



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

**“Diseño de un formulado para vía oral de liberación modificada de
Azitromicina para uso en perros”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

PRESENTA:

ALONSO SIERRA RESÉNDIZ

Tutora Principal: Dinorah Vargas Estrada. FMVZ UNAM

Comité Tutorial:

Raquel López Arellano. FES Cuautitlán UNAM
Roberto Díaz Torres. FES Cuautitlán UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Diciembre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Resumen

La azitromicina es un antimicrobiano que se concentra preferentemente en leucocitos, macrófagos y fibroblastos, se libera en los tejidos infectados; es útil en el tratamiento de infecciones del sistema respiratorio, piel y tejidos blandos; su administración es complicada dado que se debe mantener la concentración terapéutica en tejidos evitando el incremento de la concentración plasmática causante de los efectos adversos.

En el presente estudio se llevaron a cabo ensayos preclínicos de dos nuevas formulaciones para el uso final en perros de dihidrato de azitromicina incluidas en una matriz polimérica (MRF) con el fin de modificar su liberación, se determinó la concentración del principio activo en suero y tejido pulmonar de conejillos de indias (*Cavia porcellus*) durante 96 horas posteriores a la administración por vía oral, y se comparó el comportamiento farmacocinético contra una presentación de liberación inmediata de uso comercial.

Aunque a lo largo del ensayo, los tres productos utilizados mostraron concentraciones terapéuticas efectivas; sin embargo; si existen diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones de azitromicina dihidrato de los MRF's con respecto al producto comercial de liberación inmediata.

De acuerdo a los resultados obtenidos los MRF's propuestos podrían ofrecer la oportunidad de contar con un producto innovador con capacidad para incrementar la amplitud de los intervalos de dosificación, con la reducción de picos de concentración plasmáticos que pueden ser responsables de efectos adversos o de riesgos tóxicos por acumulación del principio activo; además de reducir el nivel de estrés del paciente. Sin lugar a dudas, se requieren ensayos clínicos y estudios toxicológicos específicos para evaluar si estas preparaciones pueden considerarse potencialmente útiles en la especie objetivo.

Palabras clave: azitromicina, flip flop farmacocinética, liberación modificada.

Abstract

Azithromycin is an antimicrobial that is concentrated preferentially in leukocytes, macrophages and fibroblasts, it released in infected tissues; and it useful in the treatment of infections of the respiratory system, skin and soft tissues; its administration is complicated given that therapeutic concentration in tissues must be maintained avoiding the increase in plasma concentration that causes the adverse effects.

In the present study, preclinical trials were conducted on two new formulations for the final use in dogs of azithromycin dihydrate included in a polymeric matrix (MRF) in order to modify its release, determining the concentration of the active principle in serum and tissue of guinea pigs (*Cavia porcellus*) for 96 hours after oral administration, comparing the pharmacokinetic behavior against an immediate release presentation for commercial use.

Throughout the trial, the three products used showed effective therapeutic concentrations; nevertheless; there are statistically significant differences in the concentrations of azithromycin dihydrate in the MRFs with respect to the commercial product.

The proposed MRFs could offer the opportunity to have an innovative product with the capacity to increase the amplitude of the dosage intervals, with the reduction of plasma concentration peaks that may be responsible for adverse effects or toxic risks due to the accumulation of the principle active; in addition to reducing the level of stress of the patient. Undoubtedly, clinical trials and specific toxicological studies are required to evaluate whether these preparations can be considered potentially useful in the target species.

Keywords: azithromycin, pharmacokinetic flip flop, modified release.

Contenido

Resumen.....	II
Abstract	III
Cuadros	VII
Figuras	VIII
Imágenes	IX
Introducción	1
Hipótesis:.....	6
Objetivos	6
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	6
Generalidades	7
Macrólidos.....	7
Farmacología en la medicina veterinaria de la Azitromicina	9
Toxicidad de la Azitromicina.....	13
Sistemas de Liberación Modificada.....	13
Excipientes Utilizados.....	17
Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).....	17
Polímero ácido acrílico (Carbopol):.....	19
Alginato de Sodio.....	21
Estereato de Magnesio:.....	23
Maltosa:.....	24
Principio Activo: Azitromicina Dihidrato.....	26
Materiales	28
Equipos	28
Sustancias Químicas	28
Microorganismo de prueba.....	28
Programas computacionales utilizados para determinar la farmacocinética	29

Material biológico.....	29
Metodología	30
Inclusión y evaluación de Polvos	31
Reología	32
Densidad Aparente	32
Densidad Compactada	32
Densidad Verdadera	33
Porcentaje de Porosidad.....	33
Porcentaje de Compresibilidad o Índice de Carr	34
Radio de Hausner.....	34
Ángulo de Reposo	35
Humedad.....	36
Formulación.....	37
Elaboración y caracterización de las tabletas	37
Validación del sistema <i>In vitro</i>	38
1.- Linealidad.....	38
2.- Exactitud de la curva de Linealidad	39
3.- Linealidad del método	39
4.- Precisión	39
5.- Selectividad.....	39
Perfiles de Liberación	39
Curva de Calibración.....	40
Estudio <i>In vivo</i>	41
Administración de las formulaciones de Azitromicina Dihidrato.....	41
Determinación de la concentración de dihidrato de azitromicina del ensayo <i>In vivo</i>	42
Validación del sistema del ensayo <i>In vivo</i>	43
1.- Linealidad.....	43
2.- Exactitud de la curva de Linealidad	43

3.- Linealidad del método	43
Análisis Farmacocinético	44
Toxicidad aguda.....	45
Resultados.....	46
Pruebas Reológicas.....	46
Tableta por Compresión Directa	46
Validación del ensayo <i>In vitro</i>	47
1.- Linealidad.....	47
2.- Precisión del sistema	47
3.- Linealidad del método	48
Precisión.....	48
Selectividad	49
Prueba de Liberación <i>In vitro</i>	50
Curva de Calibración	50
Datos experimentales y ajuste lineal.....	51
Resultados de la disolución <i>In vitro</i>	51
Comparación de los perfiles de disolución <i>In vitro</i>	51
Adhesividad.....	52
Producto Comercial (CP).....	53
Formulado MRF1 (Formulado de Liberación modificada 1).....	53
Formulado MRF 2 (Formulado de Liberación modificada 2).....	54
Comparación de Perfiles	55
Validación parcial del ensayo <i>In vivo</i>	56
1.- Linealidad:.....	56
2.- Exactitud:	56
3.- Linealidad del método.-	57
Ensayo <i>In vivo</i>	57
Toxicidad aguda.....	60

Tratamiento estadístico	60
Discusión	62
Conclusiones	69
Referencias Bibliográficas	70

Cuadros

Cuadro 1- Parámetros farmacocinéticos de azitromicina en diferentes especies..	13
Cuadro 2.- Formulaciones de Azitromicina de liberación modificada propuestas..	31
Cuadro 3.- Relación de Propiedades de Flujo con respecto al porcentaje de compresibilidad (Índice de Carr).	34
Cuadro 4.- Relación de Propiedades de Flujo con respecto al Índice de Hausner	35
Cuadro 5.- Relación de Características de Flujo con respecto al Ángulo de Reposo.	36
Cuadro 6.- Diluciones para la determinación de la curva de calibración del ensayo <i>In vitro</i>	38
Cuadro 7.- Diluciones para la determinación de la curva de calibración del ensayo <i>In vivo</i>	43
Cuadro 8.-Características reológicas de las mezclas de polvos	46
Cuadro 9.- Características de las tabletas obtenidas por compresión directa	46
Cuadro 10.- Linealidad del sistema.....	47
Cuadro 11.- Exactitud de la curva de linealidad.....	47
Cuadro 12.- Linealidad del método	48
Cuadro 13.- Precisión del ensayo <i>In vitro</i> .-	48
Cuadro 14.-Criterios de aceptación para las pruebas de validación de acuerdo a la CNQFB	50

Cuadro 15.- Comportamiento de la liberación de fármaco <i>In vitro</i> para las diferentes formulaciones (CP, MRF1, MRF2)	55
Cuadro 16.- Comparación de Parámetros de CP vs MRF 1	55
Cuadro 17.- Linealidad del sistema.....	56
Cuadro 18.- Exactitud del sistema	56
Cuadro 19.-Linealidad del método	57
Cuadro 20.- Media \pm SD de las concentraciones de azitromicina en suero de cobayos	57
Cuadro 21.- Media \pm SD de las concentraciones de azitromicina en tejido pulmonar de cobayos.....	58
Cuadro 22.- Criterios de aceptación para las pruebas de validación de acuerdo a la CNQFB	58
Cuadro 23.- Valores farmacocinéticos en suero y tejido pulmonar	59
Cuadro 24.- Valores de concentración en diferentes tiempos y relación de la concentración suero/pulmón utilizados para el análisis estadístico por el método de Dunnet.	61
Figuras	
Figura 1.- Formula estructural Hidroxipropilmetilcelulosa	18
Figura 2.- Formula estructural del Carbopol	20
Figura 3.- Formula estructural Alginato de Sodio.....	22
Figura 4.- Formula estructural Estereato de Magnesio	23
Figura 5.- Formula estructural Maltosa	25
Figura 6.- Formula estructural de la Azitromicina dihidrato.....	27
Figura 7.- Angulo de Reposo	35
Figura 8.- Espectro UV-vis	49

Figura 9.-Curva de Calibración	51
Figura 10.- Perfil de Disolución CP	52
Figura 11.- Perfil de Disolución de HPMC- Alginato de Sodio	53
Figura 12.- Perfil de Disolución HPMC-Carbopol.....	53
Figura 13.- Media \pm DE de las concentraciones de azitromicina en suero y tejido pulmonar de cobayos adultos sanos.....	59

Imágenes

Imagen 1.- Modificación de las tabletas durante las 50 horas del ensayo	51
Imagen 2.- Adhesividad	52

Introducción

La práctica clínica veterinaria requiere de recursos cada vez más específicos para la atención de patologías determinadas, siendo las de naturaleza infecciosa un ejemplo claro de este tipo de necesidades; el grupo de fármacos identificados como macrólidos, son antibacterianos considerados como tiempo dependientes; es decir requieren del mantenimiento de concentraciones terapéuticas durante un período de tiempo prolongado, a diferencia de aquellos que necesitan elevadas concentraciones en poco tiempo (concentración- dependientes), esta es una de las razones por la que se piensa en la factibilidad de este tipo de fármacos para la creación de sistemas de liberación modificada (Sumano, et. al., 2015), ya que uno de los objetivos del diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos (SLCF) es eliminar la concentración plasmática máxima con lo que se logra una menor incidencia de efectos adversos, siendo ésta una de las principales diferencias con las formulaciones convencionales de liberación inmediata (Rajesh, et. al., 2005). Esto se puede lograr mediante la inserción del principio activo en una matriz polimérica, como lo muestran diversas fuentes (Costa, 2004; Doménech, 1998; Sáez, 2004). En el presente trabajo se busca generar un preparado farmacéutico que asegure concentraciones sostenidas por lo menos durante 48 horas; con ello el diseño de un producto de administración oral con mayores ventajas con respecto a los preparados disponibles en el mercado actual, entre otras razones debido a que se lograría eliminar la presencia de efectos colaterales adversos, consecuencia de concentraciones plasmáticas extremas, también se puede conseguir mayor comodidad en la administración, menor costo y conclusión del tratamiento con menor número de dosis requeridas (Doménech, et. al., 1998). La Azitromicina es un fármaco de relativa nueva incorporación al uso clínico veterinario pertenece al grupo de los macrólidos denominados azalidos, y es obtenida a partir de la eritromicina, es eficaz para el tratamiento de infecciones del aparato respiratorio, piel y tejidos blandos, y es útil para tratar algunas enfermedades como, Uretritis y Colitis infecciosas, (Lucas et. al.,2007); la Azitromicina es menos activa que la eritromicina contra Gram positivos

susceptibles y más activa contra algunos Gram negativos: *Vibrio cholerae*, *Campylobacter spp.*, *Neisseria spp.*, *Moraxella spp.*, *H. influenzae*, *Brucella spp.*, *Pasteurella spp.*, *Eikenella*, *Enterobacterias* tales como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.* y *Shigella spp.*; la azitromicina tiene efecto contra *Legionella spp.*. Con respecto a los microorganismos de crecimiento intracelular, es superior a la del resto de los macrólidos, también existe evidencia de su efecto terapéutico contra *Giardia* (Zygner, 2008) y micobacterias atípicas (Lucas et. al.,2007). La literatura reporta que debido a que se considera tiempo dependiente y que posee un efecto posantibiotico de aproximadamente 8 horas o más se prefieren formulaciones para liberación prolongada (Sumano, 2015).

Los macrólidos es una familia de antimicrobianos cuya estructura fundamental es un anillo lactona al que se unen azúcares básicos mediante enlaces glucosídicos neutros; este anillo se organiza por átomos de carbono conformando una estructura macrocíclica con diferente número de átomos (14, 15 o 16), lo que permite la clasificación de sus miembros, esta modificación química estructural, añade nuevos miembros al grupo con características diferentes (Hernando-Sastre, 2010), confiriéndole entre otras cualidades mayor potencia, eliminación prolongada, extensión de la vida media, estabilidad en pH ácido, mayor concentración en los tejidos y amplitud del espectro (Ara, 2010; Florey, 2014).

Existe evidencia notoria de las diferencias de los requerimientos terapéuticos, frecuencia, duración y dosis entre macrólidos (Eritomicina, Claritromicina) y la Azitromicina (Amsden, 1996), esta evidencia es atribuida a la incorporación de un radical metilo con un átomo de nitrógeno en la posición 9, lo que da lugar a una estructura conocida como azalida, que cuenta con un anillo lactona de 15 átomos de carbono (Ara, 2010)

La azitromicina cuenta con cualidades únicas respecto a otros macrólidos como son la eritromicina, claritromicina, roxitromicina (Guy, 1996).

La azitromicina se sintetizó en 1980 por un equipo de investigadores de la compañía Farmacéutica Pliva, dirigida por el Dr. Slobodan Đokic, patentado por Pfizer en 1981, bajo la marca Zithromax salió al mercado en 1991, la azitromicina tiene un peso molecular de 749, pKa de 9.9; es prácticamente insoluble en agua, es soluble en etanol anhidro y cloruro de metileno, su solubilidad máxima en agua es de 39 mg/mL en un pH 7.4 y 37 °C (USP) (Moffat, 2011; Patil, 2011).

Los antecedentes del uso de la azitromicina en la Medicina Veterinaria abarcan experiencia en rumiantes, equinos, cerdos, aves, gatos y perros; ya que debido al grupo de antibióticos al que pertenece y sus cualidades farmacológicas ofrece amplias posibilidades de aplicación en una extensa gama de enfermedades (Caballero, 2007). Cabe mencionar que en la actualidad solo existen presentaciones farmacéuticas de Azitromicina de liberación inmediata, a diferencia de la línea humana, como ya se mencionó la azitromicina presenta un efecto predominantemente tiempo-dependiente que requiere de por lo menos 4 veces la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Salgado, 2005) para conseguir el mejor efecto bactericida. A este respecto, si se estudia su inclusión en sistemas de liberación modificada redefiniendo una farmacocinética con permanencia orgánica de al menos 48 horas, se podrá contar con un nuevo formulado, sin que su diseño y obtención requiera de elevados costos de inversión como habitualmente exige el reto de generar nuevas opciones antimicrobianas en medicina veterinaria.

Esta consideración se fortalece, tomando en cuenta que desde hace años la investigación farmacéutica, centra una de sus ramas de investigación en la búsqueda de opciones para lograr acciones terapéuticas más selectivas, duraderas, y con efectos colaterales no deseables de menor intensidad; además de contar con mejores características de seguridad y eficacia (Doménech et. al., 1998); así con la investigación y desarrollo galénico dirigido a la búsqueda de novedosas formas de administración; que, también, suponen un claro beneficio para el paciente, debido a que optimizan la actividad terapéutica al aprovechar totalmente la cantidad de fármaco administrado, reduciendo al máximo la dosis

incluida en el medicamento, mejorando la pauta posológica, buscando una vía de administración más cómoda y la consecuente reducción del número de tomas, en el intento de conseguir una dosis única cada veinticuatro horas, y tanto mejor cuanto los intervalos de tiempo sean cada vez más amplios (Rodríguez et. al., 2000).

Los sistemas matriciales pueden ser considerados actualmente como una de las formas más fáciles y menos costosas de controlar la liberación de los principios activos. Estos sistemas prolongan y regulan la liberación del principio activo. Sin embargo; su desarrollo adecuado implica la elección de excipientes de acuerdo a las propiedades del fármaco que se desean modificar o mejorar (Silva, 2012).

En el presente estudio, se desarrollará una matriz polimérica a base de Hidroxipropilmetilcelulosa, mediante un análisis del perfil de liberación *In vitro* de dos formulados a base de matrices hidrofílicas y su comparación con un producto comercial vigente; así como el análisis de su farmacocinética *In vivo* en cobayos; mediante la concentración del principio activo en suero y tejido pulmonar.

Se utilizará la combinación Hidroxipropilmetilcelulosa-Carbopol (Sun, et. al., 2014); ya que el Carbopol es un polímero del ácido acrílico que tiene la habilidad de formar geles y la capacidad de adherirse a las mucosas, esta última propiedad prolonga el tiempo de residencia de las formulaciones en el sitio de absorción del principio activo y reduce el contacto e irritación en la superficie de contacto (Rajesh et al., 2012; Goskonda et al., 1998; Blanco-Fuerte et al., 1996). El segundo formulado es resultado de la combinación de Hidroxipropilmetilcelulosa - Alginato de Sodio; este es un agente viscosante que principalmente se usa como agente modificador de la viscosidad del gel de la matriz hidrofílica en la que se incluye (Mehra et. al., 2011).

Considerando todo lo anterior, los objetivos de este estudio son evaluar tres preparados farmacéuticos en forma de tableta, dos de ellos formados a base de Hidroxipropilmetilcelulosa para incrementar el tiempo de duración de las

concentraciones terapéuticas en sangre, lo que ampliará el intervalo de administración respecto a los productos ya existentes, disminuyendo la aparición de efectos adversos, el estrés del paciente y el costo del tratamiento. Adicionalmente se determinará la farmacocinética de las formulaciones obtenidas después de su administración enteral a una dosis de 8 mg/Kg de peso corporal en cobayos clínicamente sanos, dosis que equivale al 50% de la dosis mínima recomendada en cobayo (Plumb, 2010), el tercer formulado será un producto comercial de liberación inmediata; ambos formulados son complementados con maltosa de compresión directa y estereato de magnesio, elaborados mediante compresión directa a 44,482 kN de presión, con el propósito de seleccionar el formulado con las mejores cualidades de liberación modificada de Azitromicina.

Hipótesis:

Diseñar un formulado de una sal de Azitromicina incluida en una matriz hidrofílica que controle su liberación durante un tiempo mayor a 48 horas.

Objetivos

Objetivo General

Elaborar tabletas compuestas de polímeros hidrofílicos asociados a dihidrato de azitromicina con el fin de controlar su liberación para mantener las concentraciones terapéuticas durante un tiempo mayor a 48 horas.

Objetivos Específicos

1. Conocer las propiedades fisicoquímicas de una sal de Azitromicina que permitan definir su manejo, condiciones de análisis y estabilidad.
2. Seleccionar los excipientes ideales para la formulación de tabletas de Liberación modificada de Azitromicina.
3. Caracterizar diferentes presentaciones de Azitromicina en forma de tableta con el fin de determinar su perfil de liberación.
4. Comparar el comportamiento de liberación de Azitromicina de los formulados propuestos contra el de una presentación comercial existente en el mercado.
5. Seleccionar el formulado óptimo en función del comportamiento de liberación mostrado en el ensayo *In vitro* e *In vivo*.

Generalidades

Macrólidos

Con el descubrimiento en 1952 de la eritromicina se incorporó una nueva familia de antimicrobianos: la de los macrólidos, dicho compuesto fue aislado por Mc Guire y colaboradores a partir de los productos metabólicos de una cepa de *Streptomyces erithraeus* obtenida a partir de una muestra de suelo recogida en el archipiélago filipino. Después de 3 décadas, y a pesar de no tener un efecto tan amplio como los betalactámicos, las quinolonas o los aminoglucósidos, la incorporación de una nueva generación, a permitido que se consideren estos nuevos compuestos de elección contra algunos microorganismos y como primera opción frente a otros (Florey, 2014).

En la actualidad, se consideran como macrólidos de segunda generación a los que tienen un origen semisintético, con un espectro de acción más amplio, menos efectos secundarios y mejores características farmacocinéticas y farmacodinámicas como: la azitromicina, los cetólidos, la claritromicina, diritromicina y roxitromicina (Caballero, 2007).

Los Macrólidos entre otras propiedades químicas presentan: poca solubilidad en agua, tienen aspecto cristalino blanco, son bases débiles que se inactivan en medio ácido, de ahí que se presenten en forma de sales o ésteres que son más resistentes a los ácidos, así como que en sus presentaciones orales tengan una cubierta entérica para protegerlos de la acción de los ácidos gástricos (Gundián et. al., 1998).

Por su estructura química, los macrólidos se le divide en cuatro grupos principales: macrólidos de 14 átomos (Eritromicina, Oleandomicina, Troleandomicina, roxitromicina y claritromicina), de 15 átomos también denominados azálidos (Azitromicina), de 16 átomos (Espiramicina, Josamicina, Tilosina, Carbomicina) y los no clasificados (Tilmicosina, Tulatromicina) (Sumano et. al., 2014).

La azitromicina contiene un átomo de nitrógeno sustituido con metilo en el anillo de lactona que le otorga una mayor estabilidad y biodisponibilidad en pH ácido con respecto a la eritromicina (Florey, 2014).

Los macrólidos son antibióticos bacteriostáticos que inhiben la síntesis proteica ligándose de forma reversible al dominio V del ARN ribosómico 23S, la unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr 50S, en tanto que los macrólidos de 16 átomos actúan en la fase del ensamblaje de los aminoácidos, previa a la acción de los de 14 átomos. Son bactericidas según el microorganismo, la fase de crecimiento, el inóculo, el pH del medio y la concentración del antibiótico. Se ha planteado la posibilidad de que la eritromicina no inhibe la formación de la cadena polipeptídica y no interfiere a la acción del cloranfenicol, ya que actúa en el mismo sitio (*The United States Pharmacopeial Convention; 2007*).

En el caso específico de la azitromicina es un agente bacteriostático ya que inhibe la síntesis de proteínas uniéndose de forma reversible a las subunidades ribosómicas 50S de microorganismos sensibles. Las células son considerablemente más permeables a la forma ionizada, lo que probablemente explica el aumento de la actividad antimicrobiana a pH alcalino (Florey, 2014).

Debido a su mecanismo de acción e inhibición de la síntesis proteica, los macrólidos tienen efecto inmunomodulador inhibiendo la producción de Citokinas proinflamatorias, la quimiotaxis e infiltración de neutrófilos en la mucosa de las vías respiratorias; así como la secreción de moco, por lo que algunos investigadores han propuesto su inclusión en protocolos terapéuticos para la atención de enfermedades como bronquiolitis difusa, fibrosis quística, asma, sinusitis crónica y bronquiolitis crónica (Amat, 2005). A nivel bacteriano se ha reportado la inhibición de la producción de toxinas bacterianas; el caso de infección con *Pseudomonas* se ha reportado de la inhabilitación de la formación del biofilm (Caballero, 2007); en cepas de *Haemophilus influenzae* expuesta a concentraciones supinhibitorias se reporta el incremento de la opsonización

dependiente de la activación del complemento y en *Staphilococcus spp* se reporta la susceptibilidad de las bacterias fagocitadas a los mecanismos de muerte intracelular cuando son expuestas a valores inferiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Amat, 2005).

Existen propuestas de diseño de formas farmacéuticas de liberación prolongada de Azitromicina debido a que ha mostrado en estudios *In vitro* e *In vivo* su capacidad de alojarse, transformarse y liberarse en los sitios de infección por medio de los polimorfonucleares, neutrófilos y macrófagos. La captación no es saturable, por lo que la entrega del régimen terapéutico en una sola dosis de azitromicina debería conducir a una mayor captación y suministro del fármaco a los sitios de infección, logrando una mayor concentración en el área de infección maximizando la eficacia y reduciendo la incidencia de efectos colaterales adversos (Blumer, 2005).

Hasta el año 2017 se encontró en la literatura diversos trabajos de liberación modificada de azitromicina, diseñados para su administración local principalmente mediante películas de uso de oftálmico y de efecto sistémico por vía enteral en forma de tabletas, supositorios, emulsiones, suspensión de nanoparticulas, de microesferas, microemulsión, liposomas; así como cápsulas de gelatina, geles y sistemas flotantes. En el ámbito veterinario la investigación y desarrollo de productos formulados con estas cualidades es muy limitado; en tanto que en el mercado solo existe una suspensión de microesferas autorizada para su uso humano por la FDA,

Farmacología en la medicina veterinaria de la Azitromicina

La Azitromicina se presenta en tres tipos de sales (anhidro, monohidrato y dihidrato); por vía oral se absorbe rápidamente y se distribuye ampliamente en todo el cuerpo, excepto cerebro y líquido cefalorraquídeo; posterior a su administración oral alcanza concentraciones plasmáticas máximas en un período muy corto; debido a sus cualidades distributivas se logra mantener constante la concentración plasmática después de una primera dosis de carga y la

consecuente administración durante 4 días de dosificaciones de sostén equivalentes al 50% de la dosis terapéutica, cuya frecuencia depende de la presentación que prescriba (Lee, 2001).

Las propiedades farmacocinéticas de la azitromicina incluyen amplia distribución en tejidos y altas concentraciones de fármaco dentro de las células (incluyendo fagocitos), dando como resultado concentraciones mucho mayores de fármacos en tejidos o secreciones respecto a las concentraciones plasmáticas; pudiendo alcanzar una vida media tisular prolongada desde la primera administración; se reporta en perros de hasta 90 horas. *In vivo* los fibroblastos tisulares actúan como el reservorio natural del fármaco. Los datos de estudios en animales indican que la azitromicina en presentaciones de liberación inmediata atraviesa la placenta por la característica endoteliocorial de los carnívoros (Parnham, et. al., 2014; Roa, et. al., 2012).

La unión con proteínas plasmáticas varía en las diferentes especies, Se metaboliza en hígado mediante la desmetilación produciendo metabolitos inactivos, en perros el 50% de una dosis oral se excreta sin cambios por vía biliar siendo esta la principal vía de eliminación. Sólo el 12% del fármaco se excreta sin cambios por orina. La semivida de eliminación ($t_{1/2}$) se prolonga por retención en el tejido y mediante su inclusión en fagocitos. (*The United States Pharmacopeial Convention, 2007*). La azitromicina tiene un espectro relativamente amplio, *In vitro* tiene actividad contra microorganismos Gram positivos tales como *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, contra microorganismos Gram negativos tales como *Haemophilus influenzae*; *Bordetella spp* y *Mycoplasma pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* y *Toxoplasma spp*. (Plumb, 2010); incluso se reporta su efectividad contra infecciones de *Giardia intestinalis* (Zygner, 2008).

Presenta un efecto predominantemente tiempo dependiente con un efecto posantibiotico de 8 horas o más (Plumb, 2010); su mecanismo de acción es mediante la inhibición de la síntesis proteica, la unión se realiza mediante la

formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macróido y determinadas bases del ARNr 50S (Caballero, 2009).

La diferencia entre las sales de Azitromicina (anhidro, monohidrato y dihidrato) radica en la dificultad que representa su manejo comercial dado que la primera se presenta de tipo amorfo y la segunda es sumamente higroscópica requiriendo condiciones especiales para su manejo (Singh, et. al., 2008).

La azitromicina dihidrato presenta una mayor resistencia al pH ácido del estómago lo que incrementa su biodisponibilidad por vía oral; sus presentaciones comerciales son en forma de tableta recubierta o suspensión considerada esta última formulación como de liberación prolongada autorizada para su uso por la FDA; las presentaciones en forma de cápsula reportan la reducción de su absorción por presencia de contenido alimenticio; pero no en el caso de tableta y suspensión (Florey, 2014); respecto a presentaciones de uso parenteral existen soluciones intravenosas; dado que el pH alcalino de las diferentes sales impide la aplicación intramuscular por el riesgo de lesiones en el tejido en donde es administrado. Respecto a presentaciones de uso veterinario para perros; existen en el mercado latinoamericano formulaciones orales en forma de tableta o suspensión; todas ellas de liberación inmediata que sugieren su administración cada 24 horas durante 3 días o bien dosis de sostén equivalente al 50% después de la primera ingesta durante 4 días.

Por otro lado su rápida biodisponibilidad oral obliga a la búsqueda de formulaciones que mantengan las concentraciones durante los períodos necesarios para obtener el mejor resultado terapéutico; la distribución, metabolismo, eliminación y residuos incrementan la vida media; ya que la azitromicina se concentra en tejidos, particularmente en leucocitos, macrófagos y fibroblastos, liberándose lentamente de los leucocitos; este reservorio intracelular produce aparentemente concentraciones efectivas de fármaco en fluidos intersticiales incluso después de que las concentraciones plasmáticas hayan disminuido por debajo de niveles detectables (Lee, 2001; The *United States*

Pharmacopeial Convention, 2007); la acumulación intracelular, también es importante en lo que referente a la acción antimicrobiana sobre microorganismos intracelulares y la capacidad de modificar la facultad de respuesta de células implicadas en la inmunidad; inhibiendo la producción de radicales oxidantes por células estimuladas y en la producción de citokinas proinflamatorias; especialmente las derivadas de la Eritromicina A; además de estimular directamente la exocitosis de los neutrófilos; todo ello asociado a la prevención de complicaciones inflamatorias en el aparato respiratorio, en procesos locales, infecciones y trauma quirúrgico (Amat, 2005).

Los parámetros farmacocinéticos del plasma tienen poca correlación con la eficacia *In vivo*. La azitromicina también puede administrarse a tejidos infectados y abscesos tempranos a través de leucocitos (*The United States Pharmacopeial Convention, 2007*).

La relación farmacocinética /farmacodinámica (PK / PD) de la azitromicina descrita en algunos de los parámetros del Cuadro 1 en diferentes especies y su acción tiempo dependiente sugiere la posibilidad de diseñar un preparado oral de acción prolongada con una fase inicial de liberación inmediata que permita alcanzar niveles terapéuticos en un período de tiempo breve y mantenerlos durante un mayor período de tiempo comparado con los productos de liberación inmediata existentes en el mercado; lo que podría mejorar sus efectos antimicrobianos y la reducción de los efectos colaterales. Estas consideraciones fueron el motivo para el diseño de un preparado experimental de liberación modificada y su comparación con una forma comercial de liberación inmediata.

Cuadro 1- *Parámetros farmacocinéticos en diferentes especies*

Especie	PP (%)	$t_{1/2}$ (h)	V_d (L/Kg)	Cl	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	F (%)
Gato		35	23	10.7	0.85	0.97	58
Perro (Beagle)	16-26*	29	12		0.33	4.2	97
Potro 8-14 semanas		16-16.3	12.4- 11.6	10			
Potro 8-14 semanas		20.3	22.3-18.6	10.4	1.4	0.72	39
Humano	7-50	11 a 14	33		2-3	0.4	37

PP: Unión a Proteínas plasmáticas; $t_{1/2}$: Vida media; V_d : Volumen de distribución, Cl: Depuración; t_{max} : Tiempo en el que se alcanza la concentración máxima; C_{max} : Concentración máxima; F: Biodisponibilidad.

*La unión con proteínas plasmáticas es dependiente de la concentración, se incrementa la unión en la medida que reduce la concentración del Principio Activo. Tomado de: *The United States Pharmacopeial Convention; 2007.*

Toxicidad de la Azitromicina

Se ha reportado el posible efecto cardiotoxico en ratas con la administración de una sobredosis equivalente a 3 veces la dosis terapéutica (Atli, et. al, 2015); respecto al riesgo hepatotóxico se ha informado la inocuidad del principio activo y su comparación con otros compuestos del mismo grupo como es la eritromicina (Matti, et. al., 1996; Viluksela, et. al. 1996); en casos de dosis repetidas, se ha demostrado una baja acumulación en sistemas y órganos (ojo, ganglio de la raíz dorsal, hígado, vesícula biliar, riñón, bazo y páncreas), observando fosfolipidosis (unión de fosfolípidos intracelulares) en algunos tejidos de perros que recibieron dosis múltiples, todos estos efectos se reportan como reversibles después del cese de la administración (Atli et. al., 2015; Matti et. al., 1996; ZITHROMAX®, 1999); por lo que en este trabajo se busca su inclusión en una matriz polimérica reducirá el riesgo e incidencia de estos efectos evitando las concentraciones pico comunes en las formulaciones de liberación inmediata.

Sistemas de Liberación Modificada

En la medicina veterinaria, al igual que en la medicina humana, el desarrollo de la tecnología farmacéutica en los últimos años ha facilitado el diseño y producción de diversas formulaciones de liberación modificada, mejorando el perfil terapéutico de numerosos fármacos; comprobando su eficacia y seguridad mediante ensayos

clínicos controlados antes de su aplicación en la práctica clínica. Ello ha sido posible gracias a la introducción de nuevos materiales; tales como los polímeros biocompatibles; además de un mayor conocimiento de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los principios activos, la industria farmacéutica se ha enfocado en la búsqueda de la optimización de la respuesta como elemento esencial en la manufactura de nuevas formulaciones (Domínguez-Gil, 2004).

El desarrollo de materiales poliméricos biocompatibles se ha producido durante los últimos cincuenta años en un intento de superar las limitaciones de algunas intervenciones médicas, especialmente en cirugía cardiovascular. Actualmente, son numerosos los sistemas de liberación modificada de fármacos que se agrupan en: polímeros no degradables: siliconas, copolímeros del óxido de etileno y el acetato de vinilo (EVAc), poliuretanos, etc.; polímeros biodegradables: poliésteres (polímeros pLGA), copolímeros de metil-vinil éter y anhídrido maleíco, poliortoésteres, polianhídridos, poliaminoácidos, etc.; polímeros hidrosolubles: derivados celulósicos, quitosan, dextranos, acrilatos, acrilamidas, polietilenglicoles, etc. Los modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos relacionan la dosis de fármaco administrado, la concentración alcanzada en fluidos corporales y el efecto farmacológico, expresados como variables clínicas asociadas o finales de la respuesta (Caro, 2012).

Esta relación puede ser sencilla, como ocurre con los antibióticos, analgésicos, etc. o en ocasiones muy compleja, como es el caso de hormonas exógenas (Eritropoyetina, hormona del crecimiento, etc.); el uso de estos modelos permite hacer predicciones de posibles cambios en la intensidad y duración de la respuesta cuando se modifican las características de una formulación farmacéutica (Domínguez-Gil, 2004).

Los objetivos clínicos que se plantean al diseñar una formulación de liberación modificada son, de acuerdo con el National Prescribing Center del Reino Unido (2000), los siguientes:

- Aumentar el intervalo de dosificación con el fin de mejorar el cumplimiento de la prescripción médica.
- Reducir las fluctuaciones de las concentraciones séricas de los fármacos (C_{max}/C_{min}) con objeto de disminuir los efectos adversos y/o mejorar la efectividad terapéutica.
- Controlar el lugar de liberación del fármaco para incrementar su efectividad terapéutica (Domínguez-Gil, 2004).

Farmacéutica de los formulados de administración oral

Debido a su fácil acceso, bajo costo y menor requerimiento de equipo o conocimiento técnico para su uso, la vía de administración oral es por mucho la ruta de elección de dosificación de fármacos; es calificada como la vía más segura de incorporación de un fármaco al organismo dado que no implica pérdida de la continuidad de tejidos con el consecuente incremento de riesgo de contagio. En general, ofrece buenos parámetros de absorción; sin embargo; en algunos casos requiere del incremento del tiempo de permanencia de la presentación farmacéutica o garantizar la relación física con la superficie de contacto del producto y mucosa específica; factores trascendentales en la absorción del principio activo; para este propósito existen los sistemas de liberación modificada (SLM) de fármacos, que prolongan el tiempo de residencia en el estómago (Gastroretentivos), con el fin de:

- I. Garantizar la actividad local en el estómago.
- II. Ofrecer una ventana de absorción en el estómago o porciones anteriores del intestino
- III. Evitar la degradación del producto activo en porciones distales de intestino o colon
- IV. Evitar la reducción de la solubilidad por variaciones de pH del medio (Jimenez, 2006; Scott, 2013).

Entre los parámetros más críticos para cualquier fármaco candidato para llevar a cabo un rediseño de liberación modificada están la tolerabilidad, la dosis, la solubilidad y la permeabilidad. Para las formulaciones de liberación modificada, el tránsito gastrointestinal o la superficie de absorción ofrecida son obstáculos añadidos; por lo que el tiempo de permanencia en el área ideal; ya sea por sus dimensiones o características fisicoquímicas específicas; garantizará la disposición exitosa en las concentraciones y tiempos ideales (Sutton, 2004; Weston; 2013).

Excipientes Utilizados

Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC): Es ampliamente utilizada en formulaciones farmacéuticas orales, oftálmicas, nasales y tópicas. En los productos orales, la HPMC se usa principalmente como un aglutinante para tabletas, en recubrimiento de película y como matriz para uso en formulaciones de tabletas de liberación prolongada. La inclusión de este excipiente oscila entre 2% y 5% de peso usándose como un aglutinante en procedimientos de granulación en húmedo o en seco. Los grados de alta viscosidad pueden utilizarse para liberar fármacos de una matriz a niveles de 10-80% p/p en comprimidos y cápsulas; Se han desarrollado y comercializado presentaciones para facilitar la compresión directa de comprimidos que presentan un rendimiento de liberación modificada.

Los derivados E y K son los más utilizados en la formulación de preparados de liberación controlada, el número que sigue a la designación química identifica la viscosidad del producto en milipascales segundos (mPa·s), medida a una concentración de 2% en agua a 20°C, y el sufijo “LV” identifica al producto como de baja viscosidad (Sánchez, et. al., 2010).

Nombre del excipiente Hidroxipropilmetilcelulosa

Sinónimos Benecel MHPC; E464; Hidroxipropilmetilcelulosa; HPMC; Hipromelosa; Methocel; Éter de propilenglicol de metilcelulosa; Metil hidroxipropilcelulosa; Metolosa; MHPC; Pharmacoat; Tylopur; Tylose MO

Función Material bioadhesivo, agente de recubrimiento, de liberación controlada, dispersante; potenciador de la disolución, agente emulsionante, estabilizador de emulsión, agente de liberación prolongada, formador de película, espumante, ayuda a la granulación, agente de liberación modificada, mucoadhesivo; agente

modificador de la liberación; solubilizante; estabilizante, de suspensión, agente de liberación sostenida, carpeta de tabletas, espesante, agente de aumento de la viscosidad.

Acidez / alcalinidad	5.0-8.0 para una solución acuosa al 2% p / p.
Densidad	Densidad (compactada) 0.557g / cm ³ Densidad (verdadera) 1.326g / cm ³
Punto de fusión	Punto de fusión Brown a 190-200°C Chars en 225-230°C. La temperatura de transición vítrea es 170-180°C.
Higroscopicidad	Absorbe la humedad de la atmósfera; La cantidad de agua absorbida depende del contenido de humedad inicial y de la temperatura y humedad relativa del aire circundante.
Toxicidad en Perros	No existe reporte de sobredosis, citotoxicidad y mutagenicidad del compuesto (Rowe, et al, 2009).

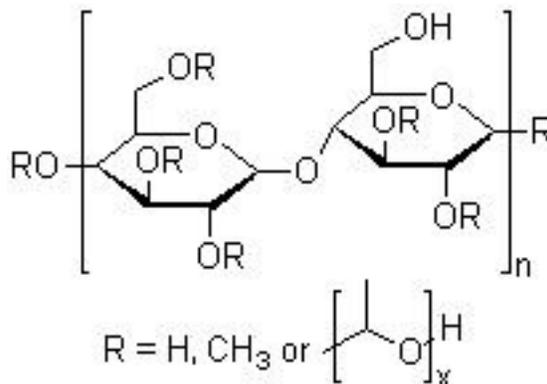


Figura 1.- Formula estructural Hidroxipropilmetilcelulosa

Polímero ácido acrílico (Carbopol): sinónimos Carbómero, Carbopol, Ácido Poliacrílico: Copolímero del ácido acrílico, compuesto de elevado peso molecular, reticulado con anillos de sacarosa o éteres de pentaeritritol, contiene entre 52 y 68% de ácido carboxílico, es considerado material bioadhesivo, agente de liberación controlada, estabilizador de emulsiones y aglutinante de tabletas, es incluido en procesos de granulación fluida, las sales catiónicas reducen su pegajosidad e incrementan la liberación del Principio Activo, la inclusión como aglutinante de tabletas es de 0.75 a 3%, para regular la liberación del principio activo la inclusión recomendada fluctúa entre el 5 y 30% (Rowe et. al, 2009).

Carbopol 71G puede ser usado en las preparaciones orales, suspensiones, cápsulas o tabletas. En las formulaciones de comprimidos, los carbómeros se usan como agentes de liberación controlada o como aglutinantes. Los carbómeros reticulados (viscosidad más baja) son en general menos eficientes en el control de la liberación del fármaco en comparación con carbómeros con enlaces altamente cruzados (viscosidad superior). En los procesos de granulación en húmedo, el agua, disolventes o sus mezclas se pueden usar como el fluido de granulación. La adhesión de la masa húmeda puede ser reducido mediante la inclusión de talco en la formulación o mediante la adición de ciertas especies catiónicas al fluido de granulación. Sin embargo, la presencia de sales catiónicas pueden acelerar las tasas de liberación de fármaco y reducir propiedades bioadhesivas. Los polímeros de carbómero también han sido investigados en la preparación de perlas de matriz de liberación sostenida, como inhibidores de la enzima de proteasas intestinales en formas de dosificación que contienen péptidos (Carbopol ®* 71G NF, 2008).

Nombre del excipiente	Carbopol 71G
Sinónimos	Carbomero, Carbopol, Ácido Poliacrílico: copolímero del ácido acrílico
Función	Material bioadhesivo, agente de liberación controlada,

estabilizador de emulsiones y aglutinante de tabletas

Punto de Fusión	260°C durante 30 minutos
Solubilidad	Agua, etanol y glicerina
Estabilidad	Temperaturas mayores a 104°C pueden causar cambio de coloración y afectar su eficiencia espesante. La exposición excesiva a temperaturas elevadas causa decoloración y reduce la estabilidad.
Incompatibilidades	Se decolora con resinol. Es incompatible con fenol, polímeros catiónicos, ácidos fuertes y altos niveles de electrolitos.
Seguridad	En perros se reportan dosis de hasta 8 g/Kg sin mostrar efectos fatales, en la especie humana el polvo puede generar irritación de mucosas (Carbopol®* 71G NF, 2008).

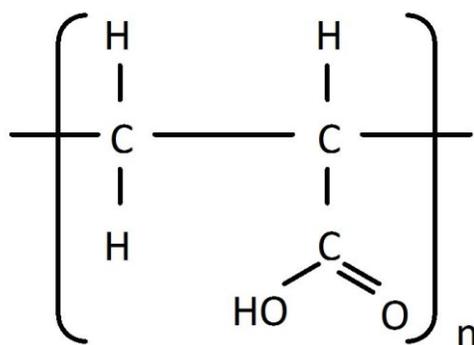


Figura 2.- Formula estructural del Carbopol

Alginato de Sodio: Se utiliza en una variedad de formulaciones farmacéuticas orales y tópicas. En las formulaciones de comprimidos, puede utilizarse como desintegrante, se ha usado como diluyente en formulaciones en cápsulas, puede retrasar la disolución de un fármaco de comprimidos en combinación con el efecto del tamaño de partícula, la viscosidad y la composición química condicionando la liberación del principio activo de formulaciones orales de cápsulas y suspensiones acuosas. Recientemente, el alginato de sodio se ha utilizado para la microencapsulación acuosa de fármacos, en contraste con las técnicas de microencapsulación más convencionales que utilizan sistemas de disolventes orgánicos. También se ha utilizado en la formación de nanopartículas. (Alginates; 2003; Rowe et. al, 2009).

Es un polisacárido anionico biocompatible y biodegradable con elevada capacidad para formar geles a temperatura ambiente, que incrementa su viscosidad con la reducción del pH (Luna, 2015).

Nombre del excipiente	Alginato de Sodio
Formula	$(C_6H_7O_6Na)_n$
Sinónimos	Alginato sódico; Algin Ácido algínico, sal sódica; E401; Kelcosol; Keltone; Natrii alginas; Protanal; Polianuronato sódico.
Función	Agente estabilizante de suspensión, Comprimido y desintegrante de cápsula, aglutinante de tabletas, Agente de aumento de la viscosidad.
Acidez / alcalinidad	pH 7.2 (solución acuosa al 1% p / v)
Solubilidad	Prácticamente insoluble en etanol (95%), éter, cloroformo y mezclas de etanol/agua en las que el contenido en etanol es superior al 30%. También, prácticamente

insoluble en otros disolventes orgánicos y soluciones ácidas acuosas en las que el pH es menor que 3. Lentamente soluble en agua, formando una solución coloidal viscosa.

Densidad

Densidad (compactada) 0.557g/cm³

Densidad (verdadera) 1.326g/cm³

Punto de fusión

Punto de fusión Browns a 190-200°C.

Chars en 225-230°C.

La temperatura de transición vítrea es 170-180°C.

Higroscopicidad

Absorbe la humedad de la atmósfera; la cantidad de agua absorbida depende del contenido de humedad inicial y de la temperatura y humedad relativa del aire circundante.

Toxicidad en Perros

Considerado como atóxico y no irritante, la única especie con reportes de DL50 es la rata con la ingesta mayor a 5 g/Kg; en humanos no existe reporte de toxicidad por vía oral. (Alginates, 2003)

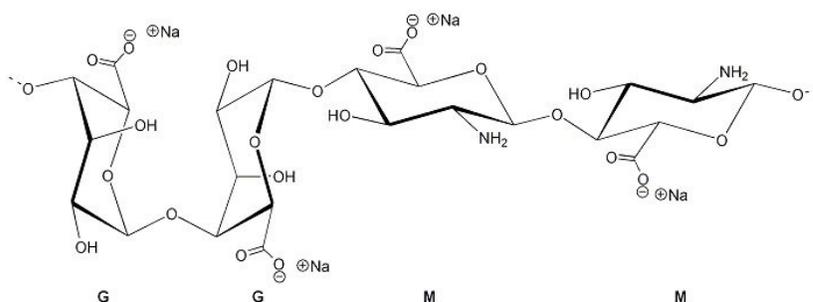


Figura 1.- Formula estructural Alginato de Sodio

Estereato de Magnesio: Se utiliza principalmente como lubricante en la fabricación de cápsulas y tabletas a concentraciones entre 0.25% y 5.0% p/p.

Nombre del excipiente	Estereato de Magnesio
Sinónimos	Estearato de magnesio dibásico; diestearato de magnesio; esteras de magnesia; octadecanoato de magnesio; ácido octadecanoico, sal de magnesio; ácido esteárico, Synpro 90.
Función	Lubricante en cápsulas y tabletas
Acidez / alcalinidad	PH 7.2 (solución acuosa al 1% p/v)
Solubilidad	Prácticamente insoluble en etanol, etanol (95%), éter y agua; Ligeramente soluble en benceno caliente y etanol caliente (95%).
Densidad	Densidad (masa) 0.159 g/cm ³ Densidad (tara) 0.286 g/cm ³ Densidad (verdadera) 1.092 g/cm ³
Toxicidad en Perros	Las evaluaciones de toxicidad en ratas han indicado que no es irritante para la piel y no es tóxico cuando se administra oralmente o inhalado. No se ha demostrado que el estearato de magnesio sea cancerígeno (Magnesium stearate MSDS, 2013).

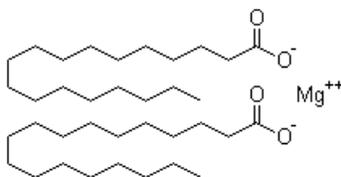


Figura 2.- Formula estructural Estereato de Magnesio

Maltosa: Se presenta como cristales blancos o como polvo cristalino, inodoro con un sabor dulce, aproximadamente el 30% de la sacarosa.

La maltosa es un carbohidrato disacárido ampliamente utilizado en alimentos y productos farmacéuticos. En los productos parenterales, la maltosa puede usarse como una fuente de azúcar, particularmente para pacientes diabéticos. La maltosa cristalina se usa como un excipiente en comprimidos para compresión directa en tabletas masticables y no quirúrgicas. (Maltose monohydrate MSDS, 2013; Rowe et. al., 2009).

Nombre del excipiente	Maltosa
Sinónimos	Advantose 100; Finetosa; Finetose F; 4-O-a-D-glucopiranosil-b-D glucosa; 4-(a-D-glucósido)-D-glucosa; Azúcar de malta; Maltobiose; Maltodiosa; Maltosa HH; Maltosa HHH; Sunmalt; Sunmalt S.
Función	Agente edulcorante; Diluyente para tableta
Nombre Químico	4-O-a-D-Glucopyranosyl-b-D-glucopyranose anhydrous [69-79-4] 4-O-a-D-Glucopyranosyl-b-D-glucopyranose monohydrate [636353-7]
Acidez / alcalinidad	pH 4.5 – 6.5 para una solución acuosa al 10% p/v.
Ángulo de Reposo	37.18 para adventose 100
Solubilidad	Muy soluble en agua; muy poco soluble en etanol frío (95%); prácticamente insoluble en éter.
Densidad	Densidad (masa) 0.67-0.72 g/cm ³ para Advantose 100. Densidad (compactada) 0.73-0.81 g/cm ³ para Advantose 100.

Toxicidad en Perros

Material esencialmente no tóxico y no irritante, existe el reporte de un paciente humano que recibió vía intravenosa el compuesto presentando un síndrome similar a la hiperglucemia (Rowe et. al, 2009).

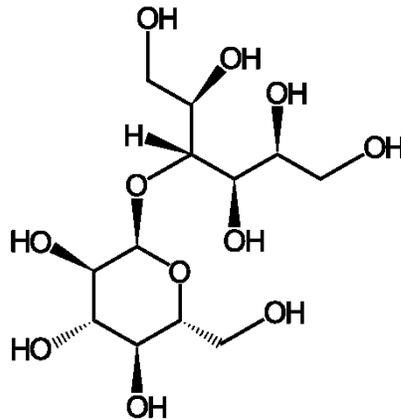


Figura 3.- Formula estructural Maltosa

Principio Activo: Azitromicina Dihidrato

La azitromicina fue sintetizada en 1980 por un equipo de investigadores de la compañía farmacéutica croata Pliva, dirigida por el Dr. Slobodan Đokic, y patentada en 1981. La empresa Pfizer la lanzó al mercado en 1991 bajo la marca Zithromax. Después bajo la licencia de Pliva se incorporó en otros mercados durante varios años, La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos aprobó AzaSite, una formulación oftálmica de azitromicina, para el tratamiento de infecciones oculares. (Bakheit, 2014).

Nombre del Compuesto	Azitromicina
Sinónimos	Atsitromysiini; Azithromycine; Azithromycinum; Azitromicina; Azitromicinas; Azitromisin; Azitromycin; Azytromycyna; CP-62993; XZ-450; Azithramycine; Azithromycin Dihydrate; Azithromycine [Francés]; Azithromycinum [Latín]; Azitromicina (Español)
Función	Agente Antimicrobiano
Formula	$C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot 2H_2O$
Peso Molecular	749
pKa	9.9
Solubilidad	La azitromicina es prácticamente insoluble en agua y libremente soluble en etanol anhidro y cloruro de metileno. 39 mg/mL de agua a un pH 7.4 y 37 °C (USP)
CMI	0.12 - 2 µg/mL (Jennifer, 2001; Moffat, 2011)
Toxicidad en Perros	Referido en la sección de Azitromicina

Farmacología

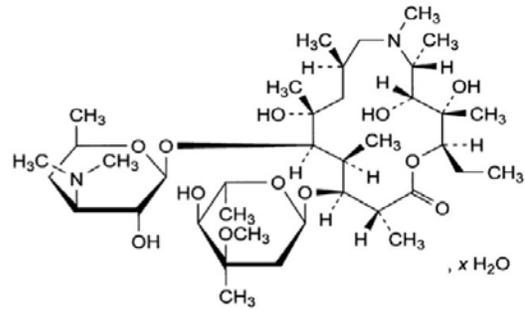


Figura 4.- Formula estructural de la Azitromicina dihidrato

Materiales:

Las dos formulaciones propuestas fueron preparadas en el laboratorio de tecnología farmacéutica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, en un área limpia y controlada, utilizando los siguientes materiales:

Equipos:

- Balanza analítica, capacidad 65 g, sensibilidad 0.1 mg
- Balanza térmica Marca Ohaus MB 35 Halogen
- Durómetro marca Schleunlger Modelo 2e Tablet Hardness Tester
- Espectrofotómetro UV-vis. Modelo S2000 Ocean Optics Inc, (China)
- Fragilizador TEMSA Modelo JTR04
- Incubadora- Agitadora modelo SI-45 de la marca Biocotek (China)
- Picnómetro Blaubrand® ajustado 5.222 ml
- Prensa hidráulica de la marca Carver modelo 4350

Sustancias Químicas:

- Agar Bioxon®, Becton Dickinson. México SA de CV, Querétaro, México
- Alginato de Sodio (Fluka)
- Azitromicina dihidrato Laboratorios Antvol Chemicals de México S.A. de C.V
- Carbopol 71 G, Noveon GAJ085
- Estereato de Magnesio
- Hidroxipropilmetilcelulosa K100 LV (Hipromelosa, Methocel), Demacol 2208 HK 100 M (DEMACSA)
- Maltosa de Compresión Directa, Ashland

Microorganismo de prueba para el bioensayo que determina la concentración sérica y tisular de la azitromicina en los animales tratados:

- *Staphylococcus aureus*, cepa ATCC.

Programas computacionales utilizados para determinar la farmacocinética:

- PK Analyst, for Windows 3.0 Micromath Scientific Software, Salt Lake City, UT, USA

Material biológico:

- 35 Cobayos

Procedentes del Departamento de Constatación Química y Biológica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México de distinto sexo, clínicamente sanos, con un peso promedio de 521 g y 3 meses de edad, alimentados con Guinea Pig® (Purina México, México), agua potable *ad libitum*, sin medicación previa al menos 30 días antes de la prueba. Bajo las condiciones y manejo establecido por el Subcomite Institucional de Investigación, cuidado y uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la Universidad Nacional Autónoma de México, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (NOM-062-ZOO-1999).

Metodología:

Se analizó la información publicada referente al diseño y elaboración de formulados de Azitromicina de liberación modificada, se encontró que existen diversos intentos para uso local especialmente de aplicación oftálmica y sistémica por vía oral; así como ensayos de la interrelación entre diferentes excipientes y su capacidad de liberación del principio activo; dentro de los cuales se encontraron diversas presentaciones, como: tabletas, supositorios, nanosuspensión, nanopartículas, microesferas, microemulsión, liposomas, cápsulas de gelatina, gel oral, sistemas flotantes, películas oftálmicas, aceites y suspensión, esta última es la única presentación aprobada por la FDA para uso humano de liberación prolongada.

El presente trabajo se basó en el estudio la liberación de Azitromicina incluida en dos matrices poliméricas diferentes; la primera formulada por la combinación de Hidroxipropilmetilcelulosa - Alginato de sodio (Sun et. al., 2014) y la segunda formada por la asociación de Hidroxipropilmetilcelulosa Carbopol (Mehra, 2011), realizando las modificaciones necesarias para la obtención de polvos compatibles con la manufactura de tabletas por compresión directa.

El presente trabajo consiste en el diseño de tabletas mediante el uso de la asociación de hidroxipropilmetilcelulosa-alginato de sodio y un segundo lote asociando hidroxipropilmetilcelulosa-carbopol; en ambos diseños se incluyó maltosa de compresión directa como diluyente y estereato de magnesio como lubricante, incluidos de acuerdo a los parámetros descritos por la literatura (Remington, 2012; Rowe et. al, 2009; Villafuerte, 2011), conforme a la propuesta que a continuación se describe:

Formulaciones propuestas

Nombre	Cualidades Generales	Criterio de Selección	Inclusión (%)
Hidroxpropilmetil celulosa (HPMC)	Bioadhesivo, mucoadhesivo Dispersante Modificador de la liberación (Liberación prolongada, modificada o sostenida) Incrementa la viscosidad (espesante)	Bioadhesivo mucoadhesivo Control de la liberación	MRF1 (45) MRF2 (45)
Polímero ácido acrílico (Carbopol)	Bioadhesivo Agente de liberación controlada Estabilizador de emulsiones Aglutinante de tabletas (0.75 a 3%) Regula la liberación (5 y 30%)	Bioadhesivo Regular la liberación del principio activo	MRF2 (4.33)
Alginato de sodio	Biocompatible, biodegradable Elevada capacidad para formar geles Incrementa la viscosidad en pH ácido	Elevada capacidad para formar geles Incrementa la viscosidad en pH ácido	MRF1 (2)
Estereato de Magnesio	Lubricante (0.25% y 5.0% p/p)	Impedir la adhesión de la tableta durante su manufactura	MRF1 (1.25) MRF2 (1.25)
Maltosa	Agente edulcorante Diluyente en tabletas	Diluyente edulcorante	MRF1 (27.75) MRF2 (25.42)

Inclusión y evaluación de Polvos:

Mezcla de polvos: Se llevó a cabo la mezcla física simple de las dos formulaciones propuestas de acuerdo al cuadro 2; en ambos casos el mismo porcentaje de principio activo, HPMC y Estereato de magnesio, la diferencia entre los formulados consistió en la inclusión de Carbopol o Alginato de sodio los cuales fueron incorporados de acuerdo a los parámetros establecidos en la literatura (Rowe et. al, 2009).

Cuadro 2.- Formulaciones de Azitromicina de liberación modificada propuestas

Compuesto	MRF1		Compuesto	MRF2	
	%	mg		%	mg
Azitromicina Dihidrato	25	125	Azitromicina Dihidrato	25	125
HPMC	45	225	HPMC	45	225
Alginato de Sodio	2	10	Carbopol	4.33	21.65
Maltosa	27.75	138.75	Maltosa	25.42	127.10
Estereato de magnesio	0.25	1.25	Estereato de magnesio	0.25	1.25
Total	100	500	Total	100	500

Se incorporó un volumen total de 15 g de las diferentes mezclas en recipientes de plástico secos y nuevos con tapa hermética, se homogeneizaron manualmente

mediante movimientos giratorios verticales a una velocidad aproximada de un giro por cada dos segundos en un lapso de 40 segundos en cada dirección.

Reología:

Una vez incorporados se sometieron a pruebas de evaluación reológica con el propósito de comprobar la viabilidad del procedimiento de compresión directa; mediante la determinación de:

- 1.- Densidad Aparente, Compactada y Verdadera
- 2.- Porcentaje de Porosidad
- 3.- Porcentaje de Compresibilidad
- 4.- Radio de Haussner
- 5.- Ángulo de Reposo
- 6.- Velocidad de Flujo
- 7.- Higroscopicidad (Balanza de Humedad)

1.- Densidad Aparente

Se determinó a partir del volumen ocupado por una muestra sin tomar en cuenta los espacios existentes entre partículas, permitiendo el libre acomodo de las partículas. Determinando la relación entre el volumen ocupado y el peso del polvo. (Liss, 2007; United States Pharmacopeia, 2007).

$$Densidad = \frac{Peso}{Volumen}$$

Densidad Compactada

Se determinó el volumen que ocupa la muestra posterior a la promoción de su compactación mediante la aplicación de una vibración que indujeron la reducción de los espacios libres existentes entre las partículas; sin la aplicación de una fuerza de compresión. (Kona, 2007).

Determinando la relación entre el volumen ocupado posterior a la aplicación de vibración de compactación y el peso del polvo (United States Pharmacopeia, 2007).

$$\text{Densidad Compactada} = \frac{\text{Peso}}{\text{Volumen Final}}$$

Se determinó la Densidad Compactada de las diferentes mezclas de forma manual en probetas de cristal de 20 mL mediante la aplicación de golpes sobre una mesa cubierta con un paño de franela a una velocidad aproximada de un golpe por cada dos segundos durante un lapso de 40 segundos.

Densidad Verdadera

Se obtuvo por el método del picnómetro al dividir la masa de la muestra en el volumen real ocupado; con el fin de asegurar que los espacios entre las partículas se eliminen por completo (Chowhan, 1995); dada la masa de una muestra de la mezcla de polvo (M_o): la masa del picnómetro lleno de agua destilada (P_o) y la masa del picnómetro con la muestra dentro y lleno de agua destilada (P_m), así como la densidad del agua destilada (ρ_{agua}) a la temperatura del ensayo, la densidad de la muestra de la mezcla de polvos (ρ_s) se obtiene a partir de la expresión:

$$\rho_s = (M_o * \rho_{agua}) / (P_o + M_o - P_m)$$

Para la realización de esta técnica se utilizó un líquido en donde la muestra fuera insoluble el cual se moja perfectamente el sólido de manera que ocupe todos los espacios disponibles (Amstrong y Palfrey, 1969). Para el presente estudio se utilizó agua.

Porcentaje de Porosidad

Es la cualidad que tienen los polvos de guardar espacios entre partículas debido a su ordenamiento, las diferencias de tamaño, forma e interacción electrostática, guardan una proporción de volumen de aire o vacío con respecto al volumen total.

El resultado se obtiene a partir de un cálculo de la relación entre la densidad aparente y la compactada. (Lieberman, 1989).

$$Porosidad = \left[\frac{Densidad\ Aparente}{Densidad\ Compactada} \right] 100$$

Porcentaje de Compresibilidad o Índice de Carr

Es un parámetro útil para inferir el flujo de polvos mediante la relación entre las densidades compactada y aparente. (Lieberman, 1989). Cuya interpretación de los resultados se describe en el cuadro 3.

$$Porcentaje\ de\ compresibilidad = \left[\frac{Densidad\ Compactada - Densidad\ Aparente}{Densidad\ Compactada} \right] 100$$

Cuadro 3.- Relación de Propiedades de Flujo con respecto al porcentaje de compresibilidad (Índice de Carr).

Compresibilidad (%)	Propiedades de Flujo
0-10	Excelentes
11-15	Buenas
16-20	Correctas
21-25	Aceptable
26-31	Pobres
32-37	Muy Pobres
>38	Extremadamente malas

Radio de Hausner

Se determina mediante la relación entre Densidad aparente y la compactada permitiendo obtener una relación empírica con el flujo (Lieberman, 1989). resultados que son descritos en el cuadro 4.

$$Radio\ de\ Hausner = \frac{Densidad\ Compactada}{Densidad\ Aparente}$$

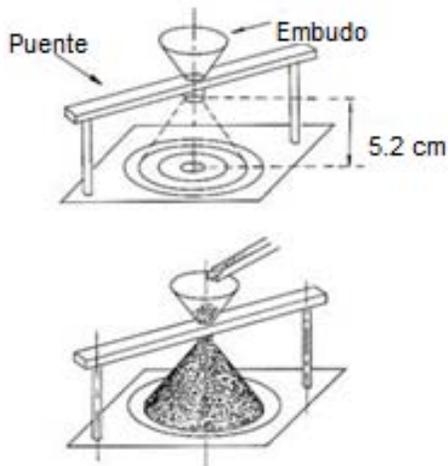
Cuadro 4.- Relación de Propiedades de Flujo con respecto al Índice de Hausner

Índice de Hausner	Propiedades de Flujo
Excelentes	1.00-1.11
Buenas	1.12-1.18
Correctas	1.19-1.25
Aceptables	1.26-1.34
Pobres	1.35-1.45
Muy Pobres	1.46-1.59
Extremadamente malas	>1.6

Ángulo de Reposo

Permite inferir la relación entre la fricción y cohesión de las partículas que integran un polvo; en el entendido que hay una relación directamente proporcional entre la fuerza de cohesión y el ángulo de reposo, obtenido a partir del acomodo del polvo en forma de cono al dejarlo caer con la fuerza otorgada por la gravedad desde un embudo a una altura definida sobre una superficie plana (Figura 7/Cuadro 5).

Figura 5.- Angulo de Reposo



Medidas que se deben obtener para determinar el ángulo. Abajo se observa que se debe tener una base marcada que permita medir el diámetro del montículo de polvo (imagen tomada de Wells 1988).

El ángulo formado entre el plano horizontal de la superficie en donde cae el polvo y la arista del cono formado se le denomina “Ángulo de Reposo”, obtenido a partir de los valores de la altura (h) y radio (r). Habitualmente varía entre 25 y 45 grados,

los valores mayores a este intervalo indican un mal flujo del polvo. (Lieberman, 1989), conforme a lo estipulado en la cuadro 5.

$$\text{Angulo de Reposo} = \text{Tan}^{-1} \left[\frac{\text{Altura}}{\text{Radio}} \right]$$

Cuadro 5.- Relación de Características de Flujo con respecto al Ángulo de Reposo.

Ángulo de Reposo	Características de Flujo
<25	Excelentes
26 - 30	Buenas
31 - 40	Regular
>40	Pobre

Humedad

El contenido de agua depende de las características químicas de las partículas que componen un polvo, se retiene humedad básicamente por dos mecanismos uno asociado a las fuerzas de Van der Waals y el segundo al equilibrio de vapor de agua y la superficie ofrecida por cada uno de los componentes del polvo por lo que su contenido impactará directamente en sus cualidades (Patil, 2011).

La humedad presente en un polvo afecta directamente sus cualidades de flujo mediante la formación de aglomerados o la tendencia a adherirse a las paredes en donde fluye; por lo que es de suma importancia conocer la proporción de humedad existente en un polvo. Este parámetro se determinó mediante el sometimiento de un proceso de deshidratación de las muestras de polvo expuesto a calor constante en una balanza térmica hasta que se estabilizó el peso, estableciendo la relación entre el peso inicial y final de la muestra, expresado en porcentaje. Cuyo valor ideal para comprimidos es 3% o menor de humedad contenida (Lieberman, 1989), de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Higroscopicidad} = \left[\frac{\text{Peso Saturado} - \text{Peso seco}}{\text{Peso seco}} \right] 100$$

Formulación

Se llevó a cabo la formulación de dos diferentes mezclas de azitromicina incluidas en una matriz diseñadas a base del 45% de Hidroxipropilmetilcelulosa y 0.25% Estereato de Magnesio; en el caso de la formula MRF1 se incorporó 2% de Alginato de sodio como agente viscosante y la identificada como MRF2 se añadió 4.33% de Carbopol 71G como agente adhesivo; en ambos casos se aforo con maltosa de compresión directa con el fin de disponer del mismo volumen total en cada mezcla. (Cuadro 2)

Elaboración y caracterización de las tabletas

Se evaluaron las características de un lote de tabletas de cada formulación confeccionadas por el método de compresión directa a una presión de a 44,482 kN:

- 1.- Peso: Determinado a partir del uso de una balanza analítica y vidrio de reloj; expresado en miligramos (mg).
- 2.- Diámetro y Grosor: mediante el uso de un calibrador Vernier; expresado en milímetros (mm).
- 3.- Friabilidad: Definida como la capacidad de las tabletas para resistir golpes y abrasión sin que se fragmenten durante el proceso de manufactura, empaque o transporte, expresado en porcentaje; determinado mediante el sometimiento de movimiento rotacional a 25 revoluciones por minuto (rpm) durante 100 giros de un lote de 10 tabletas a las cuales previamente se les retiro el polvo adherido mediante la exposición a aire comprimido y la obtención de su peso, posteriormente se repitió el pesaje para establecer la relación entre el peso inicial y final de la muestra, expresado en porcentaje, de acuerdo a la siguiente formula: (Gibson, M., 2016; Lieberman, 1989).

$$Friabilidad = \left[\frac{Peso\ Inicial - Peso\ final}{Peso\ final} \right] 100$$

Se consideró como un valor aceptable la pérdida del 1% o menos del peso original.

4.- Resistencia a la Ruptura: Se determinó la fuerza necesaria para producir la ruptura de tabletas de cada mezcla, mediante un durómetro, obteniendo el resultado en Newtons (Gibson, M., 2016).

Determinación de la concentración de dihidrato de azitromicina del ensayo *In vitro*.

Se preparó una curva de calibración de seis puntos a partir de una solución estándar de dihidrato de Azitromicina sin excipientes a una concentración de 1500 µg/mL realizando las diluciones correspondientes para preparar el resto de los sistemas de la curva de acuerdo a la siguiente cuadro.6

Cuadro 6.- Diluciones para la determinación de la curva de calibración del ensayo *In vitro*

Sistema	Alicuota(mL)	Aforo (mL)	Concentración (µg/mL)
1	10.000	20	1500.000
2	5.000	20	750.000
3	2.500	20	375.000
4	1.250	20	187.500
5	0.625	20	93.750
6	0.312	20	46.870

Validación parcial del sistema

De acuerdo a la guía de validación de métodos analíticos del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos México: CNQFB se realizaron pruebas de validación del sistema mediante las pruebas de linealidad y exactitud del sistema, linealidad, precisión y selectividad del método.

1.- Linealidad

Se evaluó la relación lineal entre la concentración del principio activo y el valor de absorbancia obtenido en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 235 nm de cinco diluciones dentro del intervalo de 1500 a 46.8 µg/mL utilizando como

diluyente HCl 0.1 N, obteniendo mediante análisis de regresión lineal simple los valores de coeficiente de correlación, intercepto y pendiente (CNQFB).

2.- Exactitud de la curva de Linealidad

La exactitud del sistema se determinó mediante el cálculo de la desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV) de la lectura por triplicado de cinco diferentes diluciones comprendidas dentro del intervalo de concentración de azitromicina dihidrato del presente estudio(CNQFB).

3.- Linealidad del método

Se determinó mediante la obtención del coeficiente de correlación de cinco diluciones en tres ensayos diferentes; así como la obtención de los valores promedió y Coeficiente de variación (CV%) de las diferentes diluciones (CNQFB).

4.- Precisión

Para evaluar la precisión del sistema se realizaron tres diferentes diluciones (Concentración alta, media y baja) a partir de una solución estándar de azitromicina dihidrato 1500 µg/mL obteniendo las lecturas de absorbancia por quintuplicado mediante espectrofotometría a 235 nm de longitud de onda (CNQFB).

5.- Selectividad

Con el fin de determinar la presencia y concentración del dihidrato de azitromicina entre los compuestos incluidos en las formulaciones del presente trabajo se realizó la técnica de barrido por absorbancia en espectrofotometría UV visible (Arenas, 2004).

Perfiles de Liberación

Una vez que se tuvo el lote de tabletas de cada formulación se procedió a realizar la exposición a un medio con un volumen constante de 100 mL de pH ácido similar al espacio estomacal mediante una solución de Ácido Clorhídrico 0.1 N, Temperatura de 37 °C y 30 RPM; con el fin de determinar la liberación del

Principio Activo, tomando muestras de un mL en los tiempos 1, 3, 4, 6, 24, 27, 30, 45, 48 y 50 Horas de cada formulación incluyendo un producto comercial existente en el mercado.

Curva de Calibración

Se preparó una curva de calibración con 6 puntos a partir de una solución de Azitromicina dihidrato a una concentración de 1500 µg/mL sin excipientes (solución madre) realizando cinco diluciones adicionales hasta una concentración de 46.8 µg/mL; utilizando para ello una Incubadora-agitadora modelo SI-45 de la marca Biocotek (China), obteniendo muestras en los tiempos 1, 3, 4, 6, 24, 27, 30, 45, 48 y 50 horas y realizando la lectura de la concentración de principio activo en un Espectrofotómetro UV-vis. Modelo S2000 Ocean Optics Inc, (China).

Se determinaron de cada perfil los parámetros Área de bajo de la Curva (ABC); Porcentaje de eficiencia (ED), Tiempo medio de liberación (MDT) y Porcentaje de liberación por minuto; mediante las fórmulas que a continuación se presentan, de acuerdo a (Costa;2001):

$$ABC_0^t = \int_0^t Q(t)dt$$

Como aproximación integral por la aplicación de la formula, donde Q es la dosis contenida en la presentación farmacéutica, (t) es tiempo y (dt) diferencial de t.

El porcentaje de eficiencia (EF(%)) se obtuvo mediante la fórmula:

$$EF(\%) = \frac{ABC_0^t \times 100}{Q \infty t}$$

Valor determinado por el resultado del área bajo la curva obtenida en el tiempo del ensayo multiplicada por cien y dividida entre la dosis contenida en la presentación farmacéutica multiplicada por el tiempo del ensayo.

Y tiempo medio de liberación obtenido por la fórmula:

$$MDT = \frac{\sum_i t_i \Delta Q(t_i)}{Q_\infty}$$

Es el resultado de la suma de las fracciones liberadas en cada tiempo dividida entre el total de Principio Activo liberado.

Valores de su comparación obtenidos mediante la aplicación de las formulas siguientes formulas:

$$f_1 = 100 \frac{\sum_i |Q_{cp}(t_i) - Q_{mrf}(t_i)|}{\sum_i |Q_{cp}(t_i)|} \quad \text{y} \quad f_2 = \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{i=1}^{N^*} (Q_{cp}(t_i) - Q_{mrf}(t_i))^2}{N^*}}}$$

En el presente trabajo el factor de diferencia (f1) y de similitud (f2) son empleados con el fin de demostrar la diferencia de cada uno de los productos usados respecto a su forma de liberación y no con el propósito de validar su bioequivalencia entre sí (Costa;2001); complementando el análisis con la determinación de la concentración del Principio activo en tejido pulmonar y suero después de su administración oral en *Cavia Porcellus*.

Estudio In Vivo

Este estudio se aprobó por el Subcomite Institucional de Investigación, cuidado y uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la Universidad Nacional Autónoma de México, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (NOM-062-ZOO-1999); los animales fueron provistos por la Unidad de Constatación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, se realizó el estudio *In vivo*; usando un lote de 35 animales adultos, con un peso promedio de 500 g; distribuidos en tres grupos; dos secciones de 14 animales cada uno; correspondientes a las formulaciones MRF1 y MRF2, el tercero conformado de 7 animales a los que se les administró el Producto Comercial en la dosis proporcional.

Administración de las formulaciones de Azitromicina Dihidrato

A los grupos MRF1 y MRF2 se les administró una dosis única equivalente de 8 mg/Kg mediante la elaboración previa de tabletas de 120 mg de las formulaciones

propuestas; al grupo control se le administró la fracción proporcional de tableta de presentación comercial con un contenido de 125 mg cbp una tableta.

Posterior a la administración oral de una fracción de tableta equivalente a 8 mg/Kg de peso de las diferentes formulaciones se recogieron muestras de sangre de un cobayo por tiempo del grupo control (grupo 1) y de dos animales por tiempo para los grupos 1 (MRF1) y 2 (MRF2) mediante punción cardíaca directa, los animales se encontraban bajo anestesia profunda con pentobarbital sódico, después de la toma de sangre se administró una sobredosis de barbitúrico para inducir la eutanasia. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 RPM durante 15 minutos, retirando el suero y colocándolo en tubos Eppendorf; conservándolos a 2 °C de temperatura hasta su análisis. Se determinaron las concentraciones del principio activo mediante análisis de difusión de agar modificado en suero en los tiempos 1, 3, 4, 6, 24, 27, 30, 45, 48 y 50 horas; así como de las muestras de tejido pulmonar en los tiempos 0, 4, 6, 24, 48, 72, 96 horas.

La determinación del principio activo se realizó mediante bioensayo de difusión en placa de agar (Prat, S., 2006; Bennett, et. al., 1966) y los valores de los halos fueron usados para determinar las concentraciones séricas y de tejido pulmonar mediante el Software ORIGIN PRO 8.6® (OriginLab Corporation, Massachusetts, United States) con esos valores se obtuvieron las variables farmacocinéticas.

Determinación de la concentración de dihidrato de azitromicina del ensayo *In vivo*.

Se determinó la concentración- actividad en muestras séricas y de pulmón de cobayo mediante la prueba de difusión en placa de agar utilizando como microorganismo de prueba *Staphilococcus spp* (Prat, S., 2006), esta prueba de bioensayo, consiste en la formación de halos de inhibición del crecimiento bacteriano cuya dimensión está en función de la concentración del principio activo, se preparó una curva de calibración de seis puntos a partir de una solución estándar sin excipientes a una concentración de 20 µg/mL se realizaron las

diluciones correspondientes para preparar el resto de los sistemas de la curva de acuerdo a los resultados que se muestran en el siguiente cuadro 7

Cuadro 7.- Diluciones para la determinación de la curva de calibración del ensayo *In vivo*.

Dilución µg/mL	Halo de inhibición (mm)		Promedio (mm)	SD
	1	2		
20	32.18	31.91	32.18	0
10	30.96	29.52	30.24	0.72
5	28.26	27,97	28.11	0.14
2.5	25.44	24.25	24.84	0.59
1.25	21.65	21.79	21.72	0.07
0.625	16.40	16.08	16.24	0.16

Validación del sistema del ensayo *In vivo*:

1.- Linealidad

Se evaluó la relación lineal entre la concentración del principio activo y el halo de inhibición (Inhibición del crecimiento bacteriano) dentro del intervalo de 20 a 0.625 µg/mL de cinco diluciones diferentes utilizando como diluyente agua bidestilada estéril, obteniendo mediante análisis de regresión lineal los valores de coeficiente de correlación, intercepto y pendiente.

2.- Exactitud de la curva de Linealidad

La exactitud del halo de inhibición se determinó mediante el cálculo de promedio, desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV) de la lectura por duplicado de cinco diferentes diluciones comprendidas dentro del intervalo de concentración de azitromicina dihidrato del presente ensayo.

3.- Linealidad del método

Se determinó mediante la obtención del coeficiente de correlación de cinco diluciones en dos ensayos diferentes; así como la obtención de los valores promedió y coeficiente de variación (CV%) de las diferentes diluciones.

Análisis Farmacocinético

Para la administración oral, las curvas obtenidas mostraron la disminución de las concentraciones del fármaco en suero y tejido pulmonar en función del tiempo y se aproximaron a un comportamiento con entrada de primer orden y salida de primer orden con la siguiente ecuación (Jambhekar, 2009):

$$C(t) = \frac{[(Dosis * K_{ab})]}{(volumenK_{ab} - K_{el})} * [(e^{-K_{el}*tiempo}) - (e^{-K_{ab}*tiempo})]$$

Se evaluó la concentración relativa al tiempo $C(t)$, la constante de absorción (K_{ab}), la velocidad constante de eliminación (K_{el}) y t , que se refiere al tiempo transcurrido desde la administración del fármaco. A partir de las curvas de concentración de tiempo, se calculó la semivida de eliminación ($t_{1/2}$), la concentración plasmática máxima (C_{max}), el área bajo la curva (AUC), el área bajo la curva concentración-tiempo calculada por el método trapezoidal (AUC_t), el área bajo el primer momento de la curva concentración-tiempo (AUMC) y el tiempo de retención (RT). El tiempo máximo de concentración plasmática (t_{max}) se determinó inspeccionando la concentración en el tejido pulmonar macerado y determinando los perfiles tiempo-concentración de azitromicina. La determinación matemática del volumen aparente de distribución en estado estacionario se realizó usando la siguiente ecuación (Jambhekar, 2009):

$$V_{dss} = (Dosis \times AUMC) / AUC^2$$

La semivida se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$T \frac{1}{2} = 0.693 / k_{el}$$

El aclaramiento total (Cl_b) se determinó por

$$Cl_b = Dosis / AUC$$

La $AUC_{0-\infty}$ se calculó de la siguiente manera:

$$AUC_{0-\infty} = AUC + (C_{last} / K_{el})$$

La biodisponibilidad relativa (F_{rel}) se calculó con la ecuación

$$F_{rel} = (AUC_{ERF}/AUC_{PC}) \times 100$$

F_{rel} se expresó como el porcentaje del AUC del grupo experimental en relación con el grupo de control.

Toxicidad aguda

Se remitieron al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM muestras hematológicas de los tiempos 0, 1, 30 h; con el fin de complementar el estudio toxicológico agudo mediante la determinación de parámetros hematológicos.

Resultados

Pruebas Reológicas

En la cuadro 8 se observan los resultados de los valores de las diferentes características reológicas de los polvos para la fabricación de tabletas de dihidrato de azitromicina, HPMC, Alginato de Na, maltosa y estereato de Mg (MRF1) o dihidrato de azitromicina, Hidroxipropilmetilcelulosa, carbopol 71G, maltosa, estereato de Mg (MRF2).

Cuadro 8.-Características reológicas de las mezclas de polvos

Propiedad Reológica	MRF1 ± SD	MRF2 ± SD
Densidad Aparente (g /cm ³)	0,531 ± 0.001	0.520 ± 0.006
Densidad Compactada (g /cm ³)	0.694 ± 0.001	0.694 ± 0,066
Densidad Verdadera (g /mL)	0.589 ± 0,012	0.474 ± 0,012
Índice de Carr (Porcentaje de compresibilidad)* (%)	23.480 ± 0.6	25.067 ± 0.87
Radio de Hausner **	1.305 ± 0.06	1.334 ± 0.06
Porosidad (%)	1.307 ± 0.6	1.334 ± 0.06
Angulo de Reposo (°)	17.631 ± 0.17	9.597 ± 0.17
Humedad (%)	3.313 ± 0.25	3.318 ± 0.25

* Índice Carr: (Densidad Comprimida - Densidad Aparente / Densidad Comprimida) * 100.

** Radio Hausner: (Densidad compacta-Densidad Aparente.

SD.- Desviación Estándar

Tableta por Compresión Directa

En la cuadro 9 se muestran la características de los comprimidos fabricados por compresión directa a una presión de 44.482 kN, de las formulaciones de liberación modificada propuestas (MRF1 o MRF2).

Cuadro 9.- Características de las tabletas obtenidas por compresión directa

Características de las Tabletetas	MRF1 ± SD	MRF2 ± SD
Peso (mg)	501.478 ± 001	501.4633 ± 0.001
Diámetro (mm)	12.987 ± 0.008	12.975 ± 0.0023
Grosor (mm)	3.013 ± 0.0032	3.078 ± 0.004
Friabilidad (%)	1.000 ± 0.005	0.599 ± 0,003
Resistencia a la Ruptura (Newtons)	132.058 ± 0.049	183.059 ± 0.039

SD.- Desviación Estándar

Validación del ensayo *In vitro*

1.- Linealidad

En la cuadro 11 se muestra la relación lineal entre la concentración del principio activo y el valor de absorbancia obtenidas mediante espectrofotometría UV a una longitud de onda de 235 nm de seis diluciones dentro del intervalo de 1500 a 46.8 µg/mL; mediante los valores de coeficiente de correlación, intercepto y pendiente.

Cuadro 10.- Linealidad del sistema

Dilución (µg/mL)	Absorbancia(235 nm)			Promedio (µg/mL)
	1	2	3	
1500	1.066	1.070	1.042	1.059
750	0.545	0.543	0.528	0.539
375	0.266	0.271	0.262	0.266
187.5	0.132	0.133	0.137	0.134
93.7	0.066	0.067	0.065	0.066
46.94	0.031	0.031	0.032	0.032
Intercepto	0.0007	0.0007	0.0007	
Pendiente	0.0004	0.0022	0.0007	
C. de Correlación	99.92	99.94	99.84	

2.- Precisión del sistema

En la cuadro 11 se muestra desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV) de la lectura por triplicado de seis diferentes diluciones del presente estudio.

Cuadro 11.- Exactitud de la curva de linealidad

Dilución (µg/mL)	Absorbancia(235 nm)			Promedio	SD	CV(%)
	1	2	3			
1500	1.066	1.070	1.042	1.059	0.015	1
750	0.545	0.543	0.528	0.539	0.009	2
375	0.266	0.271	0.262	0.266	0.005	2
187.5	0.132	0.133	0.137	0.134	0.003	2
93.7	0.066	0.067	0.065	0.066	0.001	2
46.94	0.031	0.031	0.032	0.032	0.001	2

CV (%): Coeficiente de variación, SD: Desviación Estándar

3.- Linealidad del método

En la cuadro 12 se presenta el coeficiente de correlación de seis diluciones de tres ensayos diferentes; así como valores promedió y coeficiente de variación (CV%) de las diferentes diluciones:

Cuadro 12.- Linealidad del método

Dilución ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia(235 nm)			Promedio	CV(%)
	1	2	3		
1500	1.066	1.070	1.042	1.059	1
750	0.545	0.543	0.528	0.539	2
375	0.266	0.271	0.262	0.266	2
187.5	0.132	0.133	0.137	0.134	2
93.7	0.066	0.067	0.065	0.066	2
46.94	0.031	0.031	0.032	0.032	2
C. de Correlación	99.92	99.94	99.84		

CV (%): Coeficiente de variación, SD: Desviación Estándar

Precisión

En la cuadro 13 se muestran las lecturas de absorbancia por quintuplicado de tres diferentes diluciones (1500, 750 y 187.5 $\mu\text{g/mL}$) mediante espectrofotometría a 235 nm de longitud de onda.

Cuadro 13.- Precisión del ensayo *In vitro*.-

Repetición	Dilución $\mu\text{g/mL}$		
	1600	800	300
1	1.066	0.543	0.205
2	1.070	0.567	0.197
3	1.042	0.544	0.198
4	1.068	0.540	0.202
5	1.050	0.539	0.206
Promedio	1.059	0.547	0.201
SD	0.013	0.012	0.004
CV	1	2	2

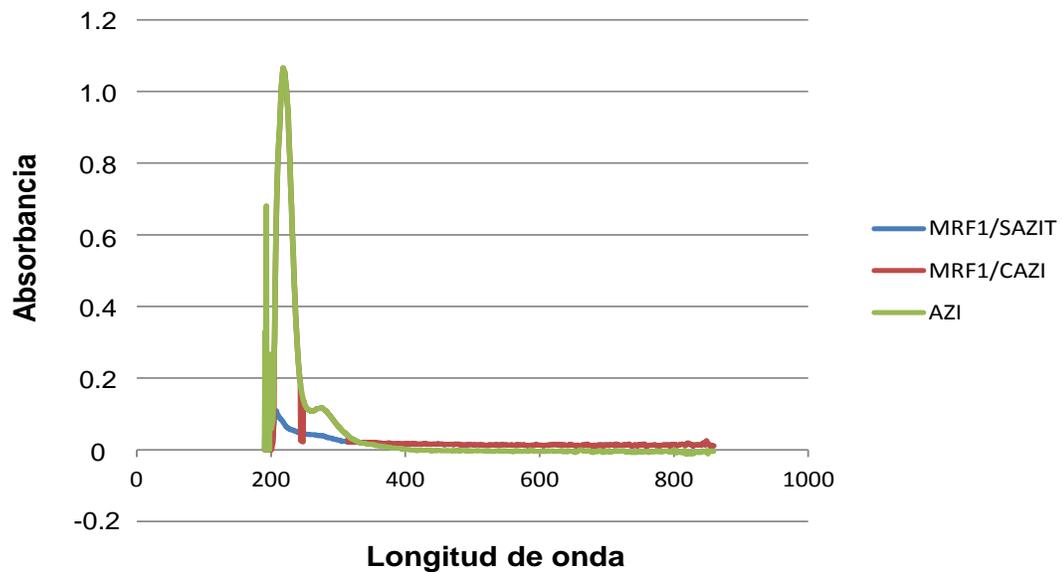
Valores de Absorbancia obtenidos a 235 nm.

CV (%): Coeficiente de variación, SD: Desviación Estándar

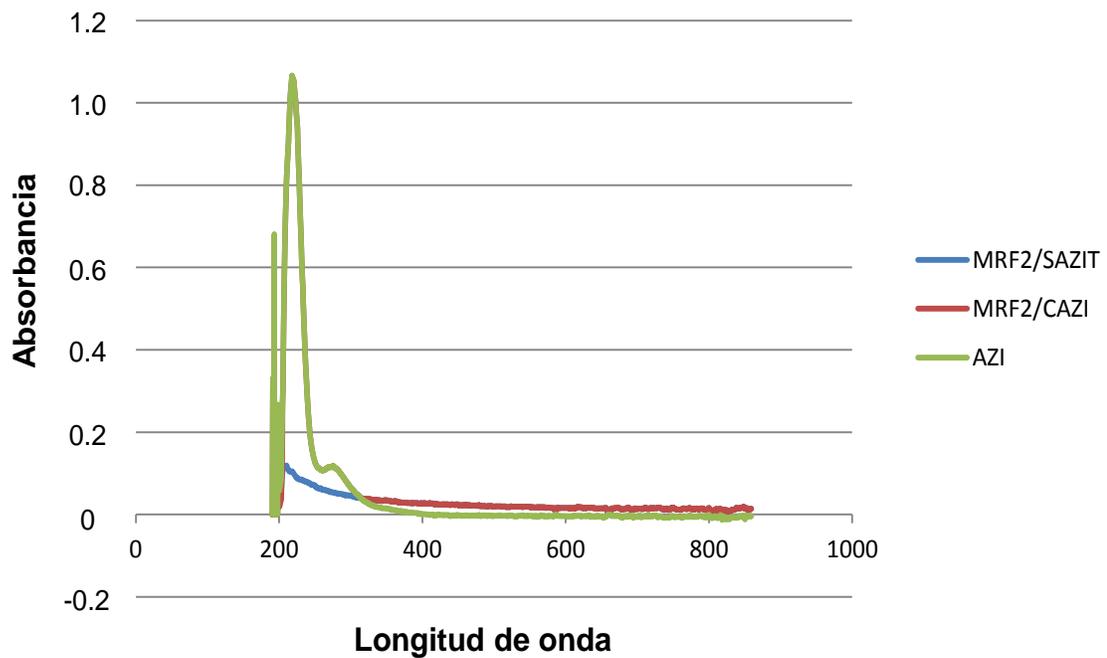
Selectividad

En la figura 8 se muestran las gráficas resultado de la técnica de barrido en Espectrofotometría UV-vis para los formulados propuestos.

Figura 6.- Espectro UV-vis



MRF1/SAZIT: Formulado 1 sin dihidrato de azitromicina; MRF1/SAZIT: Formulado 1 con dihidrato de azitromicina; dihidrato de azitromicina sin excipientes.



MRF2/SAZIT: Formulado 1 sin dihidrato de azitromicina; MRF2/SAZIT: Formulado 1 con dihidrato de azitromicina; dihidrato de azitromicina sin excipientes.

Cuadro 14.- Criterios de aceptación para las pruebas de validación de acuerdo a la CNQFB

Prueba	Descripción	Resultado
Linealidad	Curva de calibración de seis puntos de concentración. Análisis por triplicado	Coefficiente de Correlación (r) mayor o igual 0.98
Precisión del sistema	Análisis de muestra equivalente al 100%	CV(%) ≤ 2
Linealidad del método	Análisis por triplicado de seis diluciones diferentes	Coefficiente de Correlación (r) mayor o igual 0.98 CV(%) ≤ 2
Precisión	Análisis por quintuplicado de tres diferentes diluciones (1500, 750 y 187.5 µg/mL)	CV(%) ≤ 2
Selectividad	No deben existir interferencias en el tiempo de retención del compuesto a cuantificar.	Cumple

Prueba de Liberación *In Vitro*

Una vez que se tuvo el lote de tabletas de cada formulación se procedió a realizar la exposición a un medio con un volumen constante de 100 mL de pH ácido similar al espacio estomacal mediante una solución de ácido clorhídrico 0.1 N, Temperatura de 37 °C y 30 RPM; con el fin de determinar la liberación del Principio Activo, tomando muestras de un mL en los tiempos 1, 3, 4, 6, 24, 27, 30, 45, 48 y 50 horas de cada formulación incluyendo un producto comercial existente en el mercado.

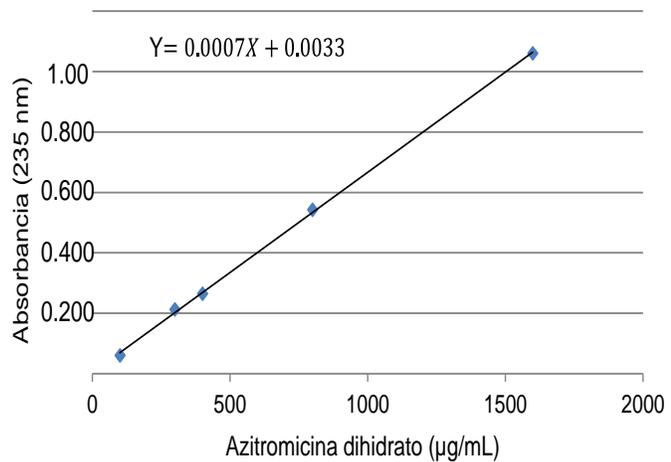
Curva de Calibración

Se preparó una curva de calibración con 5 puntos a partir de una solución de una concentración de 1,600 µg/mL sin excipientes (solución madre) realizando cinco diluciones adicionales hasta una concentración de 200 µg/mL; las absorbancias se compararon obteniendo un coeficiente de correlación 99.9, coeficiente de determinación (r^2) >99.93 un valor global de la pendiente 0.003, conforme a lo que se observa en la Figura 9:

Datos experimentales y ajuste lineal

Figura 7.-Curva de Calibración

Dilución (µg/mL)	Absorbancia (235 nm)
1600	1.137
800	0.542
400	0.264
300	0.212
100	0.060



Las muestras obtenidas durante el ensayo de disolución se utilizaron para a realizar la lectura de la concentración del principio activo mediante la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 235 nm (Nyola, 2012, Bekele, 2012).

Resultados de la disolución *In vitro*

Comparación de los perfiles de disolución *In vitro*

Ninguna de las formulaciones presentó tiempo de flotación; como se observa en la imagen 1, la Presentación Comercial se desintegró en un lapso de 30 minutos; manteniendo la presencia de sólidos visibles en el fondo del recipiente durante todo el ensayo; las presentaciones de liberación modificada (MRF1, MRF2) no mostraron desintegración visible durante la totalidad del ensayo.

Imagen 1.- Modificación de las tabletas durante las 50 horas del ensayo

Tiempo			
4			
24			
50			

Adhesividad

No se realizaron estudios específicos de capacidad adhesiva de los productos; sin embargo; los formulados propuestos mostraron un comportamiento semejante a lo reportado por la literatura; conservando imágenes (Imagen 2) que dan testimonio de la capacidad adhesiva de los formulados propuestos.

Imagen 2.- Adhesividad

MRF 1

MRF2

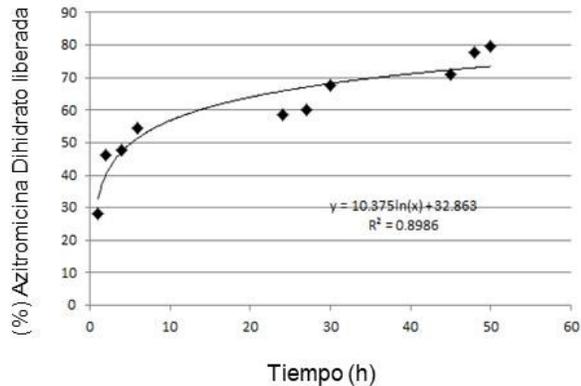


Producto Comercial (CP)

En la figura 10 se observa la gráfica del perfil de liberación de un producto comercial de liberación inmediata con una concentración de 120 mg del Principio Activo.

Figura 8.- Perfil de Disolución CP

Tiempo	Porcentaje	Principio Activo Liberado $\mu\text{g/mL}$
1	28.351	340.230
2	46.010	552.190
4	47.828	573.877
6	54.617	655.387
24	58.700	704.273
27	60.053	720.679
30	67.754	813.002
45	70.917	851.095
48	77.718	932.588
50	79.528	954.277



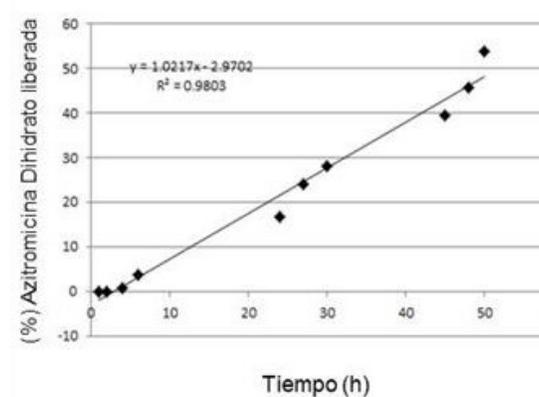
Concentración determinada mediante la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 235 nm (Nyola, 2012, Bekele, 2012).

Formulado MRF1

En la figura 11 se observa la gráfica del perfil de liberación del formulado MRF1 (HPMC-Alginato de Sodio).

Figura 9.- Perfil de Disolución de HPMC- Alginato de Sodio

Tiempo	Porcentaje	Principio Activo Liberado $\mu\text{g/mL}$
1	0	0
2	0	0
4	0.698	8.699
6	3.739	46.682
24	16.770	209.792
27	24.079	301.092
30	28.077	351.097
45	39.495	493.774
48	45.785	571.587
50	53.788	672.386



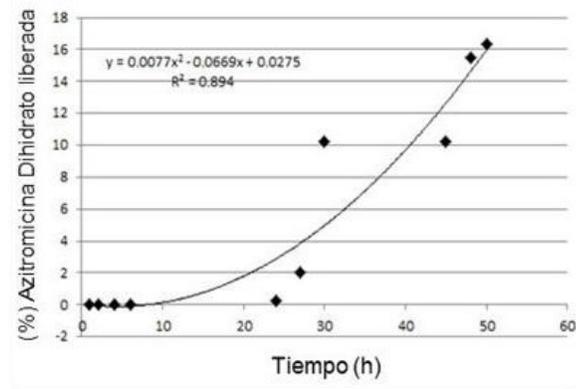
Concentración determinada mediante la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 235 nm (Nyola, 2012, Bekele, 2012).

Formulado MRF 2

En la figura 12 se observa la gráfica del perfil de liberación del formulado MRF2 (HPMC-Carbopol).

Figura 10.- Perfil de Disolución Hidroxipropilmetilcelulosa-Carbopol

Tiempo	Porcentaje	Principio Activo Liberado $\mu\text{g/mL}$
1	0	0
2	0	0
4	0	0
6	0	0
24	0.256	3.278
27	2.003	25.005
30	10.256	128.266
45	10.258	128.278
48	15.478	193.493
50	16.348	204.248



Concentración determinada mediante absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 235 nm (Nyola, 2012, Bekele, 2012).

Comparación de Perfiles

La cuadro 15 muestra la liberación en porcentaje y mg/100 mL del CP y los formulados propuestos (MRF1 y MRF2), cuyos valores se utilizaron para determinar los parámetros farmacocinéticos área de bajo de la curva, porcentaje de eficiencia, tiempo medio de liberación, factor de diferencia y similitud con respecto al producto comercial mostrado en la cuadro 16.

Cuadro 15.- Liberación del fármaco *In vitro* para las diferentes formulaciones analizadas (CP, MRF1, MRF2)

Tiempo	Producto Comercial		MRF 1		MRF 2	
	% CP	PA Liberado (mg/100 mL)	% CP	PA Liberado (mg/100 mL)	% CP	PA Liberado (mg/100 mL)
1	28.351	340.230	0	0	0	0
2	46.010	552.190	0	0	0	0
4	47.828	573.877	0.698	8.699	0	0
6	54.617	655.387	3.739	46.682	0	0
24	58.700	704.273	16.770	209.792	0.256	3.278
27	60.053	720.679	24.079	301,092	2.003	25.005
30	67.754	813.002	28.077	351.097	10.256	128,266
45	70.917	851.095	39.495	493,774	10.258	128.278
48	77.718	932.588	45,785	571,587	15.478	193.493
50	79.528	954.277	53.788	672,386	16.348	204.248

Cuadro 16.- Comparación de algunos parámetros de CP vs MRF 1

Parámetro	CP	MRF1	MRF2
ABC	3669.127	1329,675	310.598
% Eficiencia	76.888	39,547	4.970
Tiempo medio	13.029	34.709	36.394
Factor de diferencia (f1)		62.578	90.378
Factor de similitud (f2)		15.756	10.118

Validación parcial del ensayo *In vivo*

1.- Linealidad:

En la cuadro 17 se muestra la relación lineal entre la concentración del principio activo y el halo de inhibición (Inhibición del crecimiento bacteriano) dentro del intervalo de 20 a 0.625 µg/mL de cinco diluciones; los valores de coeficiente de correlación, intercepto y pendiente

Cuadro 17.- Linealidad del sistema

Dilución µg/mL	Halo de inhibición (mm)		Promedio	SD
	1	2		
20	32.180	31.910	32.045	0.135
10	30.960	29.520	30.240	0.720
5	28.260	27.970	27.970	0.145
2.5	25.440	24.250	24.845	0.595
1.25	21.650	21.790	21.720	0.070
Intercepto	21.526	21.165		
Pendiente	3.835	3.680		
Coeficiente de Correlación	98.91	98.500		

SD: Desviación Estándar

2.- Exactitud:

Se determinó mediante el cálculo de promedio, desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV) de la lectura por duplicado de cinco diferentes diluciones conforme a la cuadro 18:

Cuadro 18.- Exactitud del sistema

Dilución µg/mL	Halo de inhibición (mm)		Promedio	CV (%)	SD
	1	2			
20	32.180	31.910	32.045	1	0.421
10	30.960	29.520	30.240	2	2.381
5	28.260	27.970	27.970	1	0.518
2.5	25.440	24.250	24.845	2	2.395
1.25	21.650	21.790	21.720	1	0.322

SD: Desviación Estándar

3.- Linealidad del método.-

Se determinó mediante la obtención del coeficiente de correlación, valores promedió y coeficiente de variación (CV%) de cinco diluciones en dos ensayos diferentes, conforme a la cuadro 19.

Cuadro 19.-Linealidad del método

Dilución µg/mL	Halo de inhibición (mm)		Promedio	CV (%)
	1	2		
20	32.180	31.910	32.045	1
10	30.960	29.520	30.240	2
5	28.260	27.970	27.970	1
2.5	25.440	24.250	24.845	2
1.25	21.650	21.790	21.720	1
Coeficiente de Correlación	98.91	98.500		

CV (%): Coeficiente de variación

Ensayo *In vivo*

A continuación se exponen los valores de concentración y desviación estándar (SD) encontrados en suero (Cuadro 20) y tejido pulmonar (Cuadro 21) de cobayos después de la administración de una dosis oral única de una fracción de comprimido equivalente a 8 mg/Kg de las diferentes formulaciones.

Cuadro 20.- Concentraciones de azitromicina en suero de cobayos

Tiempo (h)	Presentación Comercia (µg/mL ± SD)	MRF1 (µg/mL ± SD)	MRF2 (µg/mL ± SD)
1	1.103±0.034	0.962±0.049	1.078±0.037
4	0.795±0.021	0.498±0.050	0.598±0.018
6	0.610±0.020	0.390±0.036	0.490±0.038
24	0.330±0.019	0.990±0.005	0.448±0.009
48	0.200±0.010	0.090±0.005	0.120±0.011

Media ± SD (Desviación Estándar)

Cuadro 21.- Concentraciones de azitromicina en tejido pulmonar de cobayos.

Tiempo (h)	Presentación Comercia (µg/mL ± SD)	MRF1 (µg/mL ± SD)	MRF2 (µg/mL ± SD)
1	10.698±0.034	13.689±0.138	16.957±1.199
4	18.042±0.021	7.990±0.287	21.048±0.001
6	20.927±0.020	22.880±0.709	16.198±0.497
24	10.436±0.019	13.698±1.019	13.709±0.397
48	5.207±0.010	15.090±0.958	10.499±0.788
72	2.147±0.309	8.197±0.130	6.809±0.478
96	0.818±0.200	6.100±0.819	4.968±1.029

Media ± SD (Desviación Estándar)

Cuyos valores fueron utilizados para le determinación de diferentes parámetros farmacocinéticos de cada presentación (Cuadro 22); así como la gráfica de las concentraciones a través del tiempo del principio activo en suero y pulmón (Figura 13).

Cuadro 22.- Criterios de aceptación para las pruebas de validación de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1988

Prueba	Criterio de aceptación	In vivo
Linealidad	Coeficiente de Correlación (r) mayor o igual 0.98	Cumple
Exactitud de la curva de linealidad	Cada punto de la curva CV(%) y DEA(%) menor o igual a 15% Excepto para el valor más bajo puede ser hasta del 20%	Cumple
Exactitud	Valor promedio de las desviaciones absolutas de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad debe estar dentro de ±15% del valor nominal de la concentración.	Cumple
Selectividad	No deben existir interferencias en el tiempo de retención del compuesto a cuantificar.	No aplica

Cuadro 23.- Valores farmacocinéticos en suero y tejido pulmonar

Suero

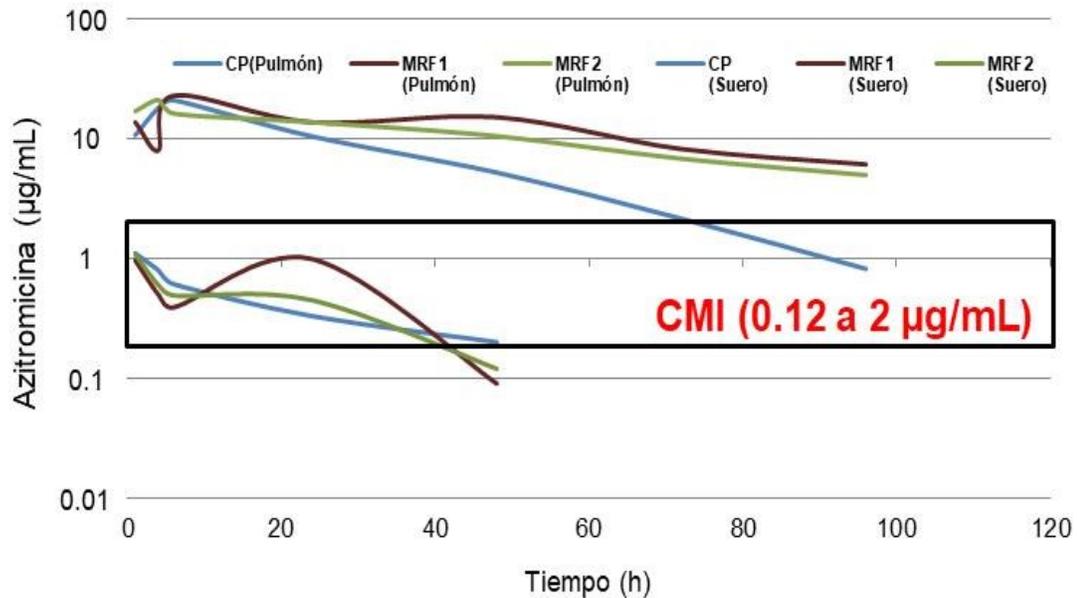
Parámetro	Presentación Comercial	MRF 1±SD	MRF2±SD
$t_{1/2_{elim}}$ (h)	12.439 ± 4.090 ^a	3.899 ± 0.270 ^b	13.183 ± 3.390 ^a
$t_{1/2_{ab}}$ (h)	1.2388 ± 0.110 ^a	1.186 ± 0.180 ^a	2.808 ± 0.109 ^c
t_{max} (h)	1.358 ± 0.169 ^a	7.152 ± 0.949 ^b	4.630 ± 0.308 ^c
C_{max} (µg / mL)	1.046 ± 0.187 ^a	1.121 ± 0.497 ^a	0.918 ± 0.120 ^a
AUC (µg*h/mL)	18.788 ± 3.29 ^a	6.308 ± 0.878 ^b	17.469 ± 1.090 ^a
Tiempo de residencia (h)	17.946 ± 4.198 ^a	5.619 ± 0.768 ^b	19.019 ± 3.297 ^a
AUC Trapezoidal (µg*h/mL)	23.220 ± 5.297 ^a	12.318 ± 0.510 ^b	20.779 ± 4.278 ^a

Tejido Pulmonar

Parámetro	Presentación Comercial	MRF 1±SD	MRF2±SD
$t_{1/2_{elim}}$ (h)	19.85 ± 3.457 ^a	91.220 ± 11.947 ^b	44.62±1.309 ^c
$t_{1/2_{ab}}$ (h)	1.12 ± 0.188 ^a	0.349 ± 0.040 ^b	0.35±0.009 ^b
t_{max} (h)	4.93 ± 0.857 ^a	2.848 ± 0.367 ^b	2.49±0.067 ^b
C_{max} (µg / mL)	20.93 ± 3.659 ^a	21.927 ± 2.86 ^b	16.44±0.478 ^b
C_{azt96} (µg/mL)	0.823 ± 0.137 ^a	5.528 ± 0.718 ^b	4.907±0.138 ^c
AUC (µg*h/mL)	668.49 ± 116.689 ^a	2118.750 ± 277.617 ^b	1279.25±37.776 ^c
Tiempo de residencia (h)	302.6 ± 52.819 ^a	1321.207 ± 173.116 ^b	648.9±19.157 ^c
AUC Trapezoidal (µg*h/mL)	694.04 ± 121.147 ^a	1910.250 ± 250.298 ^b	1291.28±38.127 ^c
Vdss (L)	36223.77 ± 6323.147 ^a	49886.809 ± 6536.728 ^b	4058.448±119.857 ^c
Cl_b (L/h)	0.0006 ± 0.0001 ^a	0.0000013 ± 1.7E-07	0.0001±2.95E-06 ^c
AUC [∞] (µg*h/mL)	6723.26 ± 1173.589 ^a	11846.509 ± 1552.266 ^b	978.26±28.886 ^c
F_{rel} (%)	^a	3169.458± 415.301 ^a	1913.641±56.517 ^b
K_{el} (µg/mL ⁻¹)	0.6188 ± 0.108 ^a	19.799 ± 2.583 ^b	19.8±0.576 ^b
K_a (µg)	1.6322 ± 2.839 ^a	0.0027 ± 0.0003 ^b	0.1856±0.005 ^c
K_a/K_{el}	2.63791 ± 0.057 ^a	7,374.019 ± 966.227 ^b	106.689±3.148 ^c

Simbología: $t_{1/2_{elim}}$: Vida media de eliminación; $t_{1/2_{ab}}$: Vida media de absorción; t_{max} : Periodo de tiempo para alcanzar la concentración máxima; C_{max} : Concentración máxima alcanzada, C_{azt96} Concentración AZT (µg/mL) a la 96 horas posterior a la administración; AUC: El área bajo la gráfica de la concentración plasmática del fármaco frente al tiempo después de la administración del fármaco; Tiempo de residencia: Tiempo que promedio que el fármaco permanece en el organismo; AUC Trapezoidal: Área bajo la gráfica determinada por la "regla trapezoidal"; Vdss: Volúmenes de distribución; Cl_b : Aclaramiento; AUC[∞]: extrapolación de AUC al área infinita; F_{rel} : Biodisponibilidad relativa; K_{el} : Constante de eliminación; K_a : Constante de absorción; K_a/K_{el} : relación entre la constante de absorción y eliminación. SD.- Desviación estándar. Los valores de cada fila, sin una letra de superíndice común difieren significativamente con un valor de (P <0,05); Modelo 3 R² 0.988.

Figura 11.- Concentraciones de azitromicina en suero y tejido pulmonar de cobayos adultos sanos.



Toxicidad aguda

El presente ensayo incluyó la toma de una muestra sin tratamiento (en blanco), determinando en todas ellas los cambios motivados por la presencia del estrés causado por cambios en el manejo y medio ambiente.

Tratamiento estadístico

El número de animales utilizados para el estudio (n=35) se determinó utilizando el método descrito por Montgomery, 2004, para un diseño experimental de un factor (concentración de azitromicina en suero y pulmón, después de la administración oral de una fracción de tableta equivalente a 8 mg/Kg del principio activo incluido en dos formulaciones de matriz hidrófila diferentes y el de un producto comercial, se determinó la normalidad de los datos usando el ensayo de Shapiro-Wilk. El estudio se centró en inferir la diferencia mínima significativa a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ mediante análisis de varianza (ANOVA) y su posterior contraste de medias utilizando un estudio comparativo de perfiles de disolución. Para ajustar y analizar los perfiles de tiempo y concentración promedio de cada

cobayo; así como de los perfiles de disolución de cada compuesto se utilizó un programa de reducción de curvatura computarizado (PKAnalyst, Micromath Scientific Software for Windows 3.0, Salt Lake City, UT, EE.UU.).

La determinación de los perfiles farmacocinéticos del ensayo *In vivo* se realizó mediante un modelo de comparaciones múltiples por el método de Dunnet que permite su comparación a partir de un control y la búsqueda de respuestas a cuestionamientos específicos, mostrando diferencias estadísticamente significativas con un valor de significancia de 0.05 entre las formulaciones de liberación modificada (MRF) con respecto a la presentación comercial (CP). En los valores de AUC de las formulaciones propuestas con respecto a CP, se observó para MRF1 un límite superior de 1746.66 y MRF2 de 907.16 con un valor de significancia de 0.05; así mismo se realizó el análisis de la relación de concentración entre suero y pulmón en los tiempos 6 y 24 conforme a lo presentado en la cuadro 24.

Cuadro 24.- Valores de concentración en diferentes tiempos y la relación de la concentración en suero y tejido pulmonar utilizados para el análisis estadístico por el método de Dunnet.

Tejido	Concentración azitromicina (µg/mL) en el tiempo de muestreo (h)*	Presentación Comercial	MRF 1± SD	MRF2±SD
		µg/mL	µg/mL	µg/mL
Suero (S)	6	0.610 ± 0.019	0.391 ± 0.036	0.490 ± 0.039
	24	0.570 ± 0.019	0.091 ± 0.005	0.470 ± 0.010
	6h – 24**	0.040 ± 0.019	0.299 ± 0.357	0.019 ± 0.028
Pulmón (P)	6	21.018 ± 0.930	21.888 ± 0.710	16.440 ± 0.87
	24	10.437 ± 0.367	13.619 ± 1.019	13.409 ± 0.357
	6h – 24**	10.493 ± 1.198	9.775 ± 1.457	2.950 ± 0.758
	AUC µg*h/mL	668.488 ± 41.867	2118.747 ± 265.880	1279.25 ± 109.3687
Relación P/S	6 h	34.316 ± 2.776	598.465 ± 65.829	335.510 ± 18.619
	24 h	18.315 ± 0.919	149.015 ± 12.447	287.021 ± 10.328

** Concentración del principio activo presente en el pulmón o suero entre las 6 y 24 horas.
SD.- Desviación Estandar

Discusión

Los comprimidos propuestos se prepararon con éxito por el método de compresión directa (Cuadro 9), se comprobó tanto en el perfil de liberación *In vitro* como en la determinación de la concentración del antimicrobiano mediante el método de difusión en agar, la eficiencia en el control de la liberación del fármaco a pesar de su grado de insolubilidad en agua, y se demostró la viabilidad de procesos de formulación económicos libres del uso de materiales agresivos al medio ambiente.

En el ensayo *In Vitro* se observaron diferencias en cada formulación, no se alcanzó la liberación completa del principio activo, CP liberó de manera inmediata el 28.35% equivalente a 34.02 mg, a lo largo del ensayo se diluyó el 79.53% correspondiente a 95.43 mg del PA contenido en la formulación, con un valor del coeficiente de determinación de 0.898, con lo cual no se cumplió con las especificaciones de clasificación como producto de liberación inmediata; respecto a MRF1 y MRF2 se obtuvieron diferentes valores de liberación, para MRF1 se liberó el 53.8% (67.25 mg) del PA contenido en la formulación, y se ajustó a un modelo lineal con un valor del coeficiente de determinación de 0.980; respecto a MRF2 se liberó durante el ensayo solo el 16.35% (20.43 mg) del PA, ajustándose a un modelo no lineal con coeficiente de determinación de 0.894; mostrando una mayor eficiencia de liberación al final del ensayo; resultados comparables con los trabajos de Bari, et. al (2017) y El Nabarawi et al (2017); respecto al comportamiento de liberación de la azitromicina asociada a Hidroxipropilmetilcelulosa-Carbopol o Hidroxipropilmetilcelulosa-Alginato.

Se determinaron los parámetros de dilución de los tres formulados Área bajo la curva (ABC), porcentaje de eficiencia (% efic) y tiempo medio de liberación (MDT); se determinó el factor de diferencia (f1) y similitud (f2) respecto al producto comercial; datos que permitieron establecer claras diferencias del perfil de liberación y proporción de principio activo liberado de las formulaciones propuestas con respecto a CP, así como disimilitud del comportamiento entre ambos MRF's; dado que en ningún caso se aproximan a un valor de 85% con

respecto a CP (Shah, 2014); por lo que ambas propuestas exhiben un control en la liberación del principio activo; así como cualidades adhesivas que mejoran la permanencia del formulado en el organismo.

En el ensayo *In vivo* las concentraciones observadas en función del tiempo en suero y pulmón (cuadro 20 y 21) permitieron la determinación de diferentes parámetros expuestos en la cuadro 22, apreciando una comparación de la C_{max} y la concentración en la última lectura presentaron diferencias estadísticamente significativas entre CP, MRF1 y MRF2. El tiempo de retención, AUC, V_{dss} y $t_{1/2}$ de los formulados mostraron valores cinéticos particulares para cada caso. La biodisponibilidad relativa (F_{rel}) de MRF1 y MRF2 fue mayor que la de CP (Toutain, 2004). En términos de depuración (CI), el CP tuvo un valor mayor que los valores de MRF1 y MRF2; lo que indica la capacidad del organismo para eliminar algún principio activo en función del tiempo, es decir la cantidad de plasma de la cual el fármaco ha sido eliminado por unidad de tiempo. En el presente estudio, los valores obtenidos fueron muy bajos, indicando una eliminación lenta y eficiente (Jambhekar, 2009).

En el presente estudio, las concentraciones séricas se observaron durante un máximo de 50 horas; en los tres preparados alcanzaron la C_{max} en el tiempo 1, con la posterior reducción de concentración en el tiempo 3; siendo los más evidentes en el preparado MRF1; con una tendencia a la reducción gradual detectada en el tiempo 24; en tanto que para CP y MRF2 se detectó una concentración menor; sin embargo, en el tejido pulmonar, la presencia del principio activo se encontró hasta 96 horas después de la administración. El registro más elevado del tiempo de residencia hasta el último tiempo fue para MRF1 (figura 9).

El producto con el menor valor de eliminación (t_{elim}), correspondió al CP, y el valor más alto fue para el formulado MRF1. La vida media de absorción fue mayor para el CP, el t_{max} más prolongado se encontró con el CP; la C_{max} muestra diferencias estadísticamente significativas, lo que refleja los valores de V_{dss} más elevados para las formulaciones propuestas. La determinación sérica mostró diferencias

estadísticamente significativas en el tiempo 1, la relación de concentración plasma-pulmón en el T6, las constantes de absorción y eliminación (K_a/K_{el}) y la relación (K_a/K_{el}) mostró valores correspondientes a un perfil cinético de tipo flip-flop para ambas formulaciones propuestas. La tasa de absorción es mayor que la tasa de eliminación, con un valor mayor que 2 (Jambhekar, 2009). Por lo tanto, cumpliendo una condición de flip-flop, estos agentes pueden considerarse candidatos para uso en formulaciones de larga duración debido a que las velocidades de absorción en las formulaciones de acción prolongada son mayores que las tasas de eliminación (Yáñez et al., 2011). Las dos presentaciones propuestas mostraron tasas de eliminación mucho más bajas que las tasas de absorción, explicando la posible presencia de cinética de flip-flop y valores de biodisponibilidad relativa inusuales (Inskeep, 2000).

En el presente estudio, MRF1 y MRF2 mostraron eficacia clínica durante las noventa y seis horas del ensayo, pero los valores farmacocinéticos de MRF1 mostraron un comportamiento prácticamente no lineal entre 1 y 50 horas (Brayden, 2003; Abdul et al., 2010) (R^2 0.0119) manteniendo una concentración entre 7.482 ± 0.370 y 21.933 ± 4.910 , con una C_{max} de $22.954 \mu\text{g} / \text{mL}$. CP y MRF2 exhibieron una disminución gradual en las concentraciones plasmáticas y pulmonares desde el inicio de la prueba, mostrando CP la reducción más dramática. La C_{max} detectada en tejido pulmonar y la presencia del principio activo en suero mostró en los tres formulados una absorción rápida, alcanzando concentraciones máximas rápidamente con la consecuente reducción acelerada en el corto plazo (Lee, 2001); MRF2; mostro un comportamiento oscilatorio; se observó la tendencia a mantener la concentración cuando esta tiende a reducir atribuido a una mayor unión con proteínas plasmáticas reportado por Plumb, 2010, se determinó un efecto residual para CP a pesar de la reducción gradual de la concentración en el tejido pulmonar, en contraste con las formulaciones de liberación modificada que mantienen concentraciones dentro de intervalos más estrechos hasta el final del ensayo.

Hasta la fecha, ningún ensayo de disolución ha logrado resultados similares de disolución *In Vitro* y disponibilidad *In vivo* (Vite, 2014); por lo que en este trabajo se demuestra la diferencia en la permanencia orgánica de tres preparados diferentes, utilizando como primera herramienta la comparación de perfiles, factor de similitud (f1) y de diferencia (f2) empleados con el fin de demostrar la diferencia de cada uno de los productos usados respecto a su forma de liberación y no con el propósito de validar su bioequivalencia entre sí (Costa, 2001); integrando el análisis con la determinación de la concentración del Principio activo en suero y tejido pulmonar después de su administración oral en Cobayos.

Durante el ensayo se observó que el principio activo fue rápidamente absorbido, alcanzando altas concentraciones en suero y tejido pulmonar, mostrando una alta selectividad tisular que contribuye a altas concentraciones de azitromicina en el tracto respiratorio; con la potencial concentración en tejido ginecológico y próstata como lo reporta la literatura, permaneciendo por encima del MIC durante varios días con la posibilidad de liberar el antibiótico en sitios con procesos infecciosos (Hoepelmana, 1995). Aunque este fenómeno se observó para los tres compuestos, el análisis de la concentración en el tiempo demuestra el efecto de la matriz hidrófila sobre la extensión de la propiedad de liberación temporal del principio activo y el mantenimiento de parámetros superiores.

Las formas de dosificación propuestas están destinadas a permanecer en la parte anterior del tracto gastrointestinal (estómago o duodeno) para aumentar la biodisponibilidad sistémica del principio activo incluido en una matriz hidrófila (Rodríguez et. al., 2000). Una segunda característica es promover la retención del producto retrasando su expulsión a través de diferentes mecanismos tales como bioadhesión, hinchazón o la combinación de cualquiera de ambos (Jiménez et al., 2006).

La bioadhesión es la capacidad de cualquier material para adherirse a una superficie biológica. Más específicamente, la mucoadhesión se refiere a la adherencia a las superficies de las membranas mucosas (capa celular) o la capa

de mucina que recubre esta membrana superficial. Estos fenómenos mejoran el tiempo de residencia, que suele ser un problema causado por el vaciado del estómago, el peristaltismo y el desplazamiento por movimiento ciliar en la dosificación (Inskeep, 2000).

Los polímeros son compuestos utilizados en la industria farmacéutica para promover la bioadhesión, incluyendo materiales naturales y sintéticos que se pueden unir a la mucosa (Carvalho et al., 2010; Kshirsagar, 2000). En el presente estudio, se utilizaron combinaciones de hidroxipropilmetilcelulosa-alginato de sodio y hidroxipropilmetilcelulosa-Carbopol, consideradas ambas combinaciones con excelentes características bioadhesivas (Brayden et. al., 2003), para obtener la propiedad mucoadhesiva, incrementar la viscosidad del gel formado en la formulación a fin de controlar la liberación del principio activo y aumentar el tiempo de residencia en el tracto digestivo. Esto permitió una liberación prolongada, evitando la presencia de picos de concentración plasmática y garantizando la extensión del período de absorción para mejorar la dosificación del fármaco (Brayden et al., 2010).

La relación entre el control de liberación y el aumento del tiempo de residencia en la porción anterior del tracto gastrointestinal demostró una mayor biodisponibilidad, manifestando un mejor uso de la dosis administrada en comparación con la misma dosis del antibiótico incluido en formulados de liberación inmediata. Se propusieron dos matrices hidrófilas que mostraron valores de C_{max} muy similares, pero marcadas diferencias en las concentraciones al final del ensayo, manteniendo las concentraciones tisulares del fármaco de acuerdo con los niveles terapéuticos óptimos durante un período prolongado de tiempo (Brayden et. al., 2010). Esto demostró la viabilidad de las dos formulaciones propuestas con respecto a la forma de liberación inmediata.

La técnica de bioensayo cuantitativa/cualitativa utilizada en el presente estudio nos permitió determinar las concentraciones séricas de azitromicina con suficiente fiabilidad. Este es uno de los principales métodos de determinación de macrólidos

(Kassaye et al, 2012; Salgado, 2005) y permite la determinación de las fracciones activas del agente antimicrobiano, la inferencia de conclusiones sobre las relaciones entre las diferentes concentraciones en suero, su eficacia e intervalos de dosificación para patógenos específicos. Por lo tanto, fue posible demostrar en el presente estudio que las formulaciones propuestas garantizan las CMI en el tiempo necesario para el éxito en el tratamiento antimicrobiano de patógenos sensibles a la azitromicina.

Los resultados de este estudio respecto a la mayor exposición a azitromicina mediante un sistema de liberación modificada es consistente con los obtenidos por Liu et. al.; 2007; al lograr mantener una concentración con el beneficio terapéutico adicional de maximizar la exposición del fármaco en el sitio de la infección en un momento en que la carga bacteriana es probable que sea la más alta. Por otro lado los criterios de solubilidad de fármacos se basan en la fisiología gastrointestinal humana que pueden no ajustarse a las condiciones de los diferentes animales (Apley, et. al. 2017); un ejemplo de ello es la Azitromicina la cual reporta la literatura una biodisponibilidad oral en la especie humana menor al 50% (Arguedas, 2006); en tanto que en perros es del 97% (Shepard, 1990) y en Cuyos del 30% (Plumb, 2010); por lo que el presente ensayo ofrece seguramente una mejor expectativa en la especie blanco.

La finalidad del diseño de estas formulaciones de acción prolongada (methocel-alginato y methocel-carbopol) es ofrecer un solo agente con valores terapéuticos adecuados durante un tiempo mínimo de 48 horas, proporcionando así la oportunidad de mantener las concentraciones mínimas inhibitorias ideales cuya eficacia antimicrobiana depende del mantenimiento del intervalo de concentración indicado en el tiempo conforme a lo mostrado en la cuadro 22 y figura 13. Una formulación adecuada en la práctica clínica ayudará a reducir la incidencia de efectos secundarios adversos derivados de las concentraciones plasmáticas máximas, reducir la carga de trabajo de los clínicos y propietarios; así como el estrés en los pacientes.

Respecto a los formulados propuestos se sugiere realizar estudios detallados del fenómeno de inclusión intracelular en diferentes velocidades y proporciones de liberación, ya que este es un fenómeno trascendental en el proceso de distribución del fármaco; mostrando la tasa más elevada de inclusión intracelular con respecto al grupo que pertenece; con la posibilidad de determinar en futuros estudios un patrón de comparación en diferentes modalidades de liberación denominado tentativamente “Índice Basal de Azitromicina” (ABI), útil en la caracterización de modalidades de concentración y liberación con fines de quimioterapia antimicrobiana, inmunomodulación, etc.; así como establecer puntos de referencia del propio Principio Activo y de otros compuestos con un comportamiento similar.

Conclusiones

Se logró con éxito el diseño de tabletas con características adecuadas para su manejo y administración.

Los excipientes seleccionados para el diseño de las formulaciones propuestas demostraron inocuidad; además de no afectar la estabilidad química del principio activo, ni su capacidad antimicrobiana.

En el ensayo *In vitro* e *In vivo* las tabletas diseñadas mostraron evidencia matemática y estadística del control de la liberación del principio activo; así como una mayor eficiencia de la dosificación al reducir el requerimiento para alcanzar la CMI durante el tiempo propuesto en la hipótesis del presente trabajo.

Se demostró la diferencia del perfil de liberación y permanencia orgánica de los formulados propuestos con respecto a una presentación de liberación inmediata existente en el mercado.

A pesar de los resultados prometedores en el presente trabajo, es necesario realizar estudios específicos en la especie blanco, debido a la mejor disponibilidad de la Azitromicina del perro con respecto al cobayo

Referencias Bibliográficas

- ABDUL, S., CHANDEWAR, A. V., & JAISWAL, S. B. (2010). A flexible technology for modified-release drugs: multiple-unit pellet system (MUPS). *Journal of controlled release*, 147(1), 2-16.
- Alginates FMC Biopolymer, 2003.
- AMAT HERNÁNDEZ, M. Á. (2005). Inmunomodulación por agentes antimicrobianos en modelos experimentales de inmunocompromiso.
- AMSDEN, G. W. (1996). Erythromycin, clarithromycin, and azithromycin: are the differences real?. *Clinical therapeutics*, 18(1), 56-72.
- ANDREWS, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl 1), 5-16.
- APLEY, M., CRIST, B., GONZALEZ, M. A., HUNTER, R. P., MARTINEZ, M. N., MODRIC, S., & MARQUES, M. R. (2017). Solubility criteria for veterinary drugs. In *USP stimuli article*. Rockville: United States Pharmacopeia Convention.
- ARAUJO, F. G., SHEPARD, R. M., & REMINGTON, J. S. (1991). *In vivo* activity of the macrolide antibiotics azithromycin, roxithromycin and spiramycin against *Toxoplasma gondii*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(6), 519-524.
- ARENAS SOSA IVÁN, LÓPEZ SÁNCHEZ JOSÉ LUIS; Espectrofotometría de absorción, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México; 2004
- ARGUEDAS QUESADA JOSÉ AGUSTÍN (2006). Azitromicina. Actualización Médica Periódica; Número 58
- ARMSTRONG, N., & PALFREY, L. P. (1989). The effect of machine speed on the consolidation of four directly compressible tablet diluents. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 41(3), 149-151.

- ATLI, O., ILGIN, S., ALTUNTAS, H., & BURUKOGLU, D. (2015). Evaluation of azithromycin induced cardiotoxicity in rats. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(3), 3681.
- BARI, F. S. N. U., ISLAM, M. R., MOGHAL, M. M. R., & IRA, I. J. (2017). Release Kinetics Study of Azithromycin from Bi-layered Tablets. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 20(1), 54-63.
- BEKELE, L. K., & GEBEYEHU, G. G. (2012). Application of different analytical techniques and microbiological assays for the analysis of macrolide antibiotics from pharmaceutical dosage forms and biological matrices. *ISRN Analytical Chemistry*, 2012.
- BENNETT, J. V., BRODIE, J. L., BENNER, E. J., & KIRBY, W. M. (1966). Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Applied microbiology*, 14(2), 170-177.
- BLANCO-FUENTE, H., ANGUIANO-IGEA, S., OTERO-ESPINAR, F. J., & BLANCO-MÉNDEZ, J. (1996). In-vitro bioadhesion of carbopol hydrogels. *International journal of pharmaceutics*, 142(2), 169-174.
- BLUMER, J. L. (2005). Evolution of a new drug formulation: the rationale for high-dose, short-course therapy with azithromycin. *International journal of antimicrobial agents*, 26, S143-S147.
- BRAYDEN, D. J., OUDOT, E. J., & BAIRD, A. W. (2010). Drug delivery systems in domestic animal species. In *Comparative and Veterinary Pharmacology* (pp. 79-112). Springer Berlin Heidelberg.
- BRAYDEN, D. J., SEN, S., ALBAY, M. K., GUNN-MOORE, D., ATKINS, M., & SHINNORS, A. (2003). peer reviewed. *irish veterinary journal*, 56, 310-316.
- CABALLERO, R. J. (2009). Actualización en farmacología clínica: Macrólidos. *Revista Paceyña De Medicina Familiar*. 4(6), 149-253.

- Carbopol ®* 71G NF Polymer In Controlled Release Tablets. 2008. Pharmaceutical Bulletin; 32
- CARO CANO F. (2012). Los medicamentos del siglo XXI; Industria Farmacéutica; 174.
- CARVALHO, F. C., BRUSCHI, M. L., EVANGELISTA, R. C., & GREMIÃO, M. P. D. (2010). Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(1), 1-17.
- CHOWHAN, Z. T. (1995). Segregation of particulate solids. I. *Pharmaceutical technology*, 19(5), 56-70.
- Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía de Validación de Métodos Analíticos. México: CNQFB; 2002.
- COSTA, E., ARANCIBIA, A., & AIACHE, J. M. (2004). Sistemas matriciales. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(2), 259-265.
- COSTA, P., & LOBO, J. M. S. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*, 13(2), 123-133.
- CRAIG, W. A. (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical infectious diseases*, 26(1), 1-10.
- DAVIS, J. L., GARDNER, S. Y., JONES, S. L., SCHWABENTON, B. A., & PAPICH, M. G. (2002). Pharmacokinetics of azithromycin in foals after iv and oral dose and disposition into phagocytes. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 25(2), 99-104.
- DOMÉNECH, J., & ESCRIBANO, E. (1998). Preparados orales de cesión modificada: cinética. *Biofarmacia y Farmacocinética*, 2, 317-347.
- DRESSMAN, J. B. (1986). Comparison of canine and human gastrointestinal physiology. *Pharmaceutical Research*, 3(3), 123-131.
- EL NABARAWI, M. A., TEAIMA, M. H., EL-MONEM, R. A. A., EL NABARAWY, N. A., & GABER, D. A. (2017). Formulation, release characteristics, and bioavailability

study of gastroretentive floating matrix tablet and floating raft system of Mebeverine hcl. *Drug design, development and therapy*, 11, 1081.

FLOREY, K. (2014). *Profiles of drug substances, excipients and related methodology* Academic press. (Vol. 39) Azithromycin.

FORTNER, J. H., MILLISEN, W., LUNDEEN, G. R., JAKOWSKI, A. B., & MARSH, P. M. (1993). Tapetal effect of an azalide antibiotic following oral administration in beagle dogs. *Toxicological Sciences*, 21(2), 164-173.

GANDHI, R., ASHOKRAJ, Y., KAUL, C. L., & PANCHAGNULA, R. (2005). Controlled-Release Formulations of Azithromycin. *Pharmaceutical Technology*.

GIBSON, M. (ED.) (2016). *Pharmaceutical preformulation and formulation: a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form*. CRC Press.

GILHOTRA, R. M., NAGPAL, K., & MISHRA, D. N. (2011). Azithromycin novel drug delivery system for ocular application. *International journal of pharmaceutical investigation*, 1(1), 22.

GONZÁLEZ-PIÑERA, J. G., & PENIÉ, J. B. (1998). RODRÍGUEZ, 3 Dr. PEDRO PABLO PINO ALFONSO⁴ Y Dra. NORA LIM ALONSO¹. *Acta Médica*, 8(1), 71-4.

GOSKONDA, V. R., REDDY, I. K., DURRANI, M. J., WILBER, W., & KHAN, M. A. (1998). Solid-state stability assessment of controlled release tablets containing Carbopol® 971P. *Journal of controlled release*, 54(1), 87-93.

HAND, W. L., & HAND, D. L. (2001). Characteristics and mechanisms of azithromycin accumulation and efflux in human polymorphonuclear leukocytes. *International journal of antimicrobial agents*, 18(5), 419-425.

HERNANDO-SASTRE, V. (2010). Macrolide antibiotics in the treatment of asthma. An update. *Allergologia et immunopathologia*, 38(2), 92-98.

- HOEPELMAN, I. M., & SCHNEIDER, M. M. E. (1995). Azithromycin: the first of the tissue-selective azalides. *International journal of antimicrobial agents*, 5(3), 145-167.
- HURLÉ, A. D. G., & SUÁREZ, A. M. (2004). Avances en tecnología farmacéutica. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- INSKEEP, P. B., & DARRINGTON, R. T. (2000). Utilization of biopharmaceutical and pharmacokinetic principles in the development of veterinary controlled release drug delivery systems. *Controlled release veterinary drug delivery*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1-15.
- JAMBHEKAR, S., & BREEN, P. J. (2009). *Basic pharmacokinetics*. Pharmaceutical Press, pp. 53–56.
- JIMENEZ K. A., PALMA S. D. Y ALLEMANDI D. (2006). Sistemas gastro-retentivos de liberación Modificada (SLM) de fármacos; Nuestra Farmacia Nº 48.
- KSHIRSAGAR, N. A. (2000). Drug delivery systems. *Indian Journal of Pharmacology*, 32(4), S54-S61.
- LIEBERMAN, H. A., & LACHMAN, L. (EDS.). (1980). *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets: 1980* (Vol. 1). Marcel Dekker.
- LISS, E. D., CONWAY, S. L., ZEGA, J. A., & GLASSER, B. J. (2004). Segregation of powders during gravity flow through vertical pipes. *Pharmaceutical technology*, 28(2), 78-97.
- LIU, P., ALLAUDEEN, H., CHANDRA, R., PHILLIPS, K., JUNGNIK, A., BREEN, J. D., & SHARMA, A. (2007). Comparative pharmacokinetics of azithromycin in serum and white blood cells of healthy subjects receiving a single-dose extended-release regimen versus a 3-day immediate-release regimen. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(1), 103-109.
- LUCAS, M. F., MESTORINO, O. N., & ERRECALDE, J. O. (2007). Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. *Analecta veterinaria*, 27.

LUNA DEL VILLAR VELASCO, J. (2015). Desarrollo de una película con liberación modificada de antibacterianos que favorezca una adecuada reparación de heridas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Magnesium Stearate Material Safety Data Sheet. 2013. Sciencelab.com, Inc.

Maltose Monohydrate Material Safety Data Sheet. 2013. Sciencelab.com, Inc.

Methocel, Cellulose Ethers; Technical handbook; Dow; 2002.
http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_004a/0901b8038004ab56.pdf?filepath=/198-00755.pd&fromPage=GetDoc

MOFFAT, A. C., OSSELTON, M. D., WIDDOP, B., & WATTS, J. (2011). *Clarke's analysis of drugs and poisons* (Vol. 3). London: Pharmaceutical press. pp.940.

MONTGOMERY D. C. (2a Ed.) 2004. Diseño y Análisis de Experimentos; Universidad Estatal de Arizona.

NOM-062-Z00-1999. Norma Oficial Mexicana, especificaciones técnicas para a producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

NYOLA, N., & JEYABALAN, G. S. (2013). Simultaneous estimation of Azithromycin and Cefixime in Active Pharmaceutical Ingredients and Pharmaceutical dosage forms by Spectrophotometry.

OJOE, E., MIYAUCHI, E. M., VIVIANI, T. C., & CONSIGLIERI, V. O. (2005). Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de comprimidos de liberação prolongada de teofilina preparados com Eudragit®. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(3), 377-384.

PARNHAM, M. J., HABER, V. E., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J., PERLETTI, G., VERLEDEN, G. M., & VOS, R. (2014). Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacology & therapeutics*, 143(2), 225-245.

- PATIL, A., PAYGHAN, S. A., & DISOUZA, J. I. (2011). Formulation and evaluation of enteric coated tablets of azithromycin dehydrate. *Int J Chem Tech Res*, 3, 1479-84.
- PLUMB, D. C. D. C. (2010). Manual de farmacología veterinaria/Plumb's veterinary drug handbook.
- PRAT, S. (2006). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. Gobierno de Chile, Ministerio de Salud, Instituto de Salud Pública de Chile.
- PRESCOTT, J. F., & DOWLING, P. M. (Eds.). (2013). Antimicrobial therapy in veterinary medicine. John Wiley & Sons.
- RAJESH, M., NARAYANAN, N., & CHACKO, A. S. H. A. (2012). Formulation and evaluation of mucoadhesive microcapsules of aceclofenac using methyl cellulose and carbopol as mucoadhesive polymers. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 4(4), 362-366.
- REMYINGTON, J. P. (22th edition) (2012). *Remington: the science and practice of pharmacy*. Ed: Philadelphia College of Pharmaceutical Press; Chapter 45; Oral Solid Dosage Forms.
- ROA, I., SMOK, C., & PRIETO, R. (2012). Placenta: anatomía e histología comparada. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1490-1496
- RODRÍGUEZ, I. C., CEREZO, A., & SALEM, I. I. (2000). Sistemas de liberación Bioadhesivos.
- ROWE, R. C., SHESKEY, P. J., & WELLER, P. J. (7th Ed.). 2012. *Handbook of pharmaceutical excipients*. London: Pharmaceutical press.
- SÁEZ, V., HERNÁEZ, E., & SANZ, A. L. (2004). Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(1), 55-70.
- SALGADO, H., & RONCARI, A. (2005). Microbiological assay for the determination of azithromycin in ophthalmic solutions. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 40(6), 544.

- SÁNCHEZ, R., DAMAS, R., DOMÍNGUEZ, P., CEREZO, P., SALCEDO, I., AGUZZI, C., & VISERAS, C. (2010). Uso de la HidroxiPropilMetilCelulosa (HPMC) en liberación modificada de fármacos. *Farmaespaña Ind*, 48-51.
- SHAH, J. C., & DESHPANDE, A. (2014). Kinetic modeling and comparison of *in vitro* dissolution profiles. *World J. Pharm. Sci.*, 2, 302-309.
- SHEPARD, R. M., & FALKNER, F. C. (1990). Pharmacokinetics of azithromycin in rats and dogs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 25(suppl_A), 49-60.
- SILVA FLORES, P. G. (2012). Desarrollo de tabletas de liberación prolongada de diclofenaco sódico a partir de una matriz hidrofílica.
- SINGH, S. P., MUKARRAM, S. M. J., PUROHIT, M., & KHAN, A. R. (2008). *U.S. Patent No. 7,414,114*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- SINKA, C. (2007). Modelling powder compaction. *KONA Powder and Particle Journal*, 25, 4-22.
- SINKO, P. J. (2011). Dispersed systems, II in Martin's Physical and Pharmaceutical Sciences, PJ Sinko and Y. Singh, Eds.
- SULTANA, T. A., ISLAM, M. S., BHUIYAN, M. N. H., SHOHAG, M. H., AHMED, M. U., NAZNIN, S. R. & HASNAT, A. (2011). Comparative pharmacokinetic and relative bioavailability study of coated and uncoated azithromycin powder for suspension in healthy Bangladeshi male volunteers. *Arzneimittelforschung*, 61(10), 594-598.
- SUMANO HÉCTOR, OCAMPO C. L., GUTIÉRREZ LILIA. (4ª Ed) 2015. Farmacología Veterinaria.
- SUMANO HÉCTOR, OCAMPO C. L., GUTIÉRREZ LILIA. (6ª Ed) 2014. Manual de Farmacología Clínica Para Pequeñas Especies.
- SUN, L., ZHANG, W., LIU, X., & SUN, J. (2014). Preparation and evaluation of sustained-release azithromycin tablets *in vitro* and *in vivo*. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(3), 155-161.

SUTTON, S. C. (2004). Companion animal physiology and dosage form performance. *Advanced drug delivery reviews*, 56(10), 1383-1398.

TOUTAIN, P. L., & BOUSQUET-MÉLOU, A. (2004). Bioavailability and its assessment. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 27(6), 455-466.

United States Pharmacopeia. 2007. United States Pharmacopeia/ National formulary (USP 30-NF 25). Vol. II, New York. USA, pp: 1553-1554.

USP. The United States Pharmacopeial Convention; 2007; MACROLIDES (Veterinary Systemic). www.aavpt.org/associations/12658/files/macrolides.pdf

VILLAFUERTE, L. (2011). The excipients and their functionality in pharmaceutical solid products. *Rev. Mex. C. Farm*, 42(1), 18-36.

VILUKSELA, M., VAINIO, P. J., & TUOMINEN, R. K. (1996). Cytotoxicity of macrolide antibiotics in a cultured human liver cell line. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 38(3), 465-473.

VITE HERNÁNDEZ ALBERTO OLAF. 2014. Estudio comparativo del perfil de disolución de supositorios de indometacina de dos marcas comerciales; Universidad Nacional Autónoma de México.

WELLS, J. I. (1988). *Pharmaceutical preformulation: the physicochemical properties of drug substances*. E. Horwood.

WESTON, G. S., & YEBOAH, K. G. (2013). Site-Specific Drug Delivery to the Gastrointestinal Tract. *Journal of Molecular Pharmaceutics & Organic Process Research*.

YÁÑEZ, J. A., REMSBERG, C. M., SAYRE, C. L., FORREST, M. L., & DAVIES, N. M. (2011). Flip-flop pharmacokinetics—delivering a reversal of disposition: challenges and opportunities during drug development. *Therapeutic delivery*, 2(5), 643-672.

Zithromax®FDA (azithromycin tablets) and (azithromycin for oral suspension);
Reference ID: 2897185; LAB-0022-9.1 Revised October 2010; Pfizer Laboratories.

ZYGNER, W., JAROS, D., GÓJSKA-ZYGNER, O., & WEDRYCHOWICZ, H.
(2007). Azithromycin in the treatment of a dog infected with *Giardia*
intestinalis. *Polish journal of veterinary sciences*, 11(3), 231-234.