por el Subcomité Institucional de Investigación, Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la Universidad Nacional Autónoma de México en enero del 2014, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM- 062- ZOO- 1999 ⁽⁵⁸⁾.

Se utilizaron 21 perros sanos de 1-8 años de edad, de diferentes razas y de ambos géneros (macho y hembra), con un peso promedio de 15 Kg, los cuales estuvieron alojados en las perreras del área de enseñanza quirúrgica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, dichos animales fueron alimentados con producto comercial seco (Pedigree ®) y agua *ad libitum*. Los animales recibieron la vacuna de la rabia (IMRAB T-3®, Merial) y la vacuna polivalente (RECOMBITEK ® C6-V, Merial), también se les administró una dosis de desparasitante (Drontal Plus ®, Bayer) 2 semanas previas a la toma de muestras.

Después del examen físico general y de la verificación de que los animales se encontraban dentro del rango normal de las constantes fisiológicas, se dio prioridad a la palpación abdominal, linfonodos, condición corporal, temperatura corporal, frecuencia cardiaca y frecuencia respiratoria, con el fin de evitar interferencias en la farmacocinética del principio activo.

6.2 Metodología

6.2.1 Fase de Investigación

Búsqueda de la información publicada para conocer las propiedades fisicoquímicas de los excipientes (polímeros) para el diseño del formulado.

6.2.1.1 Características fisicoquímicas del formulado:

6.2.1.1.2 Clindamicina

La clindamicina es un antibiótico que se encuentra dentro del grupo de las lincosamidas ⁽²⁾.

El Clorhidrato de clindamicina tiene como fórmula química $C_{18}H_{33}ClN_2O_5S$, HCl, se utiliza principalmente para ser administrada mediante cápsulas ⁽⁵⁹⁾.

El polvo tiene un color blanco, apariencia cristalina, es soluble en agua y ligeramente soluble en etanol, tiene un pH: 3-5, un pK_a de 7.6, peso molecular de 461.44 Da ⁽⁵⁹⁾.

6.2.1.1.3 Hidroxipropilmetilcelulosa

Las matrices de Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) son las más utilizadas por los formuladores, no sólo por la gran variedad que se encuentran en el mercado, sino por propiedades de “hinchamiento” y solubilidad, que permiten interpretar con mayor certeza los fenómenos de interacción fármaco-polímero en los diferentes sistemas de liberación ⁽¹⁴⁾.

Entre sus principales características están su elevada capacidad de gelificación e hinchamiento, que a su vez tiene un efecto significativo en la cinética de liberación del

fármaco incorporado en el sistema ^(15, 16, 17), es de fácil compresión y tiene la capacidad de albergar una gran cantidad y diversidad de fármacos ⁽¹⁸⁾.

El HPMC es un derivado de celulosa hidrofílico que presenta cargas no iónicas, es inerte e inodoro y se obtiene a partir de celulosa purificada (*figura 2*).

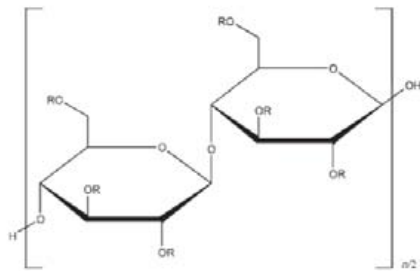


Figura 2: Estructura química de Hidroxipropilmetil

celulosa.

Es un polvo granular de color blanco, blanco-amarillento, o blanco-grisáceo, es higroscópico, es insoluble en agua caliente, acetona, etanol anhidro y tolueno pero si se disuelve en agua fría, metanol, diclorometano y alcohol. Es estable en soluciones con pH de 3 ⁽²⁰⁾.

Se utiliza en la preparación de formas farmacéuticas orales y tópicas, en las primeras se utiliza como aglutinante para granulación húmeda o seca; y para recubrimiento entérico, dependiendo del grado de viscosidad. También se utiliza como matriz para comprimidos de liberación modificada ⁽²⁰⁾.

Las propiedades fisicoquímicas del HPMC son: solubilidad, temperatura de transición vítrea y viscosidad, se ven afectadas por la proporción de grupos metoxilo e

hidroxipropoxilo que posee, así como por su peso molecular, el cual oscila entre 10 000 a 15 000 Daltons ⁽²⁰⁾.

La Hidroxipropilmetil celulosa es un material polimérico extremadamente versátil, estable entre un intervalo de pH de 3-11 y se considera no tóxico, siendo la Dosis Letal (DL⁵⁰) en ratones y ratas por vía intraperitoneal de 5 y de 5.2 g/Kg respectivamente ^(20, 50).

En formulaciones matriciales de liberación modificada, la hpmc se puede incorporar entre un 10 – 80% del total de la formulación y se ha encontrado, que, sin importar la forma farmacéutica en la que esté presente la hpmc, no sufre degradación enzimática, por lo que puede provocar un efecto laxante y generar un síndrome metabólico a dosis elevadas ⁽⁶¹⁾.

A este respecto, cabe mencionar que en el presente trabajo, la concentración adicionada de HPMC a los formulados elaborados fue de 0.04 g/Kg de peso.

Se reporta que el HPMC presenta una: densidad verdadera: 1.326 g/cm³, densidad compactada: 0.557 g/cm³ ⁽²⁰⁾.

En la figura 3 se observa por medio de microscopia de barrido el excipiente de (HPMC) en un lente de 200x (100 µm) (a) y de 500 x (10 µm) (b). *Figura 3 Microscopía de barrido de HPMC, con un lente de 200 x (100 µm) (a) y con un lente de 500x (10 µm) (b).*

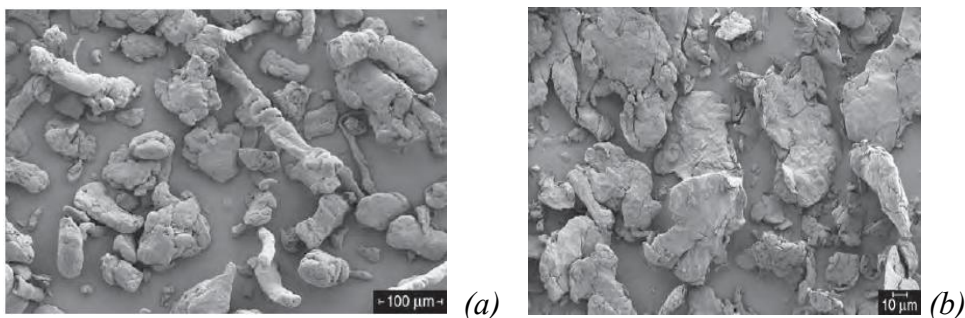


Figura 3a: Microscopia de barrido de HPMC en un lente de 200x (100 µm).

Figura 3b: Microscopia de barrido de HPMC en un lente de 500x (10 µm).

6.2.1.1.4 Poloxámero 188

Los Poloxámeros están constituidos por polímeros no iónicos de óxido de propileno, óxido de etileno hidrófilo y óxido de etileno hidrófobo (Figura 4), principalmente usado en formulaciones farmacéuticas como emulsificantes o agentes solubilizantes. Su estructura posee un segmento hidrofóbico y un segmento hidrofílico. Se ha reportado en la literatura que el Poloxámero se utiliza para fármacos de sistema de liberación modificada. El Poloxámero 188 tiene un peso molecular de 7680 – 9510 Da ⁽⁶²⁾. La dosis letal (DL⁵⁰) en ratones y ratas por vía oral es de 15g/Kg y de 9.4 g/Kg respectivamente. La dosis más alta de Poloxámero que se maneja en el presente trabajo es de 0.002 g/Kg.

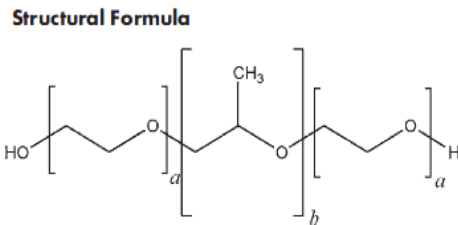


Figura 4: Estructura química de Poloxámero

188

Generalmente se producen de color blanco, de una consistencia cerosa, de flujo libre, gránulos comprimidos o de apariencia como de yeso sólido, tiene una densidad: 1.06 g/cm³ (20).

En la figura 5 se observa en un aumento de 100x (25 μm) del Poloxámero 188.

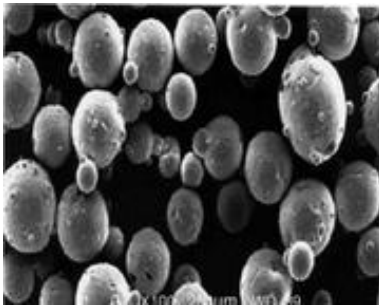


Figura 5 *Microscopia de barrido de Poloxámero 188* (63).

6.2.1.1.5 Carbopol

Los carbómeros son polímeros sintéticos de alto peso molecular compuestos de ácido acrílico (figura 6). Los carbómeros se caracterizan por ser un material bioadhesivo, y funcionar como un agente de liberación modificada, es un agente emulsificante, estabilizador y es un modificador de las características reológicas, principalmente (20). Tiene un peso molecular de 104 400 Daltons (20). Siendo la dosis letal (DL⁵⁰) en cuyos,

ratones y ratas, por vía oral, de 2.5g/Kg, de 4.6 g/Kg y de 4.1 g/Kg, respectivamente. La dosis más alta de Poloxámero que se maneja en el presente trabajo en perros es de 0.00035 g/Kg, siendo esta dosis menor a la (DL⁵⁰), la cual está por debajo en un 99.72% de la (DL⁵⁰) para la dosis de 2.5g/Kg en cuyos, debajo de la (DL⁵⁰) en un 99.84% para la dosis de 4.6 g/Kg en ratones y debajo de la (DL⁵⁰) en un 99.82% para la dosis de 4.1 g/Kg en ratas, como se cita en la literatura ⁽²⁰⁾.

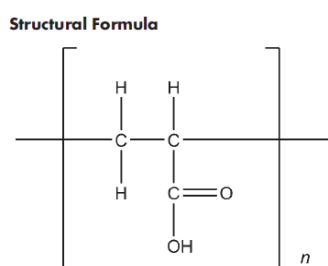


Figura 6: Estructura química del Carbopol

Es un polvo blanco o casi blanco, esponjoso, higroscópico que se hincha en agua y otros solventes polares. Sus partículas promedio tienen un diámetro de 0.2 μm , es soluble en agua, glicerina y en etanol al 95%⁽²⁰⁾. Posee una densidad verdadera de 0.4 g/cm^3 y una densidad compactada: 0.3 g/cm^3 ⁽²⁰⁾.

La liberación del principio activo de las cápsulas fabricadas con carbopol es controlada por difusión a través del hidrogel que el polímero forma en contacto con el medio acuoso ^(64, 65, 66, 67).

En la figura 7 (a) y (b) se muestran imágenes de microscopia de barrido de Carbopol .

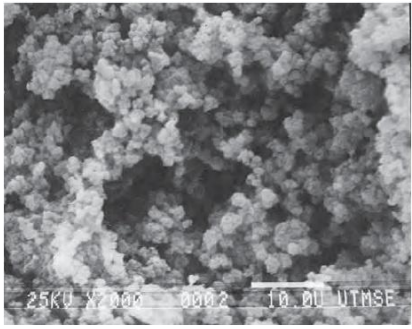


Figura 7 (a) Microscopia de barrido del Carbopol con un aumento de $200X^{(20)}$.



Figura 7 (b) Microscopia electrónica del Carbopol con un aumento de $600X^{(20)}$.

6.2 Fase de Laboratorio

6.2.1 Estudio de pre-formulación

Se realizaron estudios al principio activo solamente, con el fin de obtener datos suficientes para la selección adecuada de los excipientes. Para el diseño de un nuevo producto farmacéutico se requiere considerar cierta información básica al inicio del proyecto, en la etapa de pre-formulación donde se recopila esta información a partir de la literatura o de pruebas experimentales. Se involucra la investigación de las propiedades fisicoquímicas del principio activo por sí solo y en combinación con excipientes.

En sí estos estudios son aquellos que proceden al establecimiento que guían la fabricación del producto.

A continuación se enlistan las pruebas realizadas.

6.2.1.1 Estudios Estructurales

Las propiedades estructurales determinan la huella digital y la identificación del principio activo.

- Espectroscopía Infrarroja (IR)
- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)
- Difracción de Rayos X

6.2.1.1.1 Espectroscopia Infrarroja (IR)

La espectroscopía tiene por objetivo determinar la composición y el estado químico de los elementos presentes en materiales sólidos ^(68,69).

Técnica que se basa en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las cuales rotan y vibran, es decir, los movimientos de rotación y vibración moleculares tienen niveles de energía discretos (modos normales vibracionales). Las frecuencias resonantes o frecuencias vibracionales son determinadas por la forma de las superficies de energía potencial molecular, las masas de los átomos y, eventualmente por el acoplamiento vibrónico asociado. Para que un modo vibracional en una molécula sea activa al IR, debe estar asociada con cambios en el dipolo permanente ^(68,69, 70).

La espectroscopía de infrarrojo puede brindar información acerca de los grupos funcionales de moléculas de estructura desconocida. La espectroscopía infrarroja es ampliamente usada en investigación y en la industria como una simple y confiable práctica para realizar mediciones, control de calidad y mediciones dinámicas. Al medir una frecuencia específica a lo largo del tiempo, se pueden medir cambios en el carácter o la cantidad de un enlace particular. Esto es especialmente para medir el grado de polimerización en la manufactura de polímeros ^(69,71).

La espectroscopia en la región del infrarrojo medio es una de las técnicas analíticas disponibles más importantes para conseguir información sobre los procesos de absorción y emisión de las moléculas que se encuentran en la materia ^(70,71).

6.2.1.1.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC), es una técnica experimental dinámica que nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas ⁽⁷²⁾.

Consiste en calentar una muestra, así como un compuesto de referencia, de tal manera que la temperatura es un todo momento igual en la muestra y en el compuesto de referencia. Esto se consigue midiendo las temperaturas con sensores y ajustando las potencias de calentamiento. Se aplican velocidades de calentamiento uniformes a la muestra y a la referencia para realizar el barrido de temperaturas ^(70,72).

La representación de la potencia de calentamiento frente a la temperatura es lo que se denomina diagrama DSC o, dado que se realiza frente a la temperatura, termograma ⁽⁷³⁾.

Este es un método ampliamente utilizado para establecer identidad y pureza, obtener capacidad calorífica y calor de fusión, monitorear cinéticas de descomposición, estudio de polimorfos, entre otros. Pero, su uso se limita a compuestos puros que fundan sin descomponerse. ⁽⁷⁴⁾.

6.2.1.1.3 Difracción de Rayos X

La difracción de Rayos X es la técnica más poderosa actualmente disponible para estudiar la estructura de grandes moléculas ⁽⁷⁵⁾.

Cuando el haz de rayos X incide sobre un cristal, provocará que los átomos que conforman a este dispersen a la onda incidente, tal que cada uno de ellos produce un fenómeno de interferencia que para determinadas direcciones de incidencia será destructivo y para otras constructivo surgiendo así el fenómeno de difracción ^(75,76). La información que proporciona el patrón de difracción de Rayos X, se puede ver como dos aspectos diferentes pero complementarios: por un lado, la geometría de las direcciones de difracción (condicionados por el tamaño y forma de la celdilla elemental del cristal) nos ofrecen información sobre el sistema cristalino. Y por otro lado la intensidad de los rayos difractados, están íntimamente relacionados con la naturaleza de los átomos y las posiciones que ocupan en la red, tal que su medida constituye la información tridimensional necesaria para conocer la estructura interna del cristal ⁽⁷⁷⁾.

Esta técnica presenta un alto grado de exactitud y una absoluta especificidad ya que en una mezcla de polvos cada fase cristalina produce su propio patrón de difracción independiente. Esta característica es una ventaja para identificar principios activos en una forma farmacéutica sin necesidad de hacer una extracción del activo ⁽⁷⁷⁾.

6.2.1.2 Propiedades Reológicas

- Densidad Aparente
- Densidad Compactada
- Densidad Verdadera
- Porcentaje de Compresibilidad o Índice de Carr
- Radio de Hausner
- Ángulo de Reposo
- Velocidad de Flujo
- Higroscopicidad (Balanza de humedad)

6.2.1.2.1 Densidad Aparente

Se obtiene a partir del volumen que ocupa la muestra sin tener en cuenta los espacios que existen entre las partículas, es decir, se permite el libre acomodo de las partículas para realizar la lectura del polvo.

Esta densidad se determina mediante el volumen inicial de la muestra y el peso: Densidad Aparente = $\text{Peso}/\text{Volumen Inicial}$ ^(78, 79).

6.2.1.2.2 Densidad Compactada

Se obtiene considerando el volumen que ocupa la muestra luego de promover su compactación al someter el contenedor de la muestra a vibraciones que hacen que las partículas vayan cerrando espacios entre ellas. No es necesario aplicar una fuerza de compresión.

Se obtiene con el volumen final junto con el peso de la muestra para determinar la densidad compactada, mediante la siguiente fórmula: $\text{Densidad Compactada} = \text{Peso/Volumen Final}$ (78, 80).

6.2.1.2.3 Densidad Verdadera

Se obtiene al dividir la masa del volumen de la muestra en el volumen real ocupado por esta. La técnica se realiza mediante un picnómetro de gases o líquido, con el fin de asegurar que los espacios entre las partículas se eliminen completamente (81).

6.2.1.2.4 Porcentaje de Porosidad

Es una característica de los polvos que se debe al arreglo entre las partículas por la presencia de distintos tamaños, formas irregulares e interacciones electrostáticas.

Es la proporción de volumen de aire o volumen vacío entre las partículas en una muestra de polvo con respecto al volumen total y se calculó a partir de una relación entre las densidades aparente y compactada (82).

6.2.1.2.5 Porcentaje de Compresibilidad o Índice de Carr

Parámetro empírico para inferir el flujo del polvo a partir de la relación entre la densidad compactada y la densidad aparente del polvo, a partir de la siguiente ecuación:

$$\%C = \left(\frac{Dc - Da}{Dc} \right) \times 100$$

Da = Densidad Aparente

Dc = Densidad Compactada ⁽⁷⁹⁾.

En el 3 se pueden observar los parámetros para la interpretación de este resultado

Cuadro 3: Relación de las propiedades del flujo con el porcentaje de compresibilidad de una muestra.

COMPRESIBILIDAD (%) (ÍNDICE DE CARR)	PROPIEDADES DEL FLUJO
0-10	Excelentes
11-15	Buenas
16-20	Correctas
21-25	Pasables*
26-31	Pobres*
32-37	Muy Pobres
>38	Extremadamente Malas

6.2.1.2.6 Radio de Hausner

Se basa en las densidades aparentes y compactadas del polvo para proporcionar una relación empírica con el flujo ⁽⁷⁹⁾.

Se determina mediante la siguiente fórmula:

$$Hausner = Dc/Da$$

Los valores menores a 1.25 son indicativos de buen flujo y los mayores a 1.5 indican flujo pobre, en el cuadro 4 se observa una interpretación más precisa del resultado.

Cuadro 4: Relación de las propiedades del flujo según el Índice de Hausner

PROPIEDADES DE FLUJO	ÍNDICE DE HAUSNER
Excelentes	1.00 – 1.11
Buenas	1.12 – 1.18
Correctas	1.19-1.25
Pasables	1.26-1.34
Pobres	1.35-1.45
Muy pobres	1.46-1.59
Extremadamente malas	>1.6

6.2.1.2.7 Ángulo de Reposo

Medida relativa de la fricción y cohesión de partículas en el polvo. Entre mayor sea fuerza cohesiva, mayor será el ángulo de reposo entre las partículas ⁽⁸³⁾.

Básicamente se permite que el polvo se acomode en forma de cono apilado. Se deja caer el polvo desde un embudo puesto a una altura fija de una superficie plana de manera que solo la gravedad actúe sobre él ^(79, 84).

El ángulo formado entre la base sobre la que cae el polvo (plano horizontal) y una de las aristas del cono se le conoce como ángulo de reposo. Se deben obtener los valores de altura del montículo (h) y radio del mismo (r), para obtener el valor del ángulo. Generalmente varía entre 25 y 45° y los valores más altos indican un mal flujo del polvo ^(79, 84). Para determinarlo se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Ángulo} = \tan^{-1} (h/r)$$

La adecuada relación de este parámetro con las propiedades de flujo de una muestra se describe en el *cuadro 5* que a continuación se presenta:

Cuadro 5: Características del flujo del polvo de acuerdo a su Ángulo de Reposo.

Ángulo de reposo	Características del Flujo
<25	Excelente
26-30	Bueno
31-40	Regular
>40	Pobre

6.2.1.2.8 Velocidad de Flujo

La velocidad de flujo es el tiempo necesario para que fluya una cantidad específica de polvo, a través de un cilindro hueco colocado a una determinada altura, la velocidad de flujo de un polvo es un índice directo de las fricciones entre las partículas que lo componen ⁽⁸⁴⁾.

6.2.1.2.9 Higroscopicidad

La humedad (contenido de agua) en una muestra influye notoriamente en el flujo de los polvos. El agua tiende a formar aglomerados no fluentes y si es excesiva se tiene a pegar en las paredes ⁽⁸⁴⁾.

6.3 Fase de Formulación

Para el preparado de clindamicina de liberación modificada se mezcló el principio activo en 2 diferentes formulados, ambos preparados tienen como base una matriz formada de clindamicina mezclada con Hidroxipropilmetilcelulosa, lo que difiere en ambos preparados, es que el primer preparado también contiene Poloxámero 188 a diferencia del preparado 2, que contiene Carbopol, ambos formulados en este proyecto fueron nombrados como CLI-H-P y CLI-H-C respectivamente, también se consideró un grupo control, el cual sólo contiene clindamicina sin excipientes y se identificó como CLI, (cuadro 6).

Cuadro 6: Composición de los formulados realizados en este proyecto, teniendo como base la clindamicina e Hidroxipropilmetilcelulosa y variando el porcentaje de adición del Poloxámero y el Carbopol en los preparados

FORMULADO	Clindamicina	HPMC ⁽¹⁾	Poloxámero 188 (1)	Carbopol (2)
CLI-H-P	20 mg/Kg	40% de la preparación	5.6 mg/Kg	---
CLI-H-C	20 mg/Kg	40% de la preparación	---	5 % de la preparación
CLI	20 mg/Kg	---	---	---

⁽¹⁾ Handbook of Pharmaceuticals Excipients, 2009.

⁽²⁾ FDA/Center for Drug Evaluation and Research, 2005.

6.4 Tratamiento y Determinación de la actividad de la Clindamicina:

La dosis de clindamicina recomendada en la clínica de pequeñas especies es de 11-22 mg/Kg ⁽²⁾, para este estudio se decidió utilizar una dosis de 20 mg/Kg por vía oral, la cual fue mezclada con los excipientes anteriormente mencionados a través de la técnica de granulación seca. Una vez mezclado el formulado total fue pesado en una balanza analítica de acuerdo a los porcentajes y concentraciones ya señaladas. Posteriormente el contenido del granulado final fue encapsulado por medio de cápsulas de gelatina dura y preparado según el peso de cada perro que incluyo en el estudio.

Los animales fueron divididos en 3 grupos. El primer grupo (n=7) cuyo tratamiento es CLI-H-P, el segundo grupo (n=7) con el tratamiento de CLI-H-C y se mantuvo un grupo control (n=7) con tratamiento CLI (sin excipientes), en todos los grupos la administración fue por vía oral.

Se obtuvieron 3 mL de muestra sanguínea, a las 1, 2, 4, 12, 24, 36, 48 y 60 horas respectivamente por la vena yugular, posteriormente se centrifugo la muestra a 5000 rpm durante 15 minutos para separar el suero, que se conservó en congelación a – 20°C hasta el momento de su análisis.

Las concentraciones séricas de clindamicina fueron determinadas por el análisis de método de difusión en agar ⁽⁹⁸⁾ con la cepa de *Staphylococcus aureus* CDBJB -1006⁽⁸⁵⁻⁹³⁾ como microorganismo de prueba. Se cultivaron durante 24 horas a 37°C en agar Mueller-Hinton para su crecimiento. Se midieron los halos de inhibición de las muestras séricas de los pacientes para compararlos contra el principio activo puro (sin excipientes).

La curva estándar de clindamicina se realizó en las siguientes concentraciones: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0,625, 0.312 µg/mL, se midieron los halos de inhibición de las muestras de los pacientes y de la curva estándar con la ayuda de un calibrador digital electrónico TRUPPER ®.

Las curvas de concentración-tiempo de los formulados (CLI-H-P, CLI-H-C y CLI) se graficaron por medio del programa computarizado Software ORIGIN PRO 8.6®.

6.5 Análisis Farmacocinético:

El análisis farmacocinético, se realizó mediante un programa computarizado PKAnalyst ® (MicromathScientific Software, Salt Lake City, UT, USA).

El modelo farmacocinético que mejor se ajustó ($R \geq 0,99$) a los 3 formulados resultó ser el Modelo 3 de primer orden y de un compartimiento, con la siguiente fórmula:

$$\text{Tiempo Máximo de Concentración} = \frac{\text{Dose} * K_{ab}}{\text{Volume} K_{ab} - K_{elim}} (e^{-K_{elim} * Time}) - (e^{-K_{ab} * Time})$$

Las variables farmacocinéticas obtenidas con el software fueron: **K ½ ab**: Vida media de absorción, **K ½ el**: Vida media de eliminación; **Cmax**: concentración plasmática máxima; **Tmax**: Tiempo de concentración plasmática máxima y **AUC**: Área bajo la curva.

Las variables obtenidas mediante fórmulas matemáticas fueron las siguientes:

Clb: Depuración total del fármaco:
$$\text{Clb} = \text{Dosis/AUC}$$

Se demostró una cinética tipo flip-flop puede ser demostrada con la siguiente fórmula ⁽⁹⁴⁾.

$$\text{Velocidad de Absorción} = V_z \left(K_c + \frac{\Delta C}{\Delta t} \right)$$

6.4 Análisis Estadístico:

Se calculó la normalidad de las concentraciones de las tres formulaciones para cada paciente, mediante la prueba de ANOVA. Los datos se presentan con media \pm desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se obtuvieron mediante la prueba de Tukey.

VII. RESULTADOS

7.1 Curva de Calibración o Curva Estándar del clorhidrato del clorhidrato de clindamicina

En la figura 8 se observa la gráfica estándar del clorhidrato de clindamicina en un formulado sin excipientes a una dosis de 20 mg/Kg. Se obtiene una $R = 0.99$

Figura 8: Curva de calibración del clorhidrato de clindamicina a 20 mg/Kg

7.2 Estudios Estructurales

7.2.1 Espectroscopia Infrarroja

Los resultados de esta técnica se pueden observar en la figura 9, se observa el espectro característico de clorhidrato de clindamicina puro, sus bandas permiten establecer una identidad del principio activo.

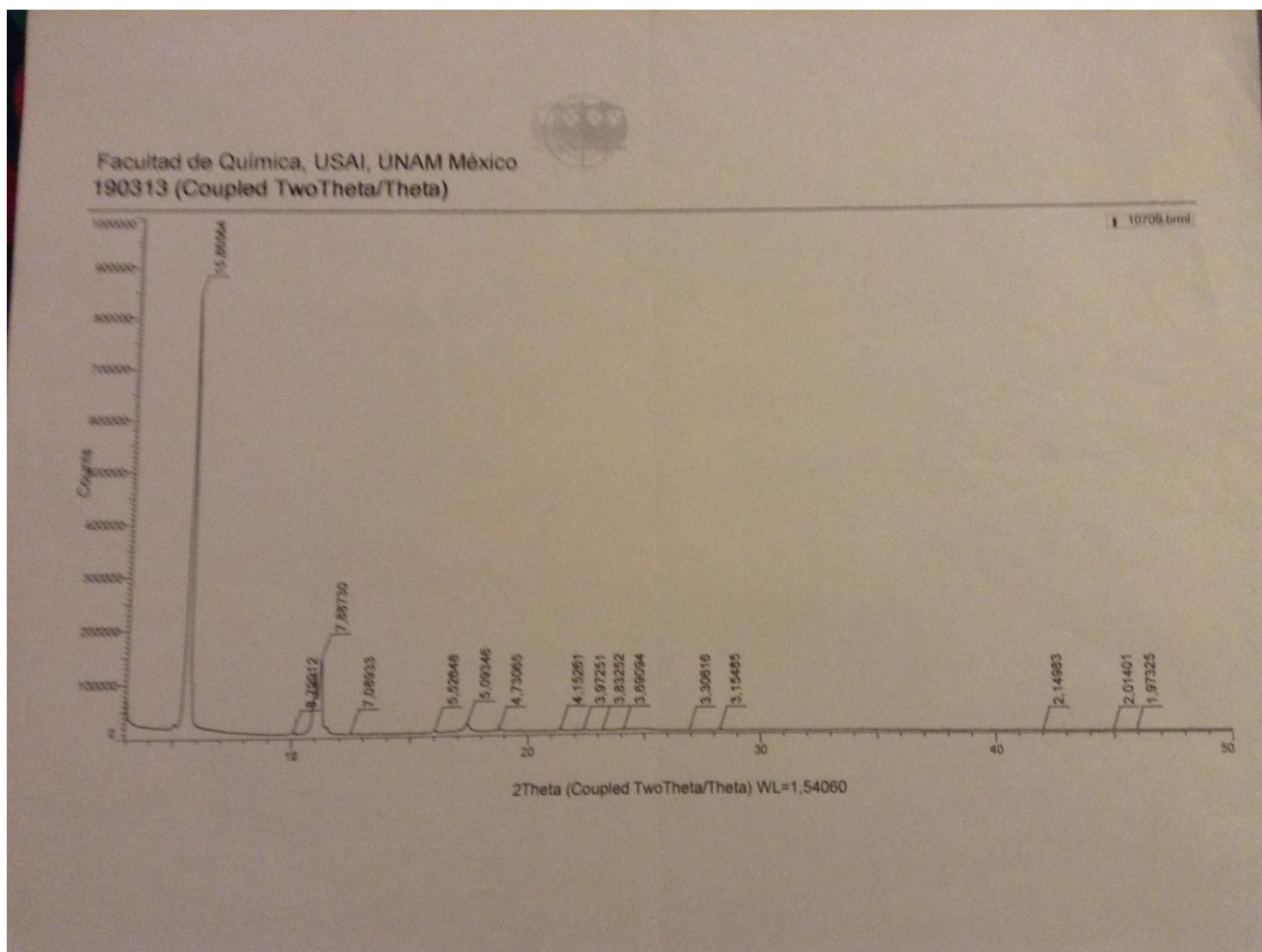


Figura 9: Espectroscopia infrarroja del clorhidrato de clindamicina.

6.2.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los resultados se observan en la figura 10, el pico endotérmico determina el punto de fusión del principio activo, a los 81°C.

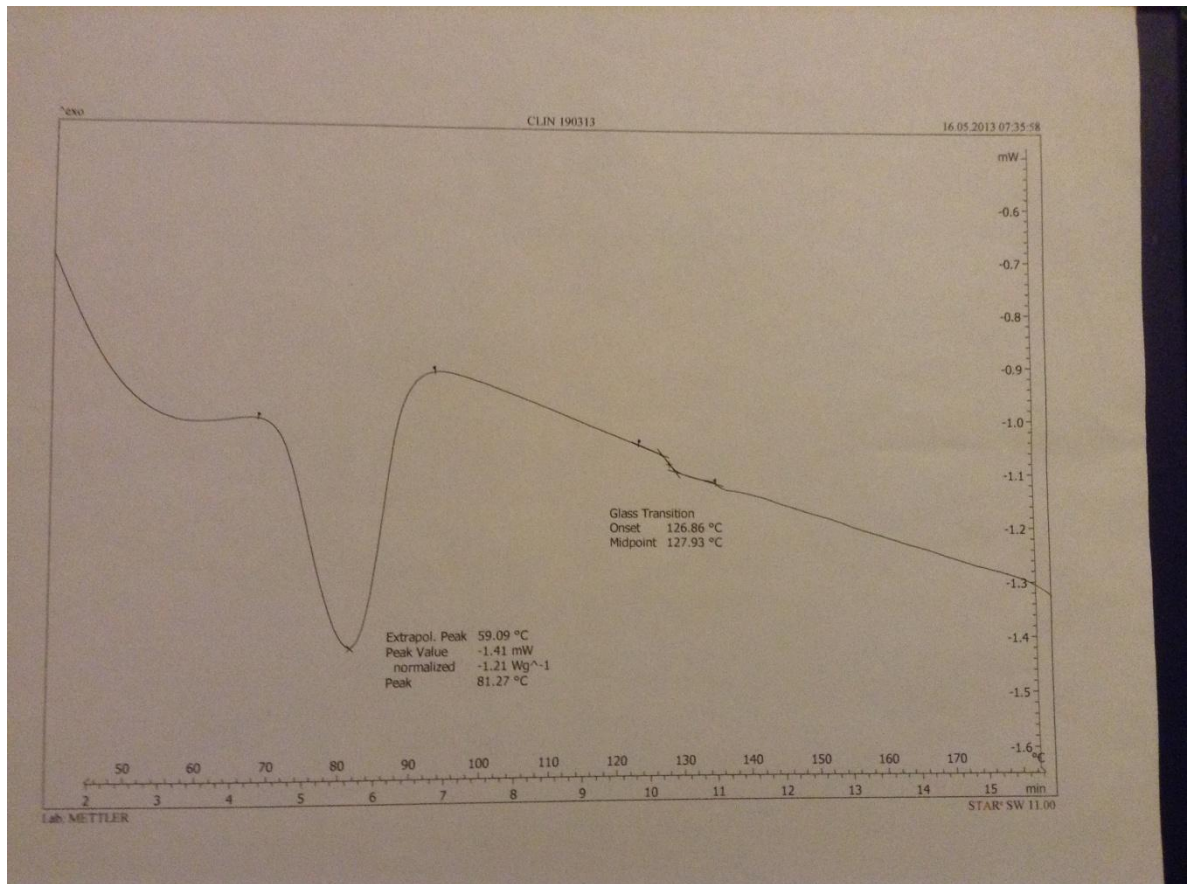


Figura 10: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) del clorhidrato de clindamicina

7.2.3 Difracción de Rayos X

En la figura 11 podemos ver que los picos muestran la estructura cristalina del principio activo

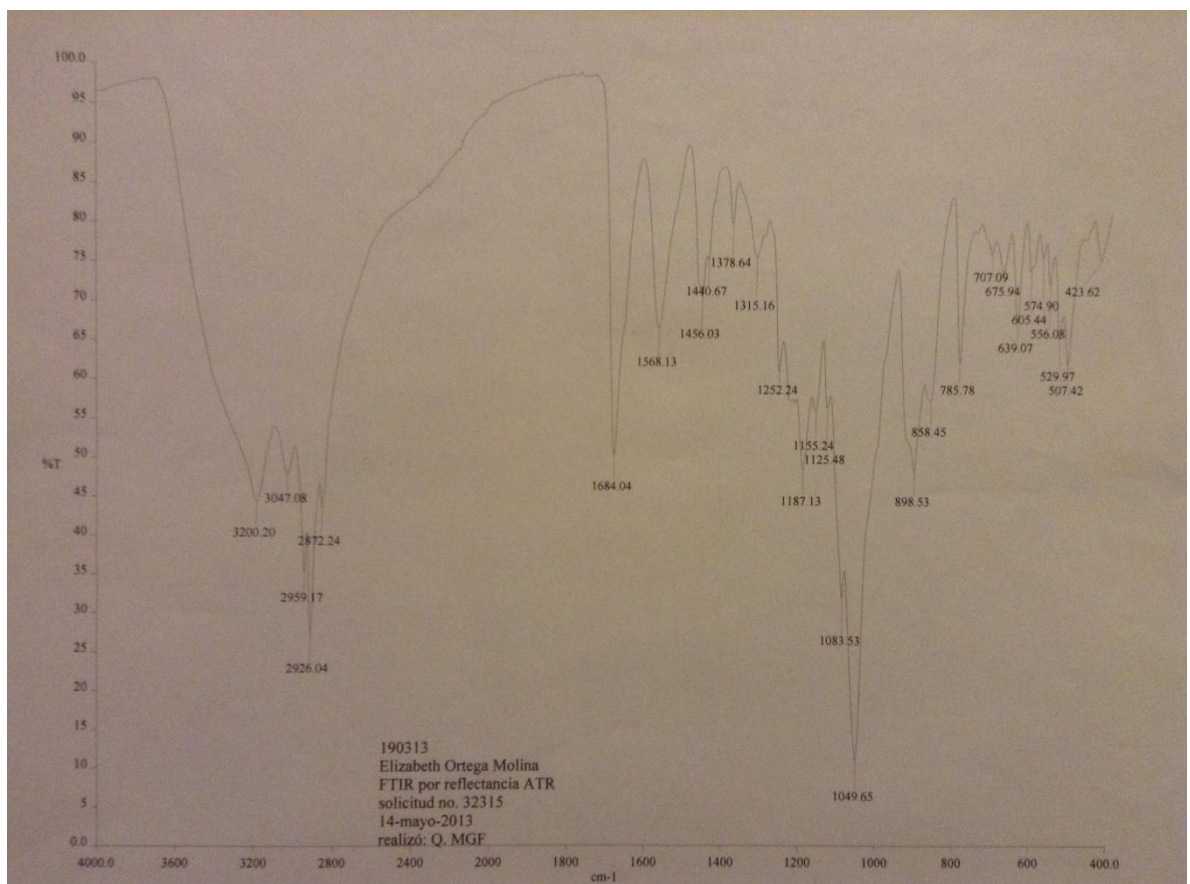


Figura 11: Difracción de Rayos X del clorhidrato de clindamicina.

7.3 Pruebas Reológicas

7.3.1 Densidad Aparente y Densidad Compactada

Los resultados obtenidos de densidad aparente y densidad compactada para la muestra de clorhidrato de clindamicina de las pruebas reológicas se observan en el cuadro 9.

Cuadro 9: Resultados obtenidos de 3 pruebas de densidad aparente y densidad compactada del clorhidrato de clindamicina, promedio y desviación estándar

Peso (g)	Volumen Inicial (mL)	Volumen Final (mL)	Densidad Aparente (g/mL)	Densidad Compactada (g/mL)
56.18	40	38	1.4	1.47
55.4	40	35	1.38	1.58
57.25	40	37	1.43	1.54
		PROMEDIO	1.40	1.53
		DESV. EST.	0.025	0.056

7.3.2 Porcentaje de Compresibilidad o Índice de Carr

Los resultados obtenidos para las pruebas de compresibilidad se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10: Se observan los datos del % compresibilidad o Índice de Carr del clorhidrato de clindamicina.

Peso (g)	Densidad Aparente	Densidad Compactada	% Compresibilidad
56.18	1.4	1.47	4.76
55.4	1.38	1.58	12.65
57.25	1.43	1.54	7.1
		PROMEDIO	8.17
		DESV. EST.	4.052

7.3.3 Radio de Hausner

O índice de Hausner se determina en el cuadro 11.

Cuadro 11: Se observan los datos del Índice de Hausner del clorhidrato de clindamicina

Peso (g)	Densidad Aparente	Densidad Compactada	Radio de Hausner
56.18	1.4	1.47	1.05
55.4	1.38	1.58	1.14
57.25	1.43	1.54	1.07
		PROMEDIO	1.087
		DESV. EST.	0.0473

7.3.4 Ángulo de Reposo

Los resultados obtenidos para estas pruebas se muestran en el cuadro. Dónde ha es la altura del montículo, r es el radio del montículo, como se observa en el cuadro 22.

Cuadro 12: Se observan los datos del Ángulo de Reposo del clorhidrato de clindamicina.

Altura (h)	Radio (r)	$\text{Tan}^{-1} (h/r)$
2.3	4.5	27.02
2.5	4.35	29.68
2.1	4.25	26.1
	PROMEDIO	27.6
	DESV. EST.	1.859

Siguiendo lo que se especifica anteriormente sobre el ángulo de reposo = 27.6, se deduce que tiene una la característica del flujo del polvo es buena.

7.3.5 Velocidad de Flujo

Los resultados obtenidos para la velocidad del flujo se muestran en el cuadro 23.

Cuadro 13: Se observan los datos de la Velocidad de Flujo del clorhidrato de clindamicina

Velocidad del Flujo 40 g (seg)	Gramos/segundo
16.07	2.6
14.89	2.5
14.23	2.7
PROMEDIO	2.6
DESV. EST.	0.1

7.3.6 Higroscopicidad (Balanza de humedad)

Los resultados obtenidos mediante la balanza de humedad, con el fin de determinar el porcentaje de humedad de las muestras se expresa en el cuadro 14.

Cuadro 14: Se observan los datos de la Higroscopicidad del clorhidrato de clindamicina.

Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	% final	% humedad
5.12	4.98	97.26%	2.74
5.01	4.84	96.60%	3.4

5.06	4.91	97.03%	2.97
		PROMEDIO	3.03
		DESV. EST.	0.33

7.4 Resultados de Validación del Método Microbiológico

7.4.1 Linealidad

Se evaluó la relación lineal entre concentración y respuesta antimicrobiana (halo de inhibición), dentro del intervalo (0.31 – 5 µg/mL) del clorhidrato de clindamicina, se utilizó como diluyente agua destilada.

Para los 3 gráficos de calibración, se obtuvo el coeficiente de correlación, la pendiente y la ordenada al origen.

Se observa en el cuadro 15 los resultados sobre la linealidad.

Cuadro 15: Resultados sobre la linealidad del clorhidrato de clindamicina

Clorhidrato de clindamicina µg/mL	Halo de inhibición (mm)				
	Halo 1	Halo 2	Halo 3	Promedio	C.V %
5	12.25	12.4	12.26	12.3	0.7
2.5	10.5	10.45	10.62	10.5	0.8
1.25	9.88	9.68	9.9	9.8	1.2

0.62	9.15	9.7	9.4	9.4	2.9
0.31	9	9.59	9.3	9.3	3.2
Intercepto	0.9537	0.96479	0.96181		
Pendiente	0.0254	0.02449	0.02493		
Coefficiente de correlación	0.9981	0.9974	0.99971		

7.4.1.1 Exactitud de la curva de linealidad

Para determinar la exactitud del halo de inhibición, se calculó la desviación estándar absoluta y el coeficiente de variación, como se muestra en el cuadro 16.

Cuadro 16: Resultados sobre la exactitud de la curva de linealidad

Clorhidrato de clindamicina µg/mL	Halo de inhibición (mm)					
	Halo 1	Halo 2	Halo 3	Promedio	C.V %	D.E
5	12.25	12.4	12.26	12.3	0.7	0.1
2.5	10.5	10.45	10.62	10.5	0.8	0.1
1.25	9.88	9.68	9.9	9.8	1.2	0.1
0.62	9.15	9.7	9.4	9.4	2.9	0.3
0.31	9	9.59	9.3	9.3	3.2	0.3

7.4.2 Validación del método analítico

7.4.2.1 Linealidad del método

Para realizar el estudio de linealidad del método, se basó con la muestra de estudio, es decir, suero de perro blanco (libre de fármaco) como se observa en el cuadro 17.

Cuadro 17: Resultados sobre la linealidad del método analítico.

Clorhidrato de clindamicina µg/mL	Halo de inhibición (mm)				
	Halo 1	Halo 2	Halo 3	Promedio	C.V %
5	12.45	12.5	12.65	12.5	0.8
2.5	10.45	10.55	10.35	10.5	1.0
1.25	9.98	9.9	9.58	9.8	2.2
0.62	9.09	9.52	9.59	9.4	2.9
0.31	8.8	9.1	8.5	8.8	3.4
Coefficiente de correlación	99535	99905	99244		

7.4.2.2 Exactitud de la curva de linealidad

Para determinar la exactitud de la curva de calibración, se calculó la desviación estándar absoluta y el coeficiente de variación, este estudio se observa en el cuadro 18.

Cuadro 18: Valores que determinan exactitud de la curva de linealidad del clorhidrato de clindamicina

Clorhidrato de clindamicina µg/mL	Halo de inhibición (mm)					
	Halo 1	Halo 2	Halo 3	Promedio	C.V %	D.E
5	12.45	12.5	12.65	12.5	0.8	0.1
2.5	10.45	10.55	10.35	10.5	1.0	0.1
1.25	9.98	9.9	9.58	9.8	2.2	0.2
0.62	9.09	9.52	9.59	9.4	2.9	0.3
0.31	8.8	9.1	8.5	8.8	3.4	0.3

7.4.3 Precisión y Exactitud

7.4.3.1 Repetibilidad

Se analizó en un mismo día por quintuplicado, tres concentraciones conocidas (alta, media y baja) de clorhidrato de clindamicina. Los valores de las respuestas se interpolaron en una curva de calibración y se calculó la concentración recuperada. Para cada nivel se determinó el promedio, la desviación estándar, la desviación estándar absoluta y el coeficiente de desviación, mismos datos que se observan en el cuadro 19.

7.4.3.2 Repetibilidad y exactitud del método analítico

Cuadro 19: Repetibilidad y exactitud del método analítico del clorhidrato de clindamicina

Réplica	Concentración de clindamicina ($\mu\text{g/mL}$)		
	5	1.25	0.31
1	4.9	1.2	0.3
2	4.8	1.23	0.29
3	4.91	1.22	0.28
4	4.89	1.21	0.29
5	4.9	1.19	0.28
Promedio	4.88	1.21	0.288
D.E	0.05	0.02	0.01
C.V (%)	0.9	1.3	2.9
Exactitud % DEA	2.45	3.2	7.09

7.4.3.3 Reproducibilidad entre días

Se efectuó por quintuplicado durante tres días concentraciones conocidas (alta, media y baja) del compuesto. De cada una de las determinaciones se calculó la concentración recuperada. Para cada nivel se determinó el promedio, la desviación estándar, la desviación absoluta y el coeficiente de variación, estos datos se presentan en el cuadro 8.

7.4.3.3 Exactitud

A partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, se determinó la desviación estándar absoluta (DEA) de las determinaciones en cada nivel de concentración conocida (alta, media y baja), se empleó la siguiente relación matemática, los datos se muestran en el cuadro 20.

$$\%DEA = \frac{(Conc. Nominal) - (Conc. Obtenida)}{Conc. Nominal} \times 100$$

Cuadro 20: Reproducibilidad al quintuplicado por 3 días del clorhidrato de clindamicina.

Día	Concentración de clorhidrato de clindamicina (µg/mL)		
	5	1.25	0.31
1	4.99	1.22	0.3
	4.89	1.29	0.3
	4.92	1.2	0.28
	4.99	1.23	0.3
	4.87	1.25	0.29
2	4.85	1.24	0.3
	4.88	1.19	0.28
	4.89	1.22	0.3

	4.78	1.22	0.3
	4.79	1.21	0.29
3	4.98	1.22	0.3
	4.97	1.23	0.29
	4.98	1.19	0.3
	4.96	1.22	0.29
	4.95	1.23	0.3
Promedio	4.913	1.224	0.295
D.E	0.07	0.02	0.01
C.V (%)	1.4	2.0	2.5
Exactitud % DEA	1.75	2.08	4.95

7.4.3.5 Reproducibilidad entre analistas

Se realizó en un mismo día por quintuplicado, por dos analistas diferentes, tres concentraciones conocidas (alta, media y baja) de clorhidrato de clindamicina. Los valores de las respuestas se interpolaron en una curva de calibración y se calculó la concentración recuperada. Para cada nivel se determinó el promedio, la desviación estándar, la desviación absoluta y el coeficiente de variación. Estos valores se determinan en el cuadro 21.

Cuadro 21: Reproducibilidad entre analistas de clorhidrato de clindamicina

Réplica		Concentración de clorhidrato de clindamicina (µg/mL)		
		5	1.25	0.31
ANALISTA 1	1	4.9	1.24	0.29
	2	4.99	1.21	0.3
	3	4.89	1.22	0.29
	4	4.8	1.2	0.3

	5	4.86	1.22	0.29
ANALISTA 2	1	4.98	1.24	0.3
	2	4.99	1.22	0.3
	3	4.87	1.24	0.29
	4	4.96	1.2	0.3
	5	4.98	1.25	0.3
Promedio		4.922	1.224	0.296
D.E		0.07	0.02	0.01
C.V (%)		1.4	1.5	1.7
Exactitud % DEA		1.56	2.08	4.52

7.4.4.1 Recobro absoluto

Se realizó por quintuplicado tres concentraciones conocidas de clorhidrato de clindamicina (alta, media y baja) y se compararon con soluciones de clorhidrato de clindamicina en fase móvil a concentraciones equivalentes. Se calculó el promedio del porcentaje de recobro para cada nivel de concentración y para cada analista. El % de recobro absoluto se obtuvo mediante la siguiente relación matemática:

$$\% \text{ Recobro absoluto} = \frac{\text{Respuesta muestra}}{\text{Respuesta solución}} \times 100$$

Los valores se representan en el cuadro 22.

Cuadro 22: Recobro absoluto por quintuplicado de 3 concentraciones de clorhidrato de clindamicina.

Clorhidrato de clindamicina $\mu\text{g/mL}$	Analista 1		Recobro	Analista 2		Recobro
	Áreas			Áreas		
	Sistema	Método		Sistema	Método	
5	4.9	4.8	97.96	4.8	4.7	97.92
	4.9	4.7	95.92	4.9	4.7	95.92

	4.8	4.6	95.83	4.9	4.8	97.96
	4.9	4.5	91.84	4.8	4.7	97.92
	4.8	4.7	97.92	4.7	4.6	97.87
Promedio	4.86	4.66	95.88	4.82	4.7	97.51
1.25	1.24	1.22	98.39	1.22	1.2	98.36
	1.25	1.21	96.80	1.24	1.22	98.39
	1.24	1.22	98.39	1.23	1.21	98.37
	1.24	1.23	99.19	1.22	1.2	98.36
	1.23	1.2	97.56	1.24	1.23	99.19
Promedio	1.24	1.216	98.06	1.23	1.212	98.54
0.31	0.3	0.27	90.00	0.3	0.29	96.67
	0.31	0.28	90.32	0.296	0.28	94.59
	0.3	0.285	95.00	0.28	0.25	89.29
	0.3	0.25	83.33	0.27	0.25	92.59
	0.29	0.24	82.66	0.29	0.24	82.76
Promedio	0.3	0.265	88.33	0.27	0.25	92.59
	Promedio parcial		94.08	Promedio parcial		95.82

7.4.4.2 Límite de detección y cuantificación

Para el límite de detección se calculó la concentración cuya respuesta es tres veces mayor a la respuesta promedio del blanco por triplicado. Por su parte el límite de cuantificación, se analizó por quintuplicado una concentración del fármaco.

7.4.4.3 Efecto de dilución

Se prepararon seis muestras de recuperación control alto y de control alto diluido. Posteriormente se obtuvieron los valores correspondientes a la D.E y %C.V, sus valores se demuestran en el cuadro 23.

Cuadro 23: Efecto de dilución de 6 muestras de clorhidrato de clindamicina.

Réplica	Concentración recuperada control alto (µg/mL)	Concentración recuperada control alto diluido (µg/mL)
	50	50
1	5	5
2	4.8	4.7
3	4.9	4.8
4	4.8	4.7
5	4.9	4.8
6	4.9	4.7
Promedio	4.8	4.76
Desviación Estándar	4.85	4.7
%Coeficiente de variación	0.055	0.050
% Desviación Absoluta		5.13

7.4.5 Estabilidad de la muestra

Por medio de este análisis se pudo determinar las condiciones y tiempo bajo las cuales el clorhidrato de clindamicina permaneció estable antes de ser procesado y cuantificado. En todos los casos se evaluó la respuesta por duplicado a tres concentraciones conocidas (alta, media y baja), se preparó cada día de análisis una curva de calibración y se interpoló en ella la respuesta obtenida de los puntos control. De igual modo se calculó el promedio de la desviación absoluta, el coeficiente de variación y la desviación estándar para cada nivel de concentración.

7.4.5.1 Estabilidad de la muestra en la mesa de trabajo

Esta prueba sirvió para conocer la estabilidad que presenta la muestra, mientras permanece en la mesa de trabajo a temperatura ambiente durante el proceso de análisis simultáneo de otras muestras. Para ello se prepararon por duplicado los puntos control de clorhidrato de clindamicina, se realizaron dos series; una que es inyectada inmediatamente (t=0 horas) y la otra que se inyectó después de 5 horas (las muestras se mantuvo a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo), valores que se observan en el cuadro 24.

Cuadro 24: Estabilidad de la muestra procesada y mantenida a temperatura ambiente

Muestra	Concentración de clorhidrato de clindamicina (µg/mL)		
	5	1.25	0.31
1	5	1.24	0.31
2	4.9	1.23	0.3
Promedio	4.95	1.235	0.305
D.E	0.07	0.01	0.01
C.V (%)	1.4	0.6	2.3
% DEA	1.00	1.20	1.61

7.4.5.2 Estabilidad de la muestra sin reconstituir

Se prepararon dos series de los puntos control (alto, medio y bajo) por duplicado; una serie se procesó e inyectó inmediatamente (t=0 horas), la otra serie fue procesada, pero sin reconstituir, se mantuvo por 24 horas a 4°C, valores que se observan en el cuadro 25.

Cuadro 25: Concentración inicial de muestras de clorhidrato de clindamicina

Muestra	Concentración de clorhidrato de clindamicina ($\mu\text{g/mL}$)		
	5	1.25	0.31
1	4.98	1.24	0.31
2	4.93	1.23	0.3
Promedio	4.955	1.235	0.305
D.E	0.04	0.01	0.01
C.V (%)	0.7	0.6	2.3
% DEA	0.90	1.20	1.61

7.4.5.3 Estabilidad de la muestra a largo plazo

Se prepararon por duplicado los puntos control de clorhidrato de clindamicina, se realizaron tres series, una fue inyectada inmediatamente ($t=0$ horas), las otras dos se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 y 30 días, los valores se pueden observar en el cuadro 18.

7.4.5.4 Estabilidad a largo plazo (tiempo de 15 días)

Cuadro 26: Tres series de clorhidrato de clindamicina durante 15 días

Muestra	Concentración de clorhidrato de clindamicina ($\mu\text{g/mL}$)		
	5	1.25	0.31
1	4.9	1.24	0.3
2	4.87	1.2	0.29
Promedio	4.885	1.22	0.295
D.E	0.02	0.03	0.01
C.V (%)	0.4	2.3	2.4

% DEA	2.30	2.40	4.84
--------------	------	------	------

7.4.6 Intervalo

Se analizaron tres concentraciones (alta, media y baja) en las cuales se comprobó que el método fue preciso, exacto y lineal.

Criterios de aceptación para las distintas pruebas de validación de acuerdo a la NOM-177-SSA1- 1998 ⁽⁵⁵⁾.

7.5 Variables Farmacocinéticas de los 3 formulados

Las variables farmacocinéticas se puede observar en el cuadro 27 y las concentraciones plasmáticas obtenidas después de la administración de clorhidrato de clindamicina, se muestran en la figura 12.

Cuadro 27: Promedio y desviación estándar de las variables farmacocinéticas para clindamicina después de su administración por vía oral en perros, tratados con 3 formulaciones: **CLI-H-P** (Clindamicina + HPMC + Poloxámero 188)/ **CLI-H-C** (Clindamicina + HPMC + Carbopol)/ **CLI** (Clindamicina control sin excipientes). Los superíndices ^a ^b y ^c indican si existe diferencia significativa entre las 3 formulaciones ($p < 0.05$).

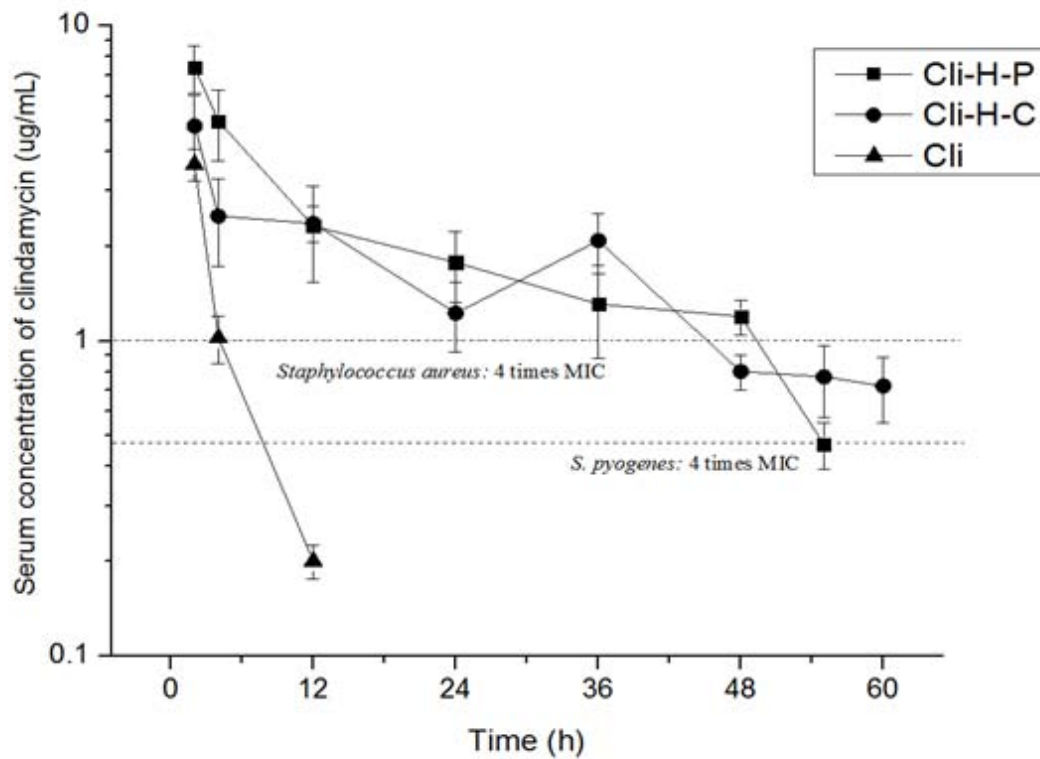
Variab Farmacocinéticas	CLI	CLI – H - P	CLI – H - C
K ½ el (hrs)	6.33 ± 1.14 ^a	18.04 ± 1.08 ^b	19.10 ± 0.86 ^b
K ½ab (hrs)	2.17 ± 0.62 ^a	4.58 ± 0.98 ^b	4.82 ± 0.50 ^b
Clb (mL/min/Kg)	0.43 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.01 ^b
Tmax (hrs)	2.70 ± 0.35 ^a	1.54 ± 0.29 ^a	2.35 ± 0.60 ^a
Cmax (µg*h/mL)	5.01 ± 0.31 ^a	8.10 ± 1.64 ^b	5.89 ± 0.84 ^a
AUC (µg*h)/mL	45.67 ± 3.51 ^a	210.97 ± 12.09 ^b	162.28 ± 26.0 ^c
AUMC (µg*h²/mL)	417.25 ± 29.62 ^a	5492.13 ± 4.02 ^b	4471.70 ± 21.88 ^c
AUC∞ (µg*h/mL)	50.87 ± 2.10 ^a	250.97 ± 5.62 ^b	186.27 ± 2.32 ^c

K½el (Vida Media de Eliminación), K½ab (Vida Media de Absorción), Clb (Depuración total del fármaco), Tmax (Tiempo de Concentración Máxima), Cmax (Concentración Plasmática Máxima), AUC (Área bajo la Curva), AUMC (Área bajo el primer momento de la curva concentración-tiempo) y AUC∞ (Área bajo la curva concentración-tiempo desde cero hasta ∞ con la extrapolación de la fase terminal).

De acuerdo a los resultados observados se observó que con los formulados poliméricos CLI-H-P y CLI-H-C se lograron concentraciones plasmáticas detectables hasta por 60 horas a diferencia de CLI, que sólo alcanzó 12 horas. (Figura 12).

Debido a que se requiere 4 veces la Concentración Mínima Inhibitoria para lograr el mejor efecto bactericida, además deberá mantenerse por el mayor tiempo posible ya que es un fármaco son tiempo-dependiente (Tiempo-Dependiente).

Figura 12: Promedio y desviación estándar de las concentraciones plasmáticas obtenidas después de la administración de clorhidrato de clindamicina a una dosis de 20 mg/Kg a 21 perros sanos tratados con 3 diferentes formulaciones:



VIII. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que con la adición de los excipientes HPMC, Poloxámero 188 y Carbopol se consiguió formar dos preparados de clindamicina de liberación modificada que al ser administrados en una sola dosis de 20 mg/kg por vía oral se logró mantener un efecto de hasta 60 horas, con lo cual se generaron preparados farmacéuticos innovadores que incrementaron la eficacia del principio activo.

De acuerdo a los resultados observados, se encontró que los formulados poliméricos CLI-H-P y CLI-H-C lograron mantener 4 veces la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* por 60 horas; mientras que para *Staphylococcus aureus* lograron mantener 4 veces la CMI por 50 horas.

Estos resultados muestran que se mejoro el perfil farmacocinético-farmacodinámico de la clindamicina, que al ser un antibiótico tiempo dependiente, requiere mantener por mayor tiempo la CMI ($T > CMI$)^(2,5).

Se ha reportado que las mezclas de diferentes polímeros utilizando HPMC y Carbopol se han utilizado con éxito para producir sistemas de suministro de retención gástrica logrando formulado de liberación modificada. El Poloxámero también tiene propiedades mucoadhesivas, es de baja toxicidad y posee buenas características para prolongar la liberación del fármaco, además de ser compatible con otros productos químicos^(20, 24).

Sin embargo no se han reportado más estudios sobre liberación modificada de clindamicina que logren concentraciones superiores a 12 horas en perros. Existen estudios sobre

liberación convencional o inmediata de clindamicina en perros que muestra una velocidad de liberación constante de hasta 8 horas ⁽⁵²⁾. En cuanto a la medicina humana se han reportado estudios de antimicrobianos de liberación modificada para su utilización, tales como en periodoncia con enjuagues bucales, ungüentos y geles con sustancias activas como clorhexidina, metronidazol y doxiciclina principalmente ⁽⁹⁵⁾.

A este respecto, en el estudio de Norling ⁽⁷⁸⁾ a través de una formulación de metronidazol en forma de suspensión, obtuvo una liberación modificada de 60 horas. En otro estudio se reporta una invención farmacéutica de una presentación tópica en gel que constituido por clindamicina y un agente antifúngico (butoconazol) como tratamiento de infecciones vaginales en humanos logrando una liberación modificada de hasta de 10 días ⁽⁸⁴⁾.

De acuerdo al trabajo de Saridomichelakis se reporta un valor de C_{max} de clindamicina con dosis de 5.5 mg/Kg PO BID fue de $1.659 \pm 0.57 \mu\text{g/g}$ y con dosis de 11 mg/Kg PO SID fue de $3.812 \pm 1.560 \mu\text{g/g}$ ⁽⁹⁶⁾ comparando estos valores con el presente, la C_{max} fue mayor en las 3 siendo de: $5.01 \mu\text{g/g} \pm 0.3$, $8.10 \pm 1.64 \mu\text{g/g}$ y de $5.89 \pm 0.84 \mu\text{g/g}$, CLI, CLI-H-P y CLI-H-C respectivamente.

En otro estudio, Lavy ⁽⁹⁷⁾ determinó también el valor de C_{max} de $4.4 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$, este valor es menor, aunque se administró por vía IM con dosis de 10 mg/Kg SID en comparación con los formulados realizados en este estudio. En conclusión se puede mencionar que los formulados CLI-H-P y CLI-H-C poseen un valor de C_{max} superior al formulado CLI, debido a la utilización de HPMC que le confirió características

mucoadhesivas y por sus propiedades de viscosidad, lo que permitió controlar la liberación del fármacos ⁽⁹⁵⁾.

Por otro lado el valor farmacocinético de T_{max} fue de 3 horas, tanto para la dosis de 5.5 y de 11 mg/Kg PO en el estudio de Saridomichelakis ⁽⁹⁶⁾ mientras que en el presente proyecto, necesitó un tiempo menor para alcanzar la C_{max}, para el formulado CLI que fue de 2.70 horas, para CLI-H-P de: 1.54 horas y para CLI-H-C de: 2.35 horas. Estos valores solo son superados por la vía parenteral en el estudio de Lavy ⁽⁹⁷⁾ con dosis de 10 mg/Kg, donde se obtuvo como resultado la T_{max} de 73 minutos para la vía IM. Este resultado es razonable, debido a que por vía parenteral la absorción de cualquier principio activo es más rápida y completa que por vía la enteral.

Respecto al Área bajo la Curva (AUC) en el estudio de Saridomichelakis ⁽⁹⁶⁾ con dosis de 5.5 mg/Kg PO BID se obtuvo un valor de 11.7h (µg*h)/mL ± 4.99 y a la dosis de 11 mg/Kg PO SID de 30.1 (µg*h)/mL, siendo menores a los encontrados en el presente estudio: 45.67 (µg*h)/mL ± 3.51, 210.97 (µg*h)/mL ± 12.09, 162.28 (µg*h)/mL ± 26, para los formulados de CLI, CLI-H-P y CLI-H-C respectivamente.

El valor de AUC que determina las concentraciones plasmáticas de un fármaco después de su administración resultó superior en los formulados CLI-H-P y CLI-H-C a diferencia de lo encontrado con los otros autores. Esto se puede explicar debido a la presencia de la matriz polimérica creada por la adición de los excipientes: HPMC + Poloxámero 188 y HPMC + Carbopol en sus respectivas formulaciones, que lograron características mucoadhesivas y

de agentes de recubrimiento, que además de permitir la granulación lograron un efecto de liberación modificada ⁽²⁰⁾.

Superaron a los valores encontrados por la vía parenteral donde el AUC fue de 24.3 horas para la dosis de 10 mg/Kg por vía IV, de 30.1 horas para la vía IM y de 87.63 horas para la vía SC ⁽⁵¹⁾. Por otro lado en el estudio de Batzias ⁽⁹⁸⁾ se reportó un valor menor de AUC PO SID con dosis de 11 mg/Kg de 16.19 ± 2.83 mg*h/mL y por vía IV fue de 22.52 ± 4.30 mg*h/mL siendo estos valores menores a los valores logrados en el presente estudio, donde se pudo observar que el valor de AUC es menor por su vía de administración PO en un sistema de liberación convencional.

La depuración (Clb) encontrada en este estudio para el formulado CLI: 0.433 mL/min/Kg, CLI-H-P: 0.09 mL/min/Kg y para CLI-H-C: 0.12 mL/min/Kg. En el estudio de Lavy ⁽⁹⁷⁾ se obtuvo un valor mayor en este parámetro de 6.10 mL/min/Kg. Este valor de Clb fue menor en los formulados CLI-H-P y CLI-H-C del presente estudio debido a las características de los excipientes para producir sistemas de suministro de retención gástrica en un formulado de liberación modificada. Logrando así un mayor tiempo terapéutico dentro del organismo y eliminándose más lento a diferencia de los valores reportados en el estudio de Lavy ⁽⁹⁷⁾.

Por otro lado la biodisponibilidad “relativa” (F%) que se encontró en el formulado CLI-H-P presentó un valor de $116.93\% \pm 4.48$ y el formulado CLI-H-C un valor de $112.53\% \pm 2.66$, a diferencia del estudio de Lavy ⁽⁹⁷⁾, que con dosis de 11 mg/Kg PO SID se obtuvo un valor menor: $72.55\% \pm 9.86$. El valor encontrado de F% en CLI-H-P y CLI-H-C se

puede explicar debido a que la HPMC se encuentra incluida en una matriz polimérica que además de conferir una liberación modificada, protege al activo de la degradación por los ácidos y enzimas presentes en el estómago de los perros, aumentando la biodisponibilidad del fármaco.

Además el empleo de HPMC en sistemas de liberación modificada ocurre debido al comportamiento de las matrices en contacto con los fluidos biológicos, a su tamaño de partícula, a la solubilidad del polímero, a la fuerza de compresión y a su peso molecular⁽⁹⁹⁾. El Carbopol es un material bioadhesivo, agente de liberación modificada, que aumenta el tiempo de residencia gastrointestinal y mejora la biodisponibilidad de los fármacos^(20, 98).

Los formulados de liberación modificada de este proyecto presentaron una farmacocinética de tipo flip-flop. De acuerdo a Boxenbaum⁽⁹⁴⁾, la condición de flip-flop para CLI-H-P y CLI-H-C se demostró con la siguiente fórmula:

$$\text{Velocidad de Absorción} = V_z \left(Kc + \frac{\Delta C}{\Delta t} \right)$$

En donde, para CLI-H-P se tomaron los valores de concentración-tiempo a las 24 y 60 horas, $\Delta C/\Delta t = 0.018 \mu\text{g/mL/h}$. Y en el punto medio de este periodo de tiempo (36 horas) $(K)(C) = 0.9 \mu\text{g/mL/h}$. Así se encontró que $KC \gg \Delta C/\Delta t$, lo que sugiere que la velocidad de absorción \approx velocidad de eliminación, con este valor se puede comprobar que si existe una condición de flip-flop para CLI-H-P y que su efecto se puede considerar como una verdadera liberación prolongada. Mientras que para el tratamiento de CLI-H-C, se encontró lo siguiente, $\Delta C/\Delta t = 0.016 \mu\text{g/mL/h}$ y de $(K)(C) = 0.2 \mu\text{g/mL/h}$. Así $KC \gg \Delta C/\Delta t$, por lo cual la velocidad de absorción \approx velocidad de eliminación, con este valor, igual que en

CLI-H-P, CLI-H-C se puede comprobar que si existe una condición de flip-flop y se puede considerar como una verdadera liberación prolongada.

IX. CONCLUSIONES

Entre los beneficios encontrados en los fármacos de liberación modificada se incluye el mantenimiento por largos periodos de las concentraciones terapéuticas séricas, con lo que se logra un mayor tiempo de efecto del fármaco y reducir la manipulación del paciente por la administración del fármaco, el estrés y lograr el cumplimiento de la terapia antimicrobiana ⁽¹⁰⁰⁾. En este contexto, tanto CLI-H-P como CLI-H-C fueron capaces de lograr con una dosis oral única concentraciones terapéuticas séricas durante 60 horas, lo que puede ayudar a incrementar el tiempo de redosificación de clindamicina, reduciendo el número de tomas cinco veces con respecto a un formulado convencional o de liberación inmediata.

En el presente trabajo se mejoró la relación farmacocinética-farmacodinamia (PK/PD) de la clindamicina, ya que es un fármaco considerado como tiempo-dependiente, y para ejercer su acción de tipo bactericida, logró una mejor eficacia del antimicrobiano, que logró mantener las concentraciones mínimas inhibitorias bacterianas (CMI) durante el mayor tiempo posible (60 horas).

Con los resultados encontrados en las variables farmacocinéticas de CLI-H-P y CLI-H-C se consiguió mejorar la eficacia clínica de clindamicina, comparada con una presentación de liberación inmediata.

En resumen, los formulados innovadores orales realizados en este trabajo a base de matriz polimérica (HPMC, Carbopol y Poloxámero 188) obtuvieron una liberación modificada de clorhidrato de clindamicina, con concentraciones séricas terapéuticas de hasta 60 hrs en perros, optimizaron su eficacia en relación a su PK/PD por lo que su uso en la clínica permitirá cumplir con la terapia. No se observaron efectos adversos (vómito, diarrea) en los pacientes, mismos que se monitorearon durante un mes para observar su condición física. Sin embargo para poder recomendar el uso de estos preparados se requiere primero realizar pruebas de toxicidad crónica para garantizar la inocuidad del formulado.

Cabe mencionar que el método microbiológico de difusión en agar usado en esta investigación para determinar las concentraciones séricas de clindamicina, fueron validados, además han sido reportadas en otros trabajos como suficientemente confiables, pudiendo reemplazar a los resultados o conclusiones analíticas derivadas de una cromatografía líquida de alta resolución ⁽¹⁰¹⁾ ya que la técnica microbiológica determina la fracción activa del fármaco y su eficacia, ofreciendo resultados y conclusiones clínicas más precisas que las derivadas de una cromatografía que son puramente químicas. Sin embargo en un futuro trabajo se recomienda el estudio cromatográfico para poder cuantificar las concentraciones de forma precisa.

X. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.

1. Kaya, M., Okumus, Z., Yanmas, L.E., Dogan, E., Kirecci, E., 2011. Post-Traumatic Osteomyelitis and its Treatment in a Dog. *Pakistan Veterinary Journal*, 31 (4) 371-374.
2. Sumano, L.H.S; Ocampo C.L., Gutiérrez O.L., (3ª. Ed), 2006; *Farmacología Veterinaria*, México, 315-325pp.
3. Saini, S.D. Schoenfeld, P. Kaulback, K. Dubinsky, M.C. 2009. Effect of medication dosing frequency on adherence in chronic diseases. *American Journal Manag. Care*. 15(6), 22-33.
4. Adams, V.J., Campbell, J.R., Waldner, C.L., Dowling, PM., Shmon, C.L. 2005. Evaluation of client compliance with short-term administration of antimicrobials to dogs. *Journal American Veterinary Medical Association*. 226 (4) 567-574.
5. Goodman, L.S., Gilman A. (11 Ed). 2007. *The pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill, México, 1028-1035pp.
6. Paredero, D.J.M. 2007. *Nuevas Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada: Revisión y Relevancia; Servicio de Farmacia de la Gerencia de Atención Primaria de Guadalajara*.
7. Arora, S., Ali J., Ahuja, A., Baboota, S., Qureshi, J., 2006. Pulsatil drug delivery systems: an approach for controlled drug delivery. *Indian Journal Pharmaceutical Science*, 68: 295-300.
8. Horwits, E., Kagan, L., Chamisha, Y., Gati, I., Hoffman, A., Friedman, L., Lavy, E., 2010 . Novel gastroretentive controlled release drug delivery system for amoxicillin

therapy in veterinary medicine. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 34, 487-493.

9. Saéz V., Hernáez E., Angulo L.C., Katime, Issa. 2003. Liberación Modificada de Fármacos. Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 4(2), 111-122.
10. Sastre, I. 2002. Especialidades farmacéuticas orales de liberación modificada. *Boletín de información Terapéutica de Asturias* 2002; 4(3): 1-8.
11. Barboza, G.L., Optimización de una formulación por compresión directa con el empleo por compresión directa con el empleo de tres diluentes – aglutinantes aplicando un modelo simplex centroide. UNAM. 2009
12. Fernández, R.J.E. Efecto de la concentración de hidroxipropilmetilcelulosa sobre la liberación de diclofenaco sódico desde sistemas matriciales hidrofílicos. UNAM. 2013
13. Lastres, J.L. 2002. Nuevos sistemas orales de liberación modificada . *Schironia* 1, 63-71.
14. Andreetta, Héctor. A. 2003, Fármacos de acción prolongada: mecanismos de liberación. Usos de distintos modelos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22 (4), 355-364.
15. Lee, B.J., Ryu, S.G., Cui, J.H. 1999. Formulation and release characteristics of hydroxypropyl methylcellulose matrix tablet containing melatonin. *Drug Development Industrial Pharmacy*, 25: 493- 501.
16. Sako, K., Sawada, T., Nakashima, H., Yokohama, S., Sonobe, T. 2002. Influence of watersoluble fillers in hydroxypropylmethylcellulose matrices on in vitro and in vivo drug release. *Journal of controlled release*, 81: 165 – 172.

17. Ebube, N.K., Jones, A.B. 2004 Sustained release of acetaminophen from a heterogeneous mixture of two hydrophilic non-ionic cellulose ether polymer. *International Journal of Pharmaceutics*, 272: 19-27
18. Li, C.L., Martini, L.G., Ford, J.L., Roberts, M. 2005. The use of hypromellose in oral drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57: 533-546.
19. Sansom, L.N., 1999. Oral extended-release products. *Australian Prescriber*, 22 (4): 88-90.
20. Rowe, R.C., Shaeskey, P.J., Owen, S., (6a Ed), 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; 110-114, 326-329, 506-508 pp.
21. Adams, H.R., (8ª Ed). 2003. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Acribia. España. 560-573 pp.
22. Katzung, G.B., (10ª Ed). 2007. *Farmacología básica y clínica. Manual Moderno*. México. 613-625 pp.
23. Harari, J, Lincoln, J., 1989. Pharmacologic features of clindamycin in dogs and cats. *Journal American Veterinary Medical Association*, 195 (1): 124-125.
24. Yassin, G., (3a Ed), 2011. *Pharmacology*. Elsevier. México. Pp: 220-222.
25. Fernández, A.M. 2007. *Sistemas de Liberación Modificada (Conceptos fundamentales)*. Departamento Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
26. Rodriguez, I., Cerezo, A., Salem, I., 2000. Sistemas de liberación bioadhesivos. *Ars Pharmaceutica*, 41 (1), 115-128.
27. Ritschel, W.A. 1986. *Handbook of basic pharmacokinetics*, 3a Ed. Drug Intelligence Publications, Illionis).

28. Khanna, R., Agarwal, S.P., Ahuja, A. 1997. Mucoadhesive buccal tablets of clotrimazole for oral candidiasis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 23, 831-837.
29. Acharya, S, Patra, S., Ranjan, P.N. 2014. Optimization of HPMC and carbopol concentrations in non-effervescent floating tablet through factorial design. *Carbohydrate Polymers*. India 102 360-368.
30. Ximing Liu, Lu Fu, Wenwen Dai, Wei Liu, Jinlong Zao, Yi Wu, Lesheng Teng, Fengjyn Sun, Youxin Li. 2014. Design of transparent film-forming hydrogels of tolterodine and the effects of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*. China. 2014 471 322-331.
31. Ahmed, O. A., Ahmed, T.A., Abdel-Naim, A.B., Khedr, Alaa., Banjar, Z.M., Afouna, M.I. 2014. Enhancement of in vitro skin transport and in vivo hypoglycemic efficacy of glimepiride transdermal patches. *Tropical Journal of Pharmaceutics*. 13 (8): 1207-1213. Saudi Arabia.
32. Mukherjee, A., Sahoo, S., Dev Sarma, Chakraborti, C.K., Samuel, G. 2014. Preparation and evaluation of three mucoadhesive dosage forms using ^{99m}Tc -ofloxacin. *Applied Radiation and Isotopes*. 89 192-198. India.
33. Mansour, M., Mansour, S. and Mortada, N.D. 2008. Ocular poloxamer-based ciprofloxacin hydrochloride in situ forming gels. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34: 744- 752, Egipto.
34. Radivojša, M., Grabnar, I. and Grabnar, P.A. 2013. Thermoreversible in situ gelling poloxamer-based system with chitosan nanocomplexes for prolonged subcutaneous delivery of heparin: Design and in vitro evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Science* 50 (2013) 93-101. Slovenia.

35. Ochoa, D.L. 2006. Granulación por fusión en mezcladores granuladores de alta velocidad; Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 13 (1): 40-47.
36. Summers, M., Aulton, M. 2004 Granulación. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Elsevier. Capítulo 25 pp: 368-378.
37. Reyes, H.R., Navarro, R.P., Jiménez, L.R., Reyes, B.H., 2001. Osteomielitis. Revisión y Actualización. Revista de la Facultad de Medicina, 24 (1).
38. Lund, E., Armstrong, P., Kirk, C., Kolar, L., Klausner, J. 1999. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. Journal of American Veterinary Medical Association, 214 1336-1341.
39. Harvey, C. Periodontal disease in dogs: Etiopathogenesis, prevalence, and significance. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 28 (11) 11-28.
40. Gorrel, C. 2004. Periodontal Disease. Veterinary Dentistry for the General Practitioner, Saunders, pp: 87.106.
41. Shipp, A.D., Fahrenkrug, P. 1992. Practitioner's Guide to Veterinary Dentistry. Dr. Shipp's Laboratories, Beverly Hills, CA, USA
42. Davey, P., Parker, S. 1992. Cost effectiveness of once-daily oral antimicrobial therapy. Journal Clinical Pharmacology. 32(8): 706-710.
43. Nielsen, D., Walser, C., Kodan G., Chaney, R.D., Yonkers, T., VerSteeg, J.D., Elfring, G., Slots, J. 2000. Effects of treatment of with clindamycin hydrochloride on progression of canine periodontal disease after ultrasonic scaling. Veterinary Therapy. 1(3), 150-158

44. Johnston, T.P., Mondal, P., Pal, D. MacGee, S., Stomber, A.G., Alur, H. 2011. Canine Periodontal Disease Control Using a Clindamycin Hydrochloride Gel. *Journal Dental Veterinary*. 28 (4) 224-229.
45. AVDC board of directors. 2005. Policy Statement: the use of antibiotics in Veterinary Dentistry.
46. Balazs, M.V., 2012. Pioderma en el Canino, *Revista Electrónica Veterinaria*. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>. 13 (3).
47. Scott, D.W., Beningo, K.E., Miller, W.H., Rothstein, E. 1998. Efficacy of clindamycin hydrochloride capsules for the treatment of deep pyoderma due to *Staphylococcus intermedius* infection in dogs. *Can. Vet. Journal*. 39: 753-756.
48. Case, L.P., Carey, D.P., Hirakawa, D.A., Canine and feline nutrition. A Resource for companion animal professionals. St Louis, Missouri: Mosby-Year Back Inc, 1995.
49. Burger, I.H., Blaza, S.E., Digestión, absorción y balance nutritivo. En Edney ATB, editor. *El libro Waltham de Nutrición de perros y gatos*. 2da edición Zaragoza, España,: Acribia, 1990-41-63.
50. Ellenport, C.R., St Clair L.E., Sistema digestivo de los carnívoros. En Ellenport RC, Ghoshal, N.G., Hillmann, D., editores. *Anatomía de los animales domésticos*. México, D.F,: Salvat, 1993: 1688-1709.
51. Chandler, M. Guía de la fisiología gastrointestinal del perro y el gato. Editorial Affinity Petcare. Segunda edición. España. 2008. 9-15
52. LaHunta A, Habel, R.E., *Anatomía Veterinaria*, México, D.F.: Interamericana, 1987.
53. Burk, R. Feeney, D., *Small Animal Radiology and Ultrasonography*. Editorial Saunders Elsevier. Tercera Edición. Estados Unidos. 2003

54. Lugo-Santos, N.A., 2006 Desarrollo y validación de procesos farmacéuticos. Desarrollo y validación de un método analítico para evaluar perfiles de disolución de clorhidrato de propafenona en tabletas por espectrofotometría ultravioleta. UNAM
55. NOM-177-SSA1-1998. Norma Oficial Mexicana. Pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. México.
56. USP, United States Pharmacopeial Convention, 30 ed. Rockville: Mack Printing, 2007.
57. AEFI, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. Monografía. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad. 2001
58. NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
59. British Pharmacopeia. 2012. Vol. 1. Clindamycin Hydrochloride. 543-544 pp.
60. <http://www.fda.org>
61. Lynch, S.K., Turowski, M. Yokoyama, W.H., Hong, Y., Conklin, J.R., Hung, S., Young, S.A. 2008. Use of water-soluble cellulose derivatives for preventing or treating metabolic syndrome. Int Patent WO 2008051794 A2.
62. Lu G, Jun H.W. 1998. Diffusion studies of methotrexate in Carbopol and poloxamer gels. International Journal of Pharmaceutics, 160 (1): 1-9
63. Palacio, P.A., Herrera, L.M., Duque, A. 2008. Sistemas de liberación modificada de antimicrobianos en peiodoncia. Drug Delivery Systems in Periodontics 21 (2), 69-77.
64. Application of carbopol ® 71 G NF Polymer in controlled release tablets, Noveon, The Specialty Chemicals Innovator, 2002.

65. Application of carbopol ® 71 G NF Polymer in controlled release tablets: II, Noveon, The Specialty Chemicals Innovator, 2002.
66. Controlled release tablets and capsules references, Noveon, The Specialty Chemicals Innovator, 2001.
67. Pharmaceutical Polymers for Oral Solid Dosage Forms, Lubrizol Advanced Materials, 2007.
68. Chang, R., Basic principles of Spectroscopy, Mc-Graw Hill, New York, 1971.
69. Schrader, B., Practical Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Academic Press, 1990.
70. Bower, D.I., The Vibrational Spectroscopy of polymers. Cambridge University Press. 1992.
71. Nakamoto, K., Infrared and raman characteristic group frequencies: tables and charts, Wiley, UK, 2002.
72. Suriñach, S., Baros, M.D., Bordas, S., Clavaguera N., Clavaguera-Mora, M.T., La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la ciencia de materiales, Física de Materials, Departament de Física, Barcelona, 1992 (31) 1: 11-17
73. Brown, M.E., Introduction to Thermal Analysis, 2nd edition, Techniques and Applications, Secaucus, NJ, US: Kluwer Acad., 2001.
74. Brittain H., Physical characterization of pharmaceuticals solids. Drugs and the pharmaceuticals sciences. Volumen 70. Estados Unidos. 1990.
75. Hammond, C. “The Basics of Crystallography and Diffraction” International Union of Crystallography, Oxford University Press, 2000.
76. Cullity, B.D., Stock, S.R., “Elements of X-Ray Diffraction” 3rd. Prentice Hall. 2001.

77. Skoog, D., Holler, F., Couch, S., Principios de Análisis Instrumental. Cengage Learning Editores. Sexta Edición. 2008.
78. Norling, T., Engrtöm, S., Larsson, K., Krog, N., Nissen, SS., 1992. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. Journal of Clinical Periodontology 19, 687-692.
79. Wells., 1988. J.Pharmaceutical Preforulation: The physicochemical properties of Drug Substances. Ellis Horwood Limited. Inglaterra.
80. United States Pharmacopeia (2007) United States Pharmacopeia/national formulary (USP 30 – NF 25). Volumen II. New York. USA. pp: 1553-1554.
81. Chowhan Z. Segregation of particulate solids. Part I. En: Pharmaceutical Technology. Volumen 9.Numero 5. 1995
82. Parrot E. Pharmaceutical Technology. Fundamental Pharmaceutics. Alpha Editions. USA. pp: 158. 1970.
83. Lieberman H, Lachman L, Schwarts J. Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets. Volume 1. Segunda edición. Marcel Dekker. USA.1989.
84. Paavonen, J., Mangioni, C., Martin, M.A., Wajszuk, C.P., 2000. Vaginal clindamycin and oral metronidazole for bacterial vaginosis: a randomized trial. Obstetrics and Gynecology 96, 256-260.
85. Antibiotic Chemotherapy Journal. 12: 547, 1962
86. Journal of Bacteriology 82:316-317,1961
87. British Pharmacopoeia, v. 2, pp. A191-A195, 1988.
88. Kavanagh, F., ed. Analytical microbiology. New York: Academic Press, 1963, pp. 345-356.

89. Kavanagh, F., ed. Analytical microbiology. Vol. 2. Ed. Academic Press, New York, 1972, pp. 348-350.
90. British Pharmacopeia, v.2, pp. A147-A152, 1988 y Addendum A375, 1990.
91. Journal of Biological Standardization. 10: 157-168, 1982.
92. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 444.42, 1987
93. <http://micro500.cs.cinvestav.mx.cdbb=1006>
94. Boxenbaum, H. 1998, Pharmacokinetics tricks and traps: flip-flop models. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science 1(3), 90-91
95. Wen, H., Park, K., 2010. Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery (Theory to Practice). Wiley. USA. 78, 87, 88, 94, 95, 96, 97.
96. Saridomichelakis, MN., Athanasiou, L.V., Chatzis, M.K., Salame, M., Katsoudas V., Pappas I.S., 2013. Concentrations of clindamycin hydrochloride in homogenates of normal dog skin when administered at two oral dosage regimens; Veterinary Quarterly 33(1), 7-12.
97. Lavy, E., Ziv, G., Shem-Tov, M., Glickman, A., Dey, A., 1999. Pharmacokinetics of clindamycin HCl administered intravenously, intramuscularly and subcutaneously to dogs; Journal Veterinary Pharmacology Therapeutic 22, pp: 261-265.
98. Batzias G.C., Delis G.A., Koutsoviti-Papadopoulou. 2004. A new HPLC/UV method for the determination of clindamycin in dog blood serum. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 35, 545-554.
99. Sánchez, R., 2010. Uso de la Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en liberación modificada de fármacos.

100. Brayden, D. 2003. Novel drug delivery strategies in veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal* 56, 310-316.
101. Batzias G.C., Delis G.A., Koutsoviti-Papadopoulou. 2004. A new HPLC/UV method for the determination of clindamycin in dog blood serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35, 545-554.