



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

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

**DISEÑO DE UN PREPARADO DE
AMOXICILINA – ÁCIDO CLAVULÁNICO DE LARGA
ACCIÓN PARA USO ORAL EN PERROS**

T E S I S

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

PRESENTA

Sayuri Silvia Hayashida Valdés

TUTOR

Héctor Sumano López

COMITÉ TUTORAL

Lilia Gutiérrez Olvera

Fernando Osnaya Gallardo

México, D.F.

2010



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.

DEDICATORIA

Para Sara, Gizmo y Olguer: *Hasta siempre.*

A Kenjiro y Mateo: *Por darle vida a mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

A Greco, Pepper (gracias por aguantarme), Lucrecia y Baruj; y a sus respectivos padres por apoyarme, a “Tigrillo”, “la sorda”, “el chaparro”, “Barbitas”, “la salchichita” y todos los que me ayudaron y nunca supe su nombre: Que todos sus recuerdos de dolor se hayan borrado antes de partir.

A mi tutor, por el tiempo que me dio, por su ejemplo, confianza e invaluable consejos.

A mi comité tutorial: Dra. Lilia, por su notable paciencia, ayuda y enseñanzas;
Dr. Fernando Osnaya, por su tiempo y apreciable contribución.

A la señora Felisa, por su amabilidad, por compartir su conocimiento y por todas mis placas.

A mis compañeros Jeny y Agustín, por la compañía, ayuda y complicidad.

Al Jefe de Departamento (Dr. Ocampo), por su consideración.

Al Dr. Jorge Luna, por su amistad y colaboración con los perros.

A cada uno de mis sinodales: Dra. María Josefa Bernad, Dr. Gabriel Ruíz, M. en C. Enrique Flores, por el tiempo que se tomaron para revisar y mejorar este trabajo.

Al M. en C. Enrique Amador, por su valiosa ayuda, y la Dra. Dinorah por las facilidades para utilizar las instalaciones a su cargo.

Al CONACYT y al laboratorio PiSA, por todo el apoyo proporcionado.

RESUMEN

Las formulaciones comerciales de amoxicilina-ácido clavulánico (AMX-PC) son utilizadas con frecuencia en la clínica de pequeñas especies para tratar diversas infecciones. Siguiendo la tendencia de la industria farmacéutica para uso humano, existen numerosos preparados de AMX-PC para pequeñas especies, que indican un intervalo de dosificación de 12 horas, aventajando a los preparados convencionales que se deben administrar cada 8 horas. Esto se debe a que la eficacia de estos fármacos tiempo-dependientes, se puede optimizar con estrategias de dosificación que maximicen el tiempo de exposición de las bacterias al antibiótico y se han desarrollado numerosos preparados de liberación controlada. Tomando en cuenta que para la AMX, su absorción se limita a los primeros segmentos del tubo gastrointestinal y que no hay evidencia de estudios formales para estos preparados de liberación controlada en perros, el objetivo de este trabajo fue calcular las variables farmacocinéticas (PK) de 2 preparados comerciales para determinar la presencia de bioequivalencia entre ellas. Asimismo, se llevó a cabo el diseño de un nuevo preparado de liberación controlada específico para AMX-PC. El perfil PK de los 4 preparados (el genérico y el de referencia; y dos experimentales) en forma de tabletas, se determinó después de la administración de 12.5 mg/kg de AMX-PC (4:1) en doce perros mestizos en un modelo cruzado. Se llevó a cabo un análisis cuantitativo de las concentraciones plasmáticas de la combinación activa de ambos fármacos y se encontró que la formulación genérica no es bioequivalente a la de referencia. Considerando un valor de 0.25 µg/mL para el punto de inflexión de bacterias susceptibles, los preparados experimentales mostraron una PK más acorde a la farmacodinamia de esta combinación, con concentraciones plasmáticas más uniformes y superiores durante el 75-100% del intervalo de dosificación de 12 horas, que sugieren una efectividad mayor a los preparados comerciales evaluados.

Palabras clave: Farmacocinética, β-lactámicos, liberación controlada, tabletas.

ABSTRACT

Commercial amoxicillin – potassium clavulanate (AMX-PC) formulations are frequently used in the small animal practice in order to treat various infections. Following the tendency of human use - pharmaceutical industry, many preparations of AMX-PC for dogs and cats exist, indicating a 12 h dosing interval and surpassing the conventional preparations that must be administered every 8 hours. This is because the effectiveness of these time-dependent drugs, can be optimized with dosage strategies that maximize the time exposure of the bacteria to the antibiotic, and numerous controlled- release preparations have been developed. Considering that AMX absorption is limited to the first segments of the gastrointestinal tract, and that they are not evidence of formal studies about AMX-PC controlled-released formulations for dogs, the objective of this study was to calculate the pharmacokinetic (PK) of 2 commercial preparations to determine their bioequivalence. Also, the design of a new specific controlled-release preparation for AMX-PC was carried out. The oral PK profile of 4 preparations (a generic formulation and the reference one, and two experimental formulations) as tablets of AMX-PC (4:1 ratio) with a single dose of 12.5 mg/kg in twelve mongrel dogs were carried out in a cross-over model. Using a composite antibacterial activity/plasma concentration quantitative analysis it was found that the generic preparation failed to be bioequivalent. Considering a 0.25 $\mu\text{g/mL}$ of susceptible strains breakpoint, the experimental preparations showed an appropriate PK profile to the pharmacodynamics of these drugs, with more homogeneous and superior plasma concentrations during 75-100% of the 12 hours of dosing interval, it suggest a greater effectiveness formulation than the evaluated commercial preparations.

Keywords: Pharmacokinetic, β -lactamic, controlled-release, tablets.

CONTENIDO

	Página
1. Introducción.....	1
1.1. Antibacterianos β-lactámicos	3
1.2. Consideraciones farmacocinéticas	6
1.3. Absorción de fármacos por vía oral	7
1.4. Consideraciones PK/PD	8
1.5. Sistemas de liberación controlada	14
1.6. Limitantes de la absorción de amoxicilina	16
2. Planteamiento del problema.....	20
3. Justificación.....	21
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivos.....	23
6. Materiales y métodos.....	24
Fase 1: Bioequivalencia	26
Fase 2: Definición del proyecto de formulación	30
Fase 3: Formulación del Preparado Farmacéutico	31
Fase 4: Determinación de las variables farmacocinéticas de dos formulaciones experimentales en perros	32
7. Resultados.....	34
7.1. Bioequivalencia	34
7.2. Propiedades de las tabletas	34
7.3. Elaboración de tabletas	35
7.4. Determinación de las concentraciones plasmáticas de los preparados 2 y 3	35
8. Discusión.....	36
9. Cuadros y figuras	43
10. Referencias.....	56

DISEÑO DE UN PREPARADO DE DE AMOXICILINA – ÁCIDO CLAVULÁNICO DE LARGA ACCIÓN PARA USO ORAL EN PERROS

1. Introducción

Se menciona que los antibióticos representan uno de los rubros más importantes en la industria farmacéutica (Rokem *et al.*, 2007). Por ende, la búsqueda de nuevas moléculas ha sido el objeto de estudio de una buena parte de la investigación farmacéutica durante los siglos pasados, desde que se desarrollaron los primeros antibacterianos sintéticos y a partir de que se observó la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos ya existentes. No obstante, en las últimas tres décadas, los éxitos emanados de la investigación de nuevos antibacterianos ha disminuido notablemente y una derivación consecuente ha sido el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos, así como combinaciones entre los antibióticos disponibles en el mercado, con el objetivo de ofrecer alternativas exitosas para el tratamiento de infecciones bacterianas.

Durante muchos años, la resistencia bacteriana se ha señalado como principal responsable del fracaso de los antibióticos. Sin embargo, si se toma en cuenta que el desarrollo de resistencia a antimicrobianos no es sino una forma de selección natural, es claro suponer que la aparición de cepas resistentes es un proceso inevitable (Burns, 1995). No obstante, el uso racional de los antibióticos es el factor más decisivo para abatir la tasa de aparición de resistencias y sobretodo, para lograr el éxito en la terapia antimicrobiana. Esto es, la dosis debe ser la adecuada en cada especie, se debe cumplir con el intervalo de dosificación y la duración del tratamiento apropiados para el perfil farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) que presentan (Craig, 1998).

Con el marco de referencia dicho, hoy en día existe una tendencia natural a explorar el diseño de nuevas formas farmacéuticas que permiten optimizar la eficacia de moléculas disponibles en el mercado, haciendo óptima la relación de su comportamiento farmacocinético con su farmacodinamia mediante el uso de excipientes que alteren la liberación del fármaco (Papich, 1987).

Al igual que en medicina aplicada a humanos, en la clínica veterinaria se prefiere, en el caso de antibacterianos dependientes del tiempo, el uso de formulaciones cuya administración permite mantener concentraciones terapéuticas del antibiótico durante periodos prolongados, tal es el caso de tetraciclinas, macrólidos y β -lactámicos. En la práctica de pequeñas especies, esto facilita completar en tiempo y forma, los esquemas de tratamiento y se desliga un poco de la idiosincrasia de los dueños de perros y gatos. Así, para los propietarios resulta menos estresante administrar un medicamento una o dos veces al día, que cumplir con las 8 horas entre cada dosificación que exigen algunos antibióticos, en especial los que se consideran tiempo-dependientes. Por ejemplo, para que un β -lactámico funcione clínicamente de forma óptima, debe lograr concentraciones útiles por al menos el 75% del intervalo de dosificación (Craig, 1998).

Se ha percibido en el área veterinaria que, debido a la dificultad y costos que genera la investigación de formulaciones antimicrobianas, se recurre, a menudo, a la extrapolación de productos que van dirigidos a otras especies, incluso de uso humano. Esto necesariamente conlleva a una dosificación con defectos, ya que los medicamentos se comportan de forma distinta en cada especie (Prescott, 2000).

Antibacterianos β -lactámicos

La familia de los antibacterianos que comparten el núcleo β -lactámico es una de las más grandes y se considera una de las más importantes en el área clínica (Coulthurst, 2005). Se ha estimado que la venta de estos antibióticos es de aproximadamente 15,000 millones de dólares al año, por lo que representan los productos con mayores ventas, casi el 65% del total de los antibióticos en todo el mundo (Elander, 2003). En los años cincuentas, la familia entera de antibióticos β -lactámicos consistía en 2 compuestos con un espectro de actividad limitado: penicilina G y penicilina V, por lo que había un gran interés en el desarrollo de nuevas penicilinas. A partir de la definición del núcleo básico en 1957, se modificó la cadena lateral y se lograron nuevos derivados (Rolinson, 1979). En la figura 1 se presenta la estructura general de las penicilinas.

En el área veterinaria, los antibacterianos β -lactámicos son utilizados ampliamente en la clínica de pequeñas especies. Particularmente la amoxicilina es recurrida por muchos profesionales para tratar algunas infecciones de la piel, el aparato urinario y el árbol respiratorio en perros (Francis *et al.* 1978).

La amoxicilina (α -amino-hidroxibencilpenicilina) es una penicilina semisintética del grupo de las aminopenicilinas. Difiere de la ampicilina por la presencia de un solo radical hidroxilo en el radical fenol (Li, 2006). Véase figura 2.

Su nombre químico desarrollado es ácido (2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)acetil]amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico y su fórmula química elemental es $C_{16}H_{19}N_3O_5S$, con un peso molecular de 365.4042 Daltones.

Se acepta que el mecanismo de acción de la amoxicilina es la inhibición de la síntesis de la pared celular que se da por una unión del antibacteriano a receptores específicos (proteínas fijadoras de penicilinas) situados en la cara externa de la pared bacteriana y que llevan a cabo funciones de transpeptidación y carboxipeptidación de los polímeros de mureína, es decir, participan en las últimas fases de la síntesis y maduración del péptido glicano por polimerización de los denominados nucleótidos de Park (Coulthurst, 2005).

La amoxicilina posee un efecto bactericida por lo dicho, y debido a la inactivación del inhibidor de enzimas autolíticas de la pared bacteriana (autolisinas) que lleva a la destrucción celular; el denominado ácido lipotecóico. Las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) son, como se mencionó, enzimas específicas (carboxipeptidasa, transpetidasa y endopeptidasa) implicadas en la fase final de la formación de la pared celular, como se ilustra en la figura 3. Las PBP también tienen la función de reorganizar la pared durante el crecimiento y la división celular. Las PBP 1 a 3 son esenciales para la bacteria, y son el blanco de los antibióticos β -lactámicos (Coulthurst, 2005).

La amoxicilina actúa de manera ideal sobre bacterias en crecimiento. Si se impide el crecimiento de los microorganismos por agregado de un bacteriostático o por omisión de algún nutriente, las penicilinas ejercen su efecto de forma débil solo sobre el ácido lipotecóico. El efecto lítico de la amoxicilina se debe a dos factores:

- Al contener las bacterias una pared celular defectuosa y poco rígida, el microorganismo estalla por la entrada de agua que se produce como consecuencia de la alta presión osmótica interna.

- Provocan la pérdida del inhibidor de autolisinas, que normalmente participan en el recambio de la pared celular y en la separación de las bacterias después de la división celular; el ácido lipotéico. Su bloqueo altera el metabolismo y permeabilidad, lo que lleva a la lisis bacteriana.

A pesar de su efecto doble, numerosas cepas bacterianas generan resistencia a los β -lactámicos por la producción de β -lactamasas que degradan el antibiótico y lo inactivan (Baggaley, 1997). Para 1965, la frecuencia de casos clínicos en humanos, en los que se evidenciaba la producción de β -lactamasas había incrementado dramáticamente y había indicios de que la información genética para producción de estas enzimas, se transmitía entre bacterias por medio de plásmidos, por lo que la resistencia se pudo extender rápidamente entre diferentes especies y géneros bacterianos (Datta, 1968). Esto obligó a la industria farmacéutica a buscar tácticas que contuvieran la expansión de β -lactamasas. Una de estas estrategias es el uso de inhibidores de las β -lactamasas, compuestos estructuralmente similares a los β -lactámicos, tal es el caso del ácido clavulánico (Baggaley, 1997).

El ácido clavulánico (o clavulanato de potasio) es un fármaco β -lactámico bicíclico que carece de núcleo de penicilina ó de cefalosporina (Véase figura 4). Es un metabolito hallado en cultivos de *Streptomyces clavuligerus* y se aisló a principios de los años setentas (Nagarajan, 1971; Finlay, 2003). A concentraciones muy bajas (0.05-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) causa una inactivación irreversible de β -lactamasas que se acentúa entre más tiempo esté en contacto con las β -lactamasas, incluyendo las producidas por *Staphylococcus aureus* y las producidas por plásmidos de enterobacterias, así como las penicilinasas mediadas por cromosomas de *Klebsiella pneumoniae*, entre otras (Brown *et al.*, 1976).

A pesar de que el ácido clavulánico (PC) carece de actividad antimicrobiana, permite ampliar el espectro de acción de la amoxicilina, al formar complejos covalentes con las β -lactamasas producidas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Soback, 1987). Estas uniones inactivan de forma irreversible las enzimas producidas por las bacterias, y por lo tanto, su mecanismo de resistencia. En la figura 5 se presenta la manera en que se logra la inactivación de penicilina por acción de una β -lactamasa.

Consideraciones farmacocinéticas

A pesar de su baja liposolubilidad, pero gracias a su naturaleza de zwitterionⁱ a pH fisiológico, la amoxicilina presenta una buena biodisponibilidad oral. Se ha visto que la amoxicilina se encuentra estrechamente relacionada con la ampicilina y poseen el mismo espectro de actividad y potencia (Sutherland, 1972).

Sin embargo, la amoxicilina tiene una mayor biodisponibilidad cuando es administrada oralmente, incluso puede lograr concentraciones sanguíneas que doblan a las obtenidas con la ampicilina en las mismas condiciones, como se ilustra en la figura 6, donde se representan las curvas de concentraciones plasmáticas vs tiempo de amoxicilina y ampicilina en humanos (Sutherland, 1972).

ⁱ Un zwitterión (del alemán "zwitter" "híbrido", "hermafrodita") es un compuesto químico eléctricamente neutro pero que tiene cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes. (IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Electronic Version. Retrieved November 12, 2006)

Absorción de fármacos por vía oral

Desde los años sesentas, numerosos autores demostraron que una gran cantidad de xenobióticos se absorbían en el intestino delgado por un proceso mediado por acarreadores (Schanker y Jeffrey, 1961; Wass y Evered, 1970; Tsuji y Tamai, 1989). Este hecho dejó entrever que el paso de los fármacos a través del intestino no obedecía únicamente a un proceso de difusión pasiva. Los sistemas de transporte mediados por acarreadores funcionan con moléculas que son lo suficientemente parecidas a la sustancia que normalmente acarrear los transportadores. Actualmente existe una amplia evidencia de la presencia de transportadores específicos para β -lactámicos, incluyendo la amoxicilina. En particular el PepT1, que se expresa en el borde de cepillo de la membrana de los enterocitos, se considera el principal mecanismo de absorción de los antibióticos β -lactámicos. El PepT1 es un transportador oligopeptídico acoplado a protones. Estos transportadores han sido encontrados en duodeno y yeyuno, así como en las células del túbulo proximal en el riñón (Groneberg, 2001).

Se ha observado una disminución en la capacidad de absorción de la amoxicilina en las partes distales del tubo gastrointestinal en humanos (Barr *et al.*, 1994) de tal suerte que se le ha clasificado como un antibiótico “de ventana estrecha de absorción”. Esto significa que su absorción se ve limitada en este caso, a los primeros segmentos del tubo gastrointestinal.

En humanos, se ha descrito que el ácido clavulánico y la amoxicilina poseen propiedades farmacocinéticas similares. Esto permite que durante prácticamente el mismo periodo, ambos compuestos actúen de manera sinérgica contra una gran variedad de cepas bacterianas (Reed, 1998). Sin embargo, cabe destacar la importancia del

conocimiento de la relación farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD) de la amoxicilina, para poder establecer un régimen de dosificación verdaderamente efectivo.

Consideraciones farmacocinéticas-farmacodinámicas

La relación PK/PD considera la fluctuación de las concentraciones plasmáticas del fármaco en el sitio de infección después de administrar una dosis de antibiótico y su mecanismo de acción. Esto es, una vez que se conocen las características farmacocinéticas de un antibiótico, se tienen las bases para la determinación del régimen de dosificación óptimo en cuanto a dosis e intervalo de dosificación, en función del mecanismo molecular por el que el fármaco ejerce su efecto.

En general los antibióticos se dividen en 2 grupos: aquellos que son principalmente bacteriostáticos y los esencialmente bactericidas.

Los primeros requieren del sistema inmune del organismo infectado para eliminar por completo los microorganismos de los tejidos. Sin embargo, si el sistema inmune del hospedador se encuentra comprometido y no es capaz de eliminar completamente las bacterias, los patógenos residuales reinician su crecimiento y la infección se presenta nuevamente. En estas circunstancias se requiere del uso de antibióticos bactericidas (Levison, 1995).

La actividad antimicrobiana de los fármacos se establece comúnmente por la determinación de su concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) *in vitro* después de la incubación aeróbica en un medio líquido libre de proteínas a un pH de 7.2. No obstante, si se considera que en los sitios de infección de un organismo se encuentran elementos proteicos, es un medio anaeróbico por lo general y con pH ácido, podría sospecharse que el efecto del antibiótico *in vivo* será

impredecible con respecto al resultado *in vitro*. Las CMI y CMB son valores *in vitro* de potencia que no proveen información sobre el periodo de eficacia a lo largo del intervalo de dosificación y obviamente no consideran las fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas y tisulares del fármaco utilizado. Además, el inóculo estándar que se usa (10^5 ufc/mL) no necesariamente corresponden a las densidades bacterianas que se encuentran en el sitio de infección. Así, si la CMI se define como la concentración mínima de antibiótico que evita la turbidez de una suspensión cristalina de 10^5 ufc/mL, después de ser incubado durante una noche, la turbidez usualmente corresponde a un incremento de por lo menos 10 veces la densidad bacteriana. Debido a que las suspensiones bacterianas cristalinas probablemente contienen menos de 10^5 ufc/mL, la CMI determinada por dilución puede ser bactericida en cierto grado (Levison, 1995).

Si la concentración mínima de antibiótico que impide la turbidez disminuye la densidad bacteriana de 10^5 ufc a 10^2 ufc/mL, puede aseverarse que la CMI es, en cierta medida, también la CMB. De esta forma, para antibióticos bactericidas, la CMB es la misma, o no mayor a 4 veces más que la CMI. A diferencia de los compuestos bacteriostáticos, en los que la CMB es notablemente mayor a la CMI. El grupo de los β -lactámicos se clasifica como un antibiótico bactericida. Dado que la CMI es, de cierta manera, una medida de la potencia de un antibiótico, las distintas cepas de una bacteria en particular, presentan variaciones en cuanto a la CMI. Así, las cepas sensibles tienen una CMI relativamente baja, mientras que cepas resistentes presentan una CMI mayor. El punto de inflexión o “breakpoint”, es la CMI que separa cepas resistentes de sensibles y se establece por su capacidad de segregar dos poblaciones extremas: una

cuyas CMI están por debajo del breakpoint (susceptibles) y otra donde sus CMI son mayores al breakpoint (resistentes) (Levison, 1995).

Después de la administración de un fármaco bactericida, la población de bacterias puede decaer notablemente en la primera porción del intervalo de dosificación, cuando los niveles de fármaco libre excedan la CMB. Cuando las concentraciones del fármaco no unido a proteínas caen por debajo de la CMB, pero aún están por encima de la CMI, la población de bacterias disminuye por la acción conjunta del antibiótico y el efecto de las defensas del huésped.

Cuando las concentraciones de antibiótico libre caen por debajo de la CMI, cualquier efecto antibacterial que persista, puede deberse a diferentes causas:

1. Luego de una exposición de los microorganismos al agente antibiótico, puede persistir la supresión del crecimiento bacteriano por la toxicidad inicial, incluso en ausencia de las defensas del organismo hospedador. A esto se le conoce como “efecto post-antibiótico”.
2. Después de la exposición al antibiótico, las bacterias son más susceptibles a la actividad de los fagocitos, esto se conoce como “incremento de leucocitos post-antibiótico”.
3. Se ha demostrado que las concentraciones de antibiótico debajo de la CMI alteran la morfología bacteriana, disminuyendo la velocidad de crecimiento de los microorganismos y prolongando el efecto post-antibiótico. La concentración mínima que altera la morfología celular de las bacterias se conoce como “concentración mínima antibacteriana”.

Tarde o temprano, los efectos residuales del fármaco disminuyen y las bacterias restantes reinician su crecimiento como ya se mencionó (Ingerman, 1986). La velocidad a la que la población bacteriana dobla su número es variable para cada especie bacteriana y sitio de infección. En algunos casos, se ha observado que el rebrote bacteriano puede restablecer la susceptibilidad de las bacterias a los β -lactámicos (Stevens, 1993), dado que se encuentran en una fase de crecimiento rápido que requiere de una actividad acelerada de síntesis de pared bacteriana. No obstante, se considera que idealmente, la siguiente dosis debería administrarse antes de que se presentara el rebrote bacteriano. Si el intervalo de dosificación se prolonga demasiado, la cuenta bacteriana puede ser igual o tal vez mayor a la que inicialmente había, como resultado de la reactivación del crecimiento bacteriano al final del intervalo de dosificación. Esto puede comprometer la eficacia del antibiótico (Ingerman, 1986).

El tamaño de la población bacteriana al final de cada intervalo de dosificación, y en última instancia la eficacia del régimen antimicrobiano, dependen de la interacción de varios factores como: el tamaño de la población de bacterias inicial, la potencia del antibacteriano (CMI y CMB), las características farmacocinéticas del agente antimicrobiano, la presencia de efecto post-antibiótico, la velocidad de crecimiento de bacterias persistentes y la presencia de defensas del hospedero (Levison, 1995). De tal suerte que es difícil comparar mediante modelos clínicos, cuál de los dos o más preparados farmacéuticos de un mismo principio activo es el mejor y se prefiere deducir este dato a partir de las concentraciones plasmáticas.

Los antibióticos pueden dividirse, por lo tanto, en 3 grupos basándose en sus características farmacodinámicas (Craig, 2003): El primer grupo contiene a los fármacos que muestran una actividad antibacteriana dependiente del tiempo que

mantienen las concentraciones por encima de la CMI, como es el caso de los β -lactámicos. Este grupo de antibióticos tiene un efecto bactericida relativamente lento y un efecto post-antibiótico muy corto, o nulo. El segundo grupo incluye antibióticos que presentan una actividad bactericida dependiente de la concentración y efecto post-antibiótico importantemente prolongado. A diferencia de los primeros, para este grupo la cantidad de antibiótico y el área bajo la curva de concentración (AUC) respecto a la CMI (AUC/CMI) determinan su eficacia, más que la frecuencia de dosificación, en este grupo se incluyen a las fluoroquinolonas y aminoglucósidos. El tercer grupo se refiere a aquellos fármacos que son predominantemente bacteriostáticos y producen un efecto post-antibiótico de moderado a prolongado (macrólidos, tetraciclinas); debido a este efecto post-antibiótico, su eficacia se determina por el área bajo la curva de concentración vs. tiempo y no tan directamente por el tiempo en el que igualan o exceden los valores de la CMI.

Usualmente las concentraciones sanguíneas de los fármacos se utilizan para correlacionarlas con los parámetros farmacodinámicos; tal es el caso del porcentaje de tiempo que los niveles de antibiótico exceden la CMI y la magnitud del pico de AUC/CMI del antimicrobiano. Sin embargo, el uso de los niveles séricos para determinar los parámetros farmacodinámicos no siempre es lo más apropiado (Craig, 2003). Por ejemplo, la mayoría de las infecciones ocurren en espacios extravasculares y en realidad el uso de las concentraciones sanguíneas únicamente es satisfactorio si los niveles sanguíneos se correlacionan con el volumen de distribución y la biodisponibilidad del fármaco al sitio de infección (Barza, 1985).

Así pues, para antimicrobianos dependientes del tiempo, el incremento en las concentraciones plasmáticas mucho más arriba de la CMI, no favorece su actividad antibacteriana y efecto clínico. Tal es el caso de los β -lactámicos que tienen una actividad bactericida relativamente lenta (Ingerman, 1986).

Como consecuencia, cuando los niveles de antibiótico caen por debajo de la CMI, existe una población de bacterias residuales muy grande y como se mencionó anteriormente, estas bacterias reinician su crecimiento rápidamente debido a que los β -lactámicos en general tienen un efecto postantibiótico bajo (Craig, 2003).

Por otro lado, los antibióticos β -lactámicos poseen un denominado “efecto de inóculo”; mientras más baja es la densidad bacteriana, más baja es la concentración de antibiótico que se requiere para inhibir su crecimiento (Brook, 1989). Así, la concentración mínima de estos antimicrobianos que inhiben el crecimiento pueden disminuir progresivamente hasta quedar por debajo de la CMI estándar y debido a que la densidad bacteriana también se reduce durante el tiempo que dura la terapia antimicrobiana, el tiempo que las concentraciones de antibiótico superan la CMI se puede alargar progresivamente. Desafortunadamente este efecto no se puede calcular o determinar en situaciones clínicas.

La eficacia para estos fármacos dependientes del tiempo, se puede optimizar con estrategias de dosificación que maximicen el tiempo de exposición de las bacterias al antibiótico. Asimismo, se ha demostrado que para un efecto mínimo útil, se requiere que las concentraciones plasmáticas de los antibióticos tiempo-dependientes, excedan la CMI para el patógeno en cuestión, durante por lo menos el 50% del intervalo de dosificación. Si se quiere que la eficacia clínica aumente a cerca del 100%, se debe lograr más del 75% del tiempo con el perfil dicho. Evidentemente estos valores difieren

para cada tipo de β -lactámico, así como para el microorganismo que se pretende tratar (Craig, 2003).

No obstante, es definitivo que existe una correlación positiva entre el porcentaje del intervalo de dosificación durante el cual se mantiene la concentración plasmática por encima de la CMI y el porcentaje de efectividad del tratamiento. Así, si las concentraciones plasmáticas están por encima de la CMI del 75 al 100% del intervalo de dosificación, se tienen valores del 90-100% de éxito en el tratamiento, como se ejemplifica en la figura 7 (Craig, 1998).

Así, para los fármacos tiempo-dependientes es más importante que la vida media del fármaco sea prolongada (ya sea por absorción prolongada o por vida media de eliminación larga) a que se logre una concentración plasmática máxima (C_{\max}) muy elevada, aunque para que el efecto dure se puede pensar en una C_{\max} elevada. Esa concentración también se conoce como “breakpoint farmacodinámico” para antibióticos tiempo-dependientes. Esta situación se puede solventar con un preparado farmacéutico de liberación prolongada (Véase figura 8).

Sistemas de liberación controlada

La idea de poder incluir excipientes capaces de modificar la liberación del activo y con ello aumentar su efecto, fue la concepción original de los primeros sistemas orales de liberación modificada, denominados de liberación sostenida a finales de los años cuarentas y principios de los cincuentas. Cabe mencionar que una forma farmacéutica convencional se distingue de los sistemas de liberación controlada (SLC) porque en los primeros, la dosis del principio activo está disponible totalmente para ser absorbida inmediatamente después de su administración. Asimismo, el SLC es capaz de promover

control en la concentración del activo ó de ubicación en el organismo, o ambos (Bernad, 2010).

Se acepta que liberación modificada se refiere a toda aquella preparación farmacéutica cuya velocidad de liberación de la sustancia activa es diferente a las formulaciones convencionales destinadas a la misma vía. Así, existen tres tipos de liberación: acelerada, diferida o retardada, y prolongada o extendida. La liberación sostenida se refiere a todas las formas de dosificación que proveen medicación sobre un extenso periodo de tiempo en general (Bernad, 2010).

En las últimas décadas se han desarrollado formulaciones de liberación retardada con la finalidad de mejorar la biodisponibilidad de muchos medicamentos. Sin embargo, este tipo de formulaciones no resulta de utilidad para los fármacos cuya absorción es de ventana estrecha (estómago, duodeno, yeyuno), como es el caso de la amoxicilina. Esto se debe a que la mayoría de las formas farmacéuticas orales de liberación retardada que actualmente se encuentran en el mercado tienden a liberar el fármaco en las últimas porciones del intestino, con un transito sin eventos y relativamente rápido en los primeros segmentos. De esta forma, en un periodo de menos de 6 horas, las formulaciones de liberación retardada han pasado por el tubo gastrointestinal superior y el fármaco se libera en los segmentos distales del tubo gastrointestinal, principalmente el colon, donde los β -lactámicos no se pueden absorber. Con la fase de absorción disminuída, la biodisponibilidad del fármaco es menor (Kerc y Opara, 2007).

Limitantes de la absorción de amoxicilina

Hwang *et al.* (1998) postulan que para los fármacos de “ventana estrecha de absorción”, resultan ideales las propiedades de alta absorción que poseen el duodeno y yeyuno, que incluyen formas activas de absorción y la superficie de absorción, que es mayor en comparación con la del colon, también lo atribuyen a una solubilidad del fármaco favorecida por las secreciones del estómago, contrario a lo que sucede en las partes distales del tubo gastrointestinal.

Considerando el escenario dicho, se ha sugerido que la composición de los fármacos de ventana estrecha de absorción en una única forma farmacéutica con propiedades gastro-retentivas podría alargar la fase de absorción de los mismos. De esta manera, después de la administración oral, un SLC especial para estos fármacos, lograría la liberación del fármaco de forma prolongada y podría llegar continuamente a los segmentos de absorción efectiva en el tubo gastrointestinal sin saturar sitios de absorción y evitando el tránsito rápido. Esta forma de liberación representaría una gran ventaja en los parámetros farmacocinéticos de estos fármacos (Hoffman, 1999). Con esta visión y con la finalidad de extender el tiempo de residencia gástrica de la amoxicilina, se han desarrollado numerosas formulaciones, como tabletas flotantes (Hilton y Deasy, 1992), tabletas mucoadhesivas (Clausen y Bempok-Schnurch, 2001) y microesferas mucoadhesivas (Wang *et al.*, 2000). Debido a que la amoxicilina trihidratada es susceptible a una rápida degradación en pH alcalino y es más o menos estable en medios ácidos, se busca un SLC tal, que logre mantener las concentraciones plasmáticas terapéuticas por un periodo prolongado.

El uso de polímeros para controlar la liberación de fármacos ha tomado importancia desde hace ya unas décadas. Los polímeros como el ácido polimeta-acrílico (PMAA), polietilenglicol (PEG), ácido poliacrílico (PAA), hidroxipropilmetil celulosa (HPMC) y quitosan son algunos ejemplos de excipientes que han sido utilizados para mejorar el comportamiento farmacocinético de formulaciones con amoxicilina (Aydin *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 1995; Hilton y Deasy, 1992; Lennemas *et al.*, 2002; Susana *et al.*, 2004; Chun *et al.*, 2005). Los éteres de celulosa no iónicos, en particular la hidroxipropil metilcelulosa (HPMC, hipromelosa) han sido estudiados ampliamente por sus aplicaciones en sistemas orales de liberación retardada (Rajabi-Siahboomi, 2000).

La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), es un éter propilenglicol de celulosa (Figura 9). Es altamente mucoadhesiva, biocompatible, biodegradable, insensible a cambios de pH y soluble en agua y algunos solventes orgánicos. Debido a que no presenta toxicidad y es de fácil manufactura, ha ganado popularidad para su uso en SLC. El mecanismo por el cual retarda la liberación del fármaco incluye su capacidad de formar rápidamente una capa de gel en la periferia de las matrices una vez que son expuestas a medios acuosos (Mandal, 1995). Mientras que los fármacos con baja solubilidad solamente se liberan por la erosión de la matriz, los fármacos altamente solubles en agua son liberados por difusión a través de la capa gelatinosa de HPMC (George *et al.*, 1978).

Como consecuencia, la velocidad de liberación se asocia a la porosidad y tortuosidad de la red de poros y canales de la matriz. La porosidad y la tortuosidad de una matriz hinchable se atribuyen, de manera primaria, a la capacidad de expansión del polímero (Efentakis, 1997).

El quitosano es un polímero lineal de biopoliaminósacárido β (1,4) unido a N-acetil glucosamina (Véase figura 10), es un derivado deacetilado de la quitina, un polisacárido natural encontrado abundantemente en crustáceos marinos, insectos y algunos hongos (Sahasathian *et al.*, 2007). Es una base débil e insoluble en agua y disolventes orgánicos, soluble en soluciones ácidas y ligeramente soluble en soluciones alcalinas (Goren *et al.*, 1988). Se le han descrito numerosas propiedades, como biodegradabilidad, no toxicidad, biocompatibilidad, mucoadhesividad y más recientemente se le ha conferido la habilidad de incrementar la biodisponibilidad de algunos compuestos poco solubles en agua (Uchida *et al.*, 1988; Seo *et al.*, 1992; Onishi y Machida, 1999; Chatelet *et al.*, 2001;), debido a su naturaleza que le permite abrir las uniones estrechas de la membrana celular. Esta propiedad ha sido explotada para favorecer la absorción de compuestos hidrofílicos y de aquellos que tienen baja biodisponibilidad oral, como es el caso de los péptidos (Sinha, 2001).

El quitosano se utiliza como agente protector en formulaciones orales convencionales, como las tabletas. Sin embargo, su habilidad para formar matrices hace que sea más extensamente usado en otro tipo de formulaciones. Se ha observado que las cápsulas de quitosano se desintegran principalmente en el intestino grueso, siendo una de las mejores opciones para liberación específica en intestino de grueso de algunos fármacos.

La meta de los sistemas de liberación retardada para fármacos es hacer llegar el fármaco intacto a las diferentes partes del organismo donde es requerido, a través de un medio capaz de controlar la administración de la terapia. A pesar de que existen numerosos estudios de la farmacocinética de los preparados de larga acción en humanos (Kaye, 2001; Kerc, 2007), numerosas búsquedas en la literatura formal a través de bases

de datos electrónicas (Agricola, MedLine, VETCD, Agris, The USP 2007, etc) revelan que no se ha descrito la farmacocinética de los preparados de larga acción en perros. Los estudios de biodisponibilidad para productos que indican un intervalo de dosificación extendido en perros son igualmente escasos y la extrapolación de las variables farmacocinéticas a partir de estudios en humanos es insuficiente.

También es necesario hacer hincapié en las diferencias entre humanos y perros en cuanto a tiempo de vaciamiento gástrico, tiempo de tránsito gastrointestinal y la variación de pH entre los diferentes segmentos gastrointestinales, que podrían causar modificaciones importantes en la absorción de ambos fármacos. Como consecuencia, una extrapolación directa de la formulación utilizada en humanos, podría no proporcionar el mismo perfil plasmático de amoxicilina y ácido clavulánico en perros, que se requiere para ese tipo de fármacos tiempo dependientes (Kaye, 2001).

2. Planteamiento del problema

Definir la farmacocinética en perros adultos, de 2 preparados de amoxicilina-ácido clavulánico a una dosis de 12.5 mg/kg de ambos, cuyo intervalo de dosificación está indicado para 12 horas. Mediante una comparación estadística se determinará si existe o no bioequivalencia entre ellos, y si su perfil farmacocinético provee concentraciones plasmáticas terapéuticas durante el intervalo de dosificación que indican.

Desarrollar un preparado oral de amoxicilina-ácido clavulánico para perros, cuyo diseño farmacéutico permita una adecuada farmacocinética-farmacodinamia con un intervalo de dosificación de 12 horas. Tomando en cuenta las características farmacocinéticas de la amoxicilina y las fisiológicas de la especie a la que será destinada, la formulación deberá cumplir con las siguientes características:

- Que cada tableta tenga un diámetro de no menos de 5 mm y al llegar al estómago, la matriz se hidrate rápidamente y aumente su volumen, iniciando así también la liberación de los principios activos.
- Que la liberación de la amoxicilina desde el estómago, se mantenga durante por lo menos 8 horas post-administración.
- Que la tableta supere los diferentes mecanismos fisiológicos de vaciamiento gástrico. Esto es, que durante las 4 horas previas a la fase III del Complejo Motor Migratorio (CMM), permanezca lejos del antro pilórico y con un tamaño mayor a 7 mm. Una vez alcanzada la fase III del CMM deberá estar adherida a las paredes del estómago para evitar ser evacuada del mismo.
- Cada tableta deberá contener 200 mg de amoxicilina y 50 mg de ácido clavulánico, suficientes para dosificar perros de aproximadamente 20 kg.

3. Justificación

Tomando en cuenta que la amoxicilina es un antibiótico tiempo-dependiente, y que por lo tanto requiere mantener una concentración sanguínea al menos 2 veces mayor que la CMI del patógeno en cuestión y durante aproximadamente el 75% del intervalo de dosificación, es factible asumir que la actual tendencia a elaborar SLC para mantener estas concentraciones están encaminadas a facilitar el cumplimiento de los regímenes de dosificación óptimos para este antibiótico. El impacto clínico de este tipo de formulaciones es tal, que repercute incluso en una mejor posición en el mercado. Esto se ejemplifica con el preparado de amoxicilina-ácido clavulánico utilizado en humanos, que logró escalar a los primeros lugares en ventas luego de reformular el producto original ofreciendo un intervalo de dosificación de 4 horas más que el primero. Sin embargo, cabe señalar que los preparados comerciales disponibles en medicina veterinaria han comenzado a indicar intervalos de dosificación similares (12 horas) en sus productos convencionales sin haber de por medio estudios farmacocinéticos en la literatura formal acerca de estos preparados y que, conociendo las características de la amoxicilina, hacen suponer que son de liberación modificada. De tal suerte, un primer paso es evaluar en estudios de bioequivalencia si existe o no en 2 de ellos, la farmacocinética que permita un intervalo de dosificación de 12 horas. Además se pretende elaborar una formulación de liberación modificada, a base de hidroxipropil metilcelulosa y haciendo variaciones con quitosan, con la finalidad de lograr que la matriz se mantenga el mayor tiempo posible dentro del estómago y a partir de ahí libere los principios activos. De esta manera se optimizará la absorción de la amoxicilina, que ya está demostrado, se lleva a cabo en los segmentos proximales del tubo gastrointestinal.

4. Hipótesis

- Si se determina la farmacocinética de 2 preparados comerciales de amoxicilina-ácido clavulánico, será distinta significativamente entre ellos, y al menos en un caso, la relación PK/PD que presenta no permite un intervalo de dosificación de 12 horas como están indicados ambos preparados.
- Si se desarrolla un sistema de liberación controlada de amoxicilina/ácido clavulánico a una dosis de 12.5 mg/kg de amoxicilina- ácido clavulánico (4:1) que libere de forma extendida el antibiótico en los primeros segmentos del tubo gastrointestinal, se lograrán perfiles farmacocinéticos más compatibles con la farmacodinamia de esta mezcla.

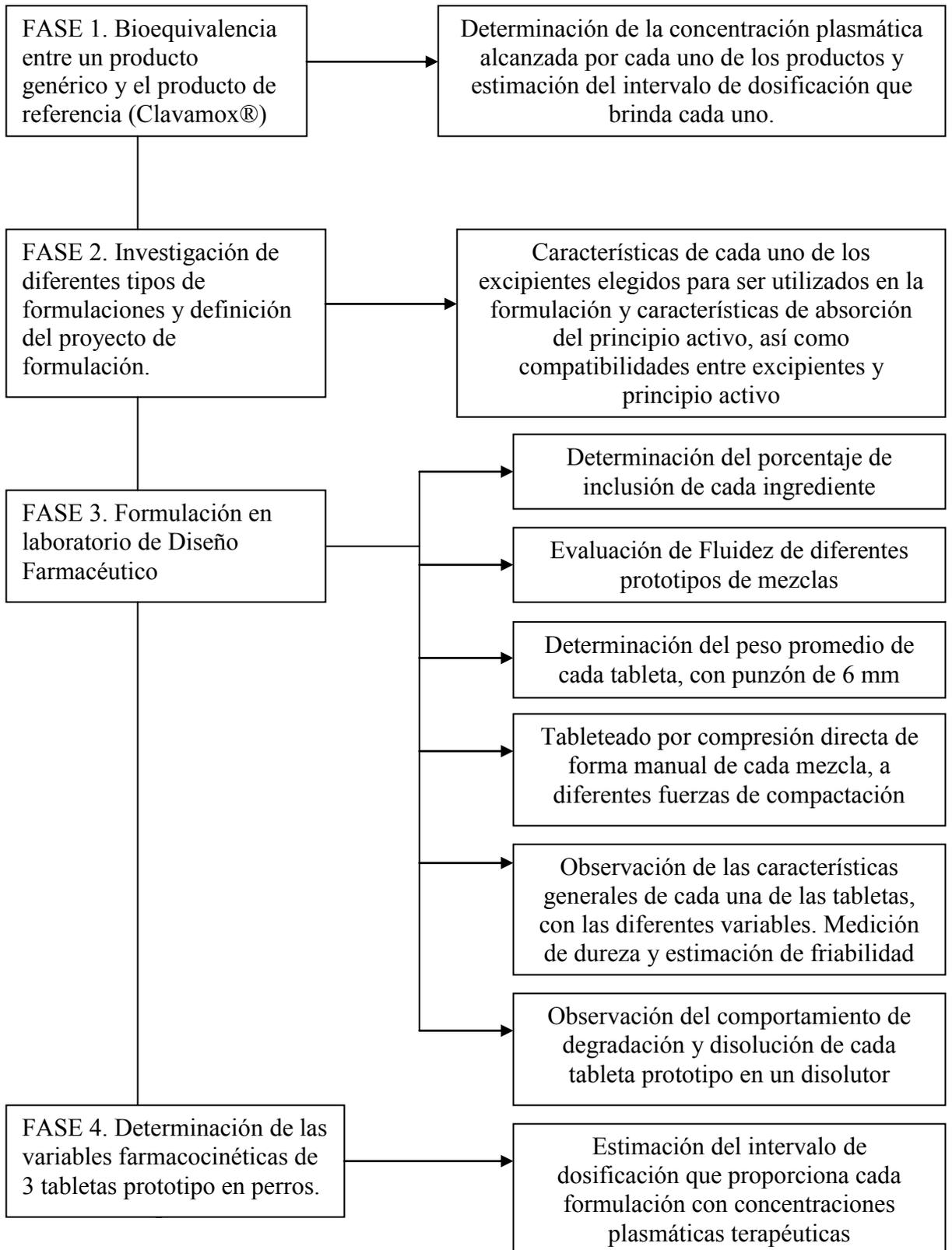
5. Objetivos

- Evaluar la bioequivalencia de 2 preparados de amoxicilina-ácido clavulánico en perros a una dosis de 12.5 mg/kg de amoxicilina - clavulanato de potasio, cuyo intervalo de dosificación está indicado para 12 horas.
- Desarrollar un sistema de liberación controlada de amoxicilina-ácido clavulánico utilizando polímeros derivados de la celulosa y la quitina, y determinar sus variables farmacocinéticas en perros.

6. Materiales y métodos

La parte analítica de este experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Diseño Farmacéutico de la Facultad de Química, y en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Farmacología, de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia, ambas de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicada en Ciudad Universitaria, Ciudad de México. El presente estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de Posgrado, Cuidado y Uso de Animales de Experimentación, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El trabajo con animales se llevó a cabo en las instalaciones de Enseñanza del Departamento de Cirugía de Pequeñas Especies, de la misma Facultad. El principio activo (clavulanato de potasio y amoxicilina trihidratada) fue proporcionado por Laboratorios PiSA, S.A. de C.V., y la información detallada sobre los excipientes utilizados se detalla más adelante.

El estudio se llevó a cabo conforme el siguiente diagrama de flujo:



6.1. Fase 1: Bioequivalencia

Se realizó el análisis farmacocinético después de administrar una dosis oral (PO) de 12.5 mg/Kg de amoxicilina - clavulanato de potasio en perros adultos en un modelo cruzado (6 x 6). Se utilizó un producto genérico disponible en México, proporcionado por el fabricante (Amoxiclav[®] PiSA, S.A. de C.V.) y como producto de referencia Clavamox[®] (Pfizer Animal Health, Mexico). Ambas formulaciones se encuentran en forma de tabletas y los fabricantes indican un intervalo de dosificación de 12 horas.

Se utilizaron doce perros mestizos, clínicamente sanos; 6 machos y 4 hembras cuya edad oscilaba entre los 11 meses y 7 años. El peso de los perros fue de 17.3 ± 1.8 kg. Los perros se mantuvieron en el área de perreras de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M. con agua y alimento *ad libitum* hasta 12 horas antes del estudio. Se dividieron en 2 grupos de forma aleatoria (Grupo A: Producto de referencia; Grupo B: Producto genérico). Cada perro se pesó y se ajustó cada tableta para dosificar 12.5 mg/kg de los principios activos. La tableta se ofreció dentro de un trozo de aproximadamente 2 x 2 cm de salchicha comercial y se verificó que todos los perros la tragarán. Se les colocó un catéter heparinizado de 3 pulgadas de longitud (Becton Dickinson, Mexico City) en la vena cefálica para la obtención de las muestras sanguíneas. Se recolectaron 3 mL de sangre, en los siguientes tiempos post administración: 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h. Las muestras fueron centrifugadas inmediatamente, durante 15 minutos a 3500 rpm. El plasma fue extraído y depositado en viales, identificados y congelados en nitrógeno líquido hasta que fueron procesadas una semana después. Se proporcionó un intervalo de 10 días de depuración y posteriormente, los grupos se invirtieron (Grupo A: Producto genérico; Grupo B: Producto de referencia).

La concentración activa de la composición amoxicilina/ácido clavulánico en cada muestra de plasma se determinó por triplicado, utilizando el método de análisis microbiológico por difusión en agar descrito por Bennet (1966), el cual permite medir la concentración en términos de actividad antibacteriana *in vitro* del antibiótico. Se recurrió a una cepa sensible de *Bacillus subtilis* como microorganismo de prueba, a una concentración de 5×10^5 ufc/mL. Así mismo se utilizó agar Müeller-Hinton (Merck, México) enriquecido y utilizando 0.1 mL de plasma de perro como muestra. A continuación se describe el método de análisis microbiológico de difusión en agar:

Preparación del estándar bacteriano:

En un tubo de tapón de rosca se colocan 5 mL de agua destilada y una asada de cultivo bacteriano joven de la bacteria utilizada como prueba, resembrado 24 horas antes. Se ajusta la concentración de bacterias por medio de diluciones hasta obtener una concentración de 5×10^5 ufc/mL, correspondiente a 70-75% de transmitancia.

Preparación de diluciones estándar:

Se hace una solución al 0.02% de agua desionizada y un estándar de amoxicilina trihidratada con 99% de pureza, con ayuda de un matraz aforado estéril de 100 mL.

Se marcan 10 tubos de ensayo de 5 mL, del número 1 al 10, y un tubo de 15 mL con el número 0. En el tubo 0 se colocan 9 mL de agua desionizada, mientras que en los tubos 1-10 se coloca 1 mL de la misma. Se transfiere 1 mL de solución del matraz al tubo 0 y se homogeneiza. Utilizando una nueva pipeta, se transfiere 1 mL del tubo 0 al 1 y nuevamente se homogeneiza la mezcla. Se realizan los pases de 1 mL de forma sucesiva de un tubo a otro, hasta terminar en el tubo 10.

De esta manera se obtienen las siguientes concentraciones conocidas del fármaco en cuestión:

Tubo	Concentración Amoxicilina ($\mu\text{g/ml}$)
Matraz 100 ml	200
0	20
1	10
2	5
3	2.5
4	1.25
5	0.625
6	0.3125
7	0.15625
8	0.07812
9	0.03906
10	0.01953

Elaboración de placas de agar:

Se preparan 300 mL de agar según las especificaciones del fabricante. Se vierte en un refractario estéril de vidrio templado tipo Pyrex® de 21 x 20 cm. Se deja enfriar durante 10 minutos. Se siembran 400 μg de la suspensión bacteriana de manera uniforme con ayuda de un hisopo estéril.

Determinación de las concentraciones estándar:

Una vez que se enfría el agar, se realizan 2 hileras de 10 pozos a lo largo de todo el refractario, utilizando un sacabocados metálico y estéril. En cada pozo se introducen 100 μL de solución estándar, cuya concentración ya se conoce.

Procesamiento de los sueros:

Se preparan placas de agar siguiendo el mismo método que se utiliza para los estándares. Se realizan los pozos a lo largo de toda la placa y se introducen 100 μL de la muestra de plasma. Se identifica cada uno de los pozos, para conocer el individuo y el grupo al que pertenece cada muestra depositada. La placa se incuba durante 24 horas,

a una temperatura de 37°C - 38°C. Posteriormente se mide el diámetro de cada halo de inhibición con un calibrador electrónico.

El análisis de los datos obtenidos en milímetros de diámetro, se lleva a cabo mediante la extrapolación de los mismos a una gráfica de concentración plasmática vs tiempo. Utilizando las concentraciones conocidas de los estándares realizados, se obtuvieron las concentraciones plasmáticas correspondientes a cada halo de inhibición, y por lo tanto, a cada muestra de plasma.

El porcentaje de recuperación alcanzado con esta técnica fue de $98 \pm 2.5\%$. La medición de los halos de inhibición se llevó a cabo con un calibrador electrónico. El límite de cuantificación fue de $0.07 \mu\text{g/mL}$, el cual corresponde a 9.9 mm de diámetro del halo de inhibición. Este valor corresponde al límite inferior de la línea de calibración, con un coeficiente de correlación de la solución estándar de amoxicilina/ácido clavulánico (4:1) de 0.98, calculado con regresión lineal por medio del software Originⁱ Pro 8.0. Los coeficientes de variación intra- ensayo e inter-ensayo fueron de 5 y 6% respectivamente.

El análisis farmacocinético se llevó a cabo como un modelo no compartamental, utilizando el software WinNonlinⁱⁱ. Las variables farmacocinéticas determinadas fueron: Área bajo la curva concentración vs tiempo (AUC), Tiempo de residencia media (MRT); Concentración plasmática máxima (C_{max}), Tiempo para alcanzar la C_{max} (t_{max}) y Biodisponibilidad relativa (Fr).

ⁱ OriginLab Corporation One Roundhouse Plaza Northampton, MA 01060 USA.

ⁱⁱ Pharsight Corporation, 321 E. Evelyn Ave 3rd Floor Mountain View, Ca 94041.

El análisis estadístico de las variables farmacocinéticas se realizó con un Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Bonferroni-t, utilizando el programa JMPⁱⁱⁱ con una probabilidad establecida en $P < 0.05$. Los límites de Bioequivalencia, según las especificaciones de organismos internacionales especifican que una formulación farmacéutica se considera bioequivalente cuando, bajo las mismas condiciones biológicas controladas experimentalmente, las concentraciones plasmáticas *vs* tiempo arrojan valores de C_{max} y AUC estadísticamente indistinguibles de los del preparado de referencia (0.8 a 1.25) (Riviere 1994).

6.2. Fase 2: Definición del proyecto de formulación.

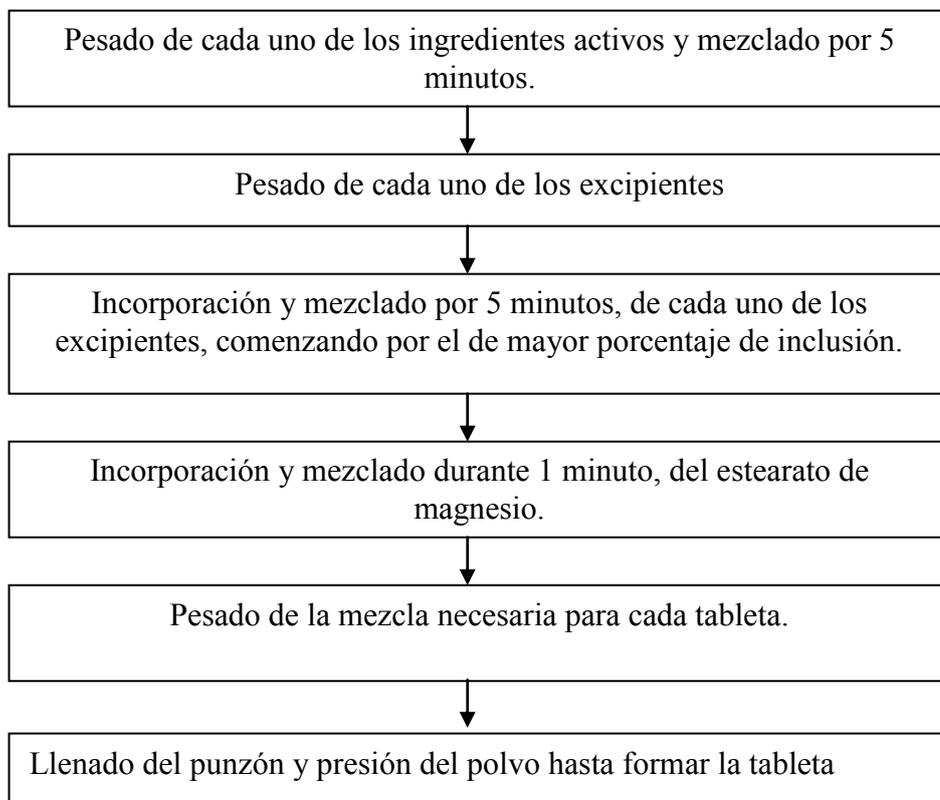
Se llevaron a cabo estudios bibliográficos sobre las características de los diferentes excipientes utilizados para lograr una liberación retardada de fármacos. Tomando en cuenta las características de absorción del principio activo, se eligieron los excipientes en el porcentaje de inclusión como se indican en el cuadro 1.

La formulación a desarrollar se definió como un preparado sólido oral en forma de tableta de amoxicilina/ácido clavulánico en una proporción 4:1 respectivamente, fabricado por compresión directa, con un diámetro aproximado de 7-10 mm, cuya composición baste para dosificar perros de 15 kg en promedio a una dosis de 12.5 mg/kg de amoxicilina-ácido clavulánico y que permitiera su redosificación después de 12 horas como mínimo, después de la primera dosis.

ⁱⁱⁱ JMP Statistic Mode Visual 1989-1995 SAS Institute Inc. Version 3.1.6.2, SAS Campus Drive Cary, N.C. 27513

6.3. Fase 3: Formulación del Preparado Farmacéutico

El proceso de fabricación que se utilizó para las tabletas fue de la siguiente manera:



Las formulaciones experimentales se muestran en el cuadro 2. El proceso de tableteado se llevó a cabo en una tableteadora manual, con un punzón de 6 mm de diámetro. Esta tableteadora tiene la capacidad de medir con exactitud la fuerza de compresión a la que se elabora cada tableta, de esta manera se tiene control de la dureza que tendrá cada una de ellas, además de poder establecer las variables exactas y dar reproducibilidad a la elaboración.

Se realizaron variaciones en cuanto a:

1. Peso de la tableta. Siguiendo los porcentajes ya establecidos, se realizaron cálculos para obtener tabletas de 500, 600 y 700 mg con el fin de obtener el tamaño ideal con el punzón de 6 mm. Se pesaron las tabletas antes y después de

ser compactadas por medio de una báscula analítica, mientras que el grosor se midió con un calibrador electrónico.

2. Fuerza de compresión. Se probó con 1 y 2 libras de presión/ pulgada cuadrada para determinar la dureza que se obtiene con cada una de ellas y por lo tanto su perfil de desintegración. La dureza se determinó por medio de un durómetro y se observó el tiempo de desintegración dentro de un disolutor digital para una sola muestra, con indicador de velocidad y temperatura (La'Sany internacional[®]) de acuerdo a la USP, con 350 mL de solución de agua destilada y ácido clorhídrico 1N a un pH de 2.5 y temperatura de 37.5°C. Se utilizó una velocidad de agitación de 50 rpm según lo establecido en la USP.

El cuadro 3 muestra las formulaciones elegidas para ser evaluadas *in vivo*.

6.4. Fase 4: Determinación de las variables farmacocinéticas de 2 formulaciones experimentales en perros.

Al igual que en la fase 1 de Bioequivalencia, se realizó el análisis farmacocinético después de administrar una dosis oral (PO) de 12.5 mg/kg de amoxicilina y clavulanato de potasio en perros adultos en un modelo cruzado (6 x 6). Se utilizaron doce perros machos de distintas razas, clínicamente sanos. El peso de los perros fue de 18.2 ± 3.8 kg.

Los perros se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* hasta 12 horas antes del estudio. Se dividieron en 2 grupos de forma aleatoria (Grupo 1: Preparado experimental 2; Grupo 2: Preparado 3). Cada perro se pesó y se fabricó una tableta con la dosis exacta para cada uno de ellos. La tableta se administró dentro de un trozo de aproximadamente 2 x 2 cm de salchicha de cerdo comercial y se verificó que todos los

perros la tragaran. El procedimiento que se utilizó para el muestreo, así como los análisis para la obtención de las variables farmacocinéticas fueron los mismos descritos en la fase de la bioequivalencia.

7. Resultados

7.1. Bioequivalencia

En la figura 11 se representa el promedio de las concentraciones plasmáticas de la fracción activa de la combinación AMX/PC *vs.* tiempo, obtenidas después de la administración de 12.5 mg/kg de AMX y PC, a partir del preparado de referencia y de un preparado genérico. La figura 12 muestra la curva de regresión estándar de la actividad antibacteriana de amoxicilina mediante el método de difusión en agar descrita por Bennet (1966).

El cuadro 4 detalla los promedios \pm 1 desviación estándar de las variables farmacocinéticas obtenidas, así como las diferencias estadísticamente significativas entre las variables. Los perfiles plasmáticos de las formulaciones de AMX/PC administradas por vía oral muestran los niveles máximos de la combinación activa después de 4 y 2.9 horas en la formulación genérica y la de referencia respectivamente. Sin embargo, después de la C_{max} en el preparado genérico se observa un declive muy pronunciado de las concentraciones plasmáticas, mientras que en el preparado de referencia la pendiente es mucho menos acentuada.

Las áreas bajo la curva concentración plasmática *vs.* tiempo difieren estadísticamente ($P < 0.05$) entre ambos preparados, siendo significativamente mayor el valor de la formulación de referencia ($AUC = 13.28 \mu\text{g/mL/h}$) contra el valor obtenido con el producto genérico ($AUC = 9.08 \mu\text{g/mL/h}$).

7.2. Propiedades de las tabletas

Del primer ensayo de fabricación de tabletas, se muestran en el cuadro 5 las variables de peso, grosor y resistencia a la ruptura de cada formulación (dureza) de las 3

formulaciones, tableteadas con un punzón de 10 mm de diámetro y una fuerza de 2 L de presión.

En cuanto a la fuerza de compactación, se probó con 2 variables para determinar el valor más adecuado para obtener el perfil de desintegración esperado.

7.3. Elaboración de tabletas

En el segundo ensayo de fabricación de tabletas, se elaboraron tabletas de 600 mg y se midió el grosor obtenido, así como la dureza y el tiempo de desintegración de cada una. Las variables obtenidas se muestran en el cuadro 6. Finalmente se seleccionaron las formulaciones 2 y 3, con una fuerza de compactación de 1 L por presentar un tiempo mayor de desintegración de la tableta, y en el caso de la tableta 3 porque presentó características de expansión y flotación notables.

7.4. Determinación de las concentraciones plasmáticas de los preparados 2 y 3

En la figura 13 se representa el promedio de las concentraciones plasmáticas de la fracción activa de la combinación AMX/PC vs tiempo, obtenidas después de la administración de los preparados 2 y 3, con una dosis de 12.5 mg/kg de AMX-PC. En el cuadro 7 se muestran los promedios y diferencias estadísticas ($P < 0.05$) de las variables farmacocinéticas obtenidas con cada uno de los preparados.

8. Discusión

Se ha establecido que el método microbiológico de difusión en agar utilizado para determinar las concentraciones plasmáticas de la combinación AMX/PC activa es confiable si las muestras se mantienen congeladas en nitrógeno líquido y son procesadas en un periodo no mayor a 4 semanas (Matar, 2006). No obstante es evidente que los valores numéricos obtenidos en este estudio pueden diferir de otros análisis donde se utilizaron métodos cromatográficos, que miden independientemente cada fármaco. En el presente trabajo la acción antimicrobiana del compuesto de amoxicilina-ácido clavulánico se determinó por su potencia antimicrobiana y se convirtió en términos de concentración y de la actividad conjunta con el clavulanato de potasio. Dado que es una sinergia, se sobrestiman las concentraciones plasmáticas reales de la amoxicilina. Sin embargo, debido a que este método únicamente cuantifica la fracción activa o fracciones del fármaco, o de la combinación de fármacos, revela una imagen clara de las propiedades antibacterianas de la combinación dentro del contexto de su perfil PK/PD conjunto. Tomando en cuenta esto, y el hecho de que los valores obtenidos de la variación intra e inter-ensayo fueron notablemente bajos, puede afirmarse que los resultados obtenidos son confiables. Basándose en esta aseveración y en los criterios estadísticos regulatorios para determinar si existe bioequivalenciaⁱ entre dos formulaciones farmacéuticas (Steinijans *et al.*, 1992, Riviere, 1994), es factible indicar que los preparados aquí evaluados, no son bioequivalentes, por lo que la primera hipótesis de este trabajo no es rechazada. Esto representa un resultado de gran importancia desde el punto de vista de farmacovigilancia, y un hallazgo potencialmente

ⁱ Se entiende por bioequivalencia la ausencia de diferencia significativa en la velocidad y cantidad de moléculas activas de equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas que se disponen en el sitio de acción cuando son administradas en la misma dosis y bajo iguales condiciones dentro de un estudio diseñado en forma apropiada: U.S. Department of Health and Human Services, FDA (CVM). November, 2006

útil para los clínicos de pequeñas especies, quienes podrían correlacionar sus datos clínicos con los farmacológicos.

Los valores promedio de AUC y C_{\max} de la formulación genérica fueron 31.6% más bajos y 52.9% más altos que los valores correspondientes al preparado de referencia (13.28 $\mu\text{g}^*\text{h/mL}$ y 2.9 $\mu\text{g/mL}$ y 9.08 $\mu\text{g}^*\text{h/mL}$ y 5.48 $\mu\text{g/mL}$ para el preparado de referencia y el genérico respectivamente). Esas diferencias pueden ser explicadas con base a algunas especulaciones:

Como ocurre con todos los antibióticos, el comportamiento farmacocinético de la amoxicilina y los factores que modulan su perfil de concentración *vs* tiempo, cobran importancia si se requiere una eficacia clínica máxima. En tales circunstancias se debe cumplir con su relación PK/PD. Esto es, el compuesto activo de amoxicilina-ácido clavulánico debe mantener sus concentraciones plasmáticas por encima de la CMI, por lo menos el 70% del intervalo de dosificación (Craig, 1998). Tomando en cuenta la rápida vida de eliminación tan rápida de estos fármacos en las formulaciones convencionales, es poco lo que dura en plasma el fármaco en concentraciones útiles. Arancibia (1980) en humanos, y Marier (2001) y Vree (2003) en perros, encontraron que la amoxicilina tiene una vida media de eliminación ($T_{1/2\beta}$) de aproximadamente 1 hora. En este estudio, la $T_{1/2\beta}$ de los preparados que se estudiaron fueron de 0.15 h para el genérico y 1.12 h para el de referencia. En humanos y otras especies domésticas, la absorción de la amoxicilina parece estar limitada a los primeros segmentos del tubo gastrointestinal (Kerc y Opara, 2007), por lo que las formulaciones de amoxicilina trihidratada-clavulanato de potasio deben ser capaces de liberar los principios activos en las partes proximales del tubo gastrointestinal sin ser desplazados a las partes distales por los movimientos peristálticos. De este modo, la absorción se llevará a cabo en el

estómago y en el duodeno principalmente, antes de que la formulación llegue a los segmentos distales, donde se ha demostrado que prácticamente no existe absorción (Kerc and Opara 2007). Sin embargo, si el total del antibiótico es liberado hacia el duodeno en un solo tiempo, el pH alcalino de ese medio puede inactivar la mayor parte de la amoxicilina disponible (Zia *et al.*, 1977).

Westphal (1991) presentó evidencia de transportadores proteínicos específicos para la absorción de la amoxicilina. Estas estructuras, denominadas PepT1, trabajan como una bomba de transporte saturable, y se ha demostrado que se expresan en el borde de cepillo de los enterocitos en el intestino delgado (Li *et al.*, 2006).

Ya que el tiempo de residencia en el tubo digestivo de la amoxicilina depende en gran medida de la actividad gastrointestinal, cabe mencionar que la velocidad de tránsito del alimento a través del estómago puede reducir la absorción de la amoxicilina a partir de formulaciones de liberación prolongada. Se ha demostrado que bajo condiciones de ayuno, las preparaciones de AMX/PC son barridas del estómago mucho más rápido que al inicio de ingerir alimentos ricos en carbohidratos (Weitschies *et al.*, 2008). Considerando las características especiales de absorción de la amoxicilina y el ácido clavulánico en el tubo gastrointestinal, la interacción de los fármacos con vehículos adecuados es esencial para obtener formulaciones con capacidades gastro-retentivas mayores, que logren liberar pequeñas fracciones de los principios activos de forma prolongada para ser absorbidos al estómago y duodeno (Kerc y Opara, 2007). De tal suerte que el diseño de una tableta que brinde perfiles farmacocinéticos más acordes con la farmacodinamia de esta combinación (PK/PD), no es tarea únicamente de liberación constante durante el trayecto del preparado por el TGI. De hecho, idealmente el preparado debe ser retenido en el estómago sin causar problemas de irritación y

liberar durante el mayor tiempo posible aliquotas constantes de los principios para su absorción duodenal.

Por otro lado, si se establece una CMI para organismos susceptibles de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, basada en estudios reportados (NCCLS, 2002) para cepas bacterianas patógenas causantes de infecciones respiratorias y cutáneas en perros (Ganiere *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2007); entonces la concentración mínima efectiva (CME) de 2 veces el valor para la amoxicilina será de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De forma ideal, esta CME debería de mantenerse por lo menos durante el 70% del intervalo de dosificación. Bajo tal perspectiva, la formulación genérica necesitaría ser administrada tres veces al día, mientras que la preparación de la referencia se podría administrar cada 12 horas. Sin embargo, para tratar microorganismos menos susceptibles, se requieren concentraciones plasmáticas más altas para cumplir con la relación óptima PK/PD. Para esos casos los resultados obtenidos sugieren que la simple estrategia de incrementar la dosis no es suficiente para lograr las concentraciones requeridas, dado que estos fármacos son de cinética de primer orden y por la limitante ya mencionada de ser absorbidos del duodeno casi exclusivamente. La formulación genérica puede proporcionar tales concentraciones si se administra tres veces al día.

Por lo tanto, es importante hacer hincapié en que la ausencia de bioequivalencia entre una preparación genérica y la de referencia, no necesariamente significa que no sea efectiva, pero la dosificación del preparado genérico deberá ajustarse hasta lograr una relación PK/PD apropiada.

En el proceso de diseño de un preparado innovador, el primer ensayo de fabricación de las tabletas se llevó a cabo para determinar el peso ideal para el punzón

que se utilizó, así como para visualizar la forma que tendría el producto final. Se observó que el peso de la tableta fue directamente proporcional al grosor de las mismas.

En el caso de tabletas con grosor menor a 2 cm, la dureza fue menor a 1 N. Estas tabletas fueron muy friables muy friables, por lo que su manejo se dificultó y se desecharon de la prueba. Por otro lado, las tabletas con un grosor de 4-6 mm presentaron una dureza de 8-12 N y resultaron más fáciles de manipular.

Para elegir la fuerza de compactación de las formulaciones innovadoras, se tableteó utilizando 1 y 2 libras de presiónⁱⁱ (70.36 y 140.72 kg fuerza/cm²) para cada formulación, obteniendo tabletas de 4.5 mm de grosor en promedio. Las tabletas que se fabricaron utilizando 1 libra de presión, presentaron una dureza de 8-10 N, mientras que las que se tabletearon a 2 libras de presión, oscilaron entre 11 y 12 N. Esta diferencia en la dureza se vio reflejada en el tiempo de desintegración estimado visualmente. La formulación 1, con fuerza de compresión de 1 y 2 libras, tuvo un tiempo promedio de desintegración de 15 y 18 minutos respectivamente. La formulación 2 elaborada a 1 libra de presión tuvo un tiempo de desintegración de 35 minutos y a 2 libras tardó 25 minutos en desintegrarse. La formulación 3 tuvo un tiempo de desintegración de 45 minutos y más de 23 horas, fabricada a 1 y 2 libras de presión respectivamente.

El perfil de disolución de cada formulación no se llevó a cabo debido a que la solución descrita por la USP para llevar a cabo la prueba, al ser probada en las placas de agar con el microorganismo de referencia, produjo halos de inhibición de diámetros variables que probablemente interferirían con la medición de la actividad de las concentraciones de los principios activos. De tal suerte no se evaluó la correlación entre el perfil de disolución y la farmacocinética de las formulaciones, sin embargo se

ⁱⁱ Por pulgada cuadrada.

eligieron las formulaciones 2 y 3 tomando en cuenta la fisiología del estómago, donde las partículas más pequeñas son fácilmente licuadas y arrastradas al antro pilórico para ser evacuadas a los siguientes segmentos del TGI. De hecho se sabe que por el antro pilórico pueden pasar partículas hasta de 13 mm y esta calidad retentiva no sería de mucha utilidad. (Guyton, 2006). Entonces, los datos bibliográficos sugirieron que la inclusión en los vehículos gastroretentivos podría mejorar el diseño de las tabletas de AMX/PC.

Respecto a la farmacocinética de los preparados experimentales, el perfil que arrojó el preparado 2 fue superior en cuanto a T_{max} (1 hora). Sin embargo, a pesar de que las concentraciones que mantuvo fueron prolongadas, no logró superar las 8 horas por encima de la CME que se estableció como referencia anteriormente. El preparado 3 no mostró un pico en las concentraciones plasmáticas, sin embargo, logró mantener éstas por encima de la CME durante 3 horas más que el preparado de referencia. La curva PK que presenta, hace evidente una liberación prolongada, logrando concentraciones más uniformes que cualquiera de los otros preparados. Considerando lo antes mencionado, se concluye que para maximizar la eficacia de un β -lactámico como es la amoxicilina, el preparado 3 logra concentraciones 2-4 veces la CMI, durante más de 10 horas (75% del intervalo de dosificación de 12 horas), lo que lo hace apto para ser administrado 2 veces al día para tratar patógenos cuya CMI se encuentre en un rango de 0.25-0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (susceptibles e intermedios) (Papich, 2002).

Desde el punto de vista clínico, se sabe que si un β -lactámico logra concentraciones 2 veces superiores por solo el 50% del ID, la eficacia clínica será de aproximadamente 70% en el mejor de los casos, y que se acerca al 100% de eficacia cuando se mantiene durante el 80% o más, del ID (Craig, 1998).

En este sentido, la tableta experimental 3 es susceptible de lograr valores de eficacia clínica muy cercanos al 100% para la mayoría de las infecciones cutáneas y respiratorias en perros (Ganiere *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2007). Sin embargo, cabe señalar la necesidad de realizar estudios clínicos comparativos de las formulaciones aquí estudiadas para determinar la correlación entre su efectividad *in vivo* y la relación PK/PD apropiada de esta combinación de fármacos. Conjuntamente, se requiere determinar las pruebas reológicas necesarias para poder establecer las características fisicoquímicas de cada preparado, así como la identificación de efectos colaterales que pudiera provocar la presencia prolongada de los fármacos en el TGI, datos que son indispensables para el registro y fabricación comercial de cualquier medicamento.

Finalmente se sugiere llevar a cabo la determinación de las variables farmacocinéticas del preparado experimental 3 en un estudio cruzado, bajo condiciones de ayuno y con la ingestión de alimentos después de la administración oral del preparado, con la finalidad de establecer el efecto que tiene la presencia de alimento sobre la permanencia del preparado dentro del TGI, especialmente dentro del estómago, como lo señala Weitschies *et al.* (2008). Una vez que se establezcan las características de este preparado, se podría continuar con un diseño más eficaz, que mantuviera concentraciones plasmáticas clínicamente activas durante un periodo más prolongado, incluso de 24 horas, lo que significaría una importante aportación al mercado farmacéutico.

9. Cuadros y Figuras

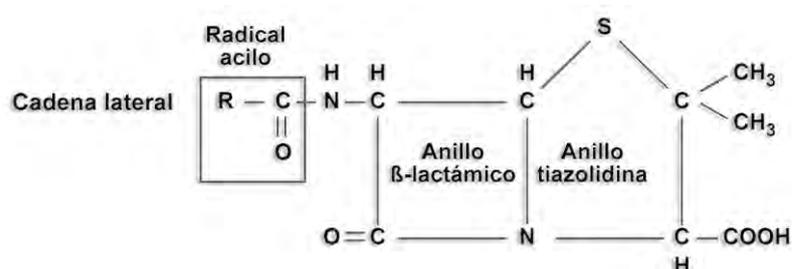


Figura 1. Estructura general de las penicilinas.

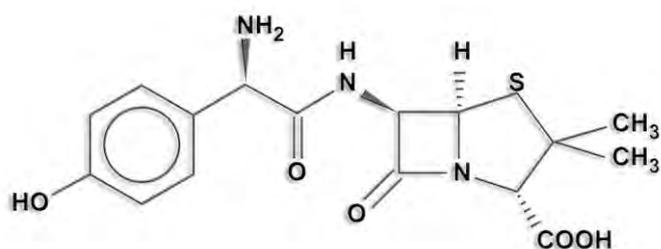


Figura 2. Estructura de la amoxicilina.

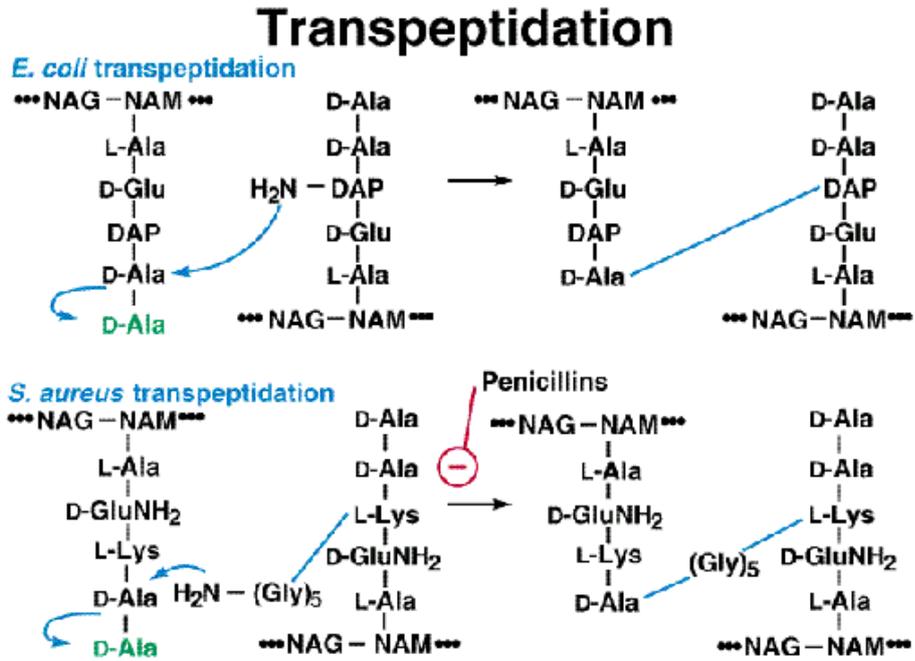


Figura 3. Fase de transpeptidación en el proceso de síntesis de mureína de bacterias *E. coli* y *S. aureus*. Los antibióticos β -lactámicos como penicilinas inhiben la síntesis de pared celular por bloqueo del entrecruzamiento entre cadenas de peptidoglicano.

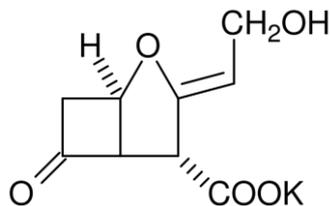


Figura 4. Estructura del ácido clavulánico.

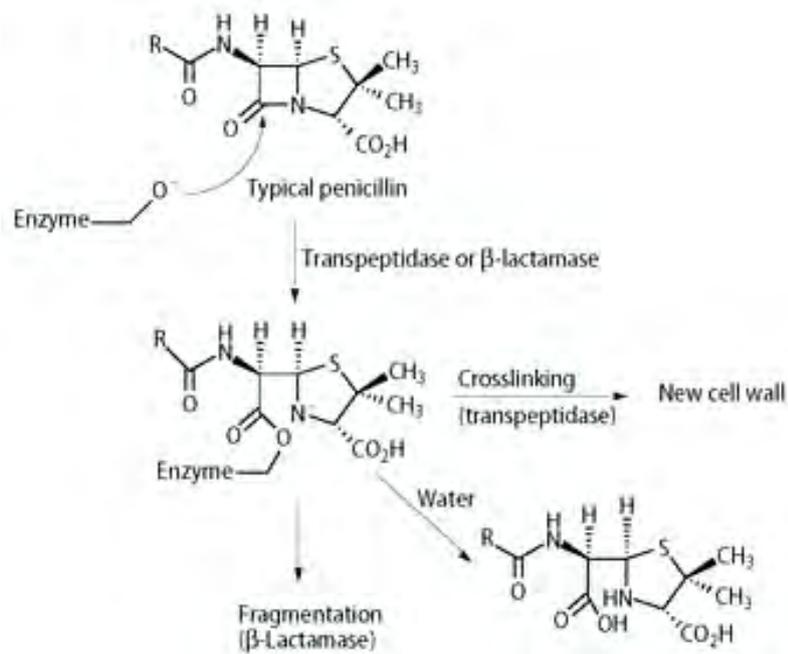


Figura 5. Representación de la forma en que afecta el anillo β -lactámico de una penicilina por acción de una enzima bacteriana β -lactamasa.

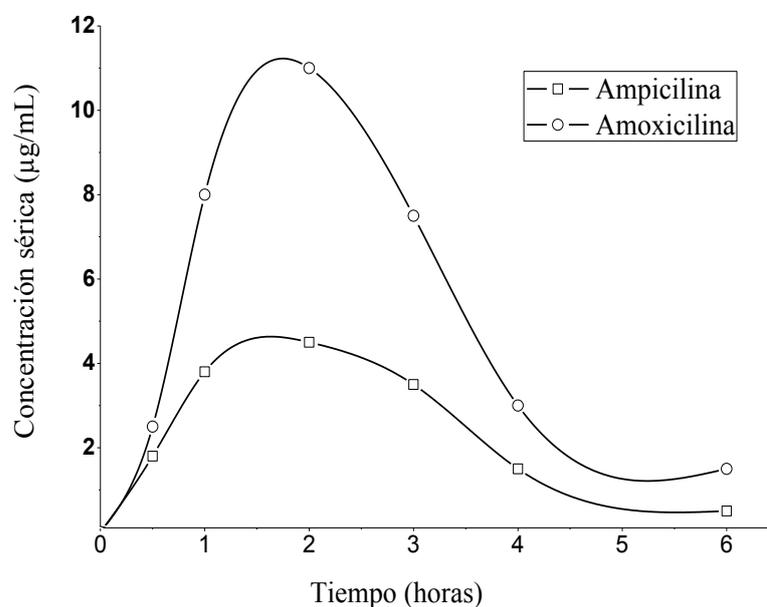


Figura 6. Concentraciones séricas de amoxicilina y ampicilina en humanos después de una dosis de 500 mg para ambos fármacos (Adaptada de Sutherland, 1972)

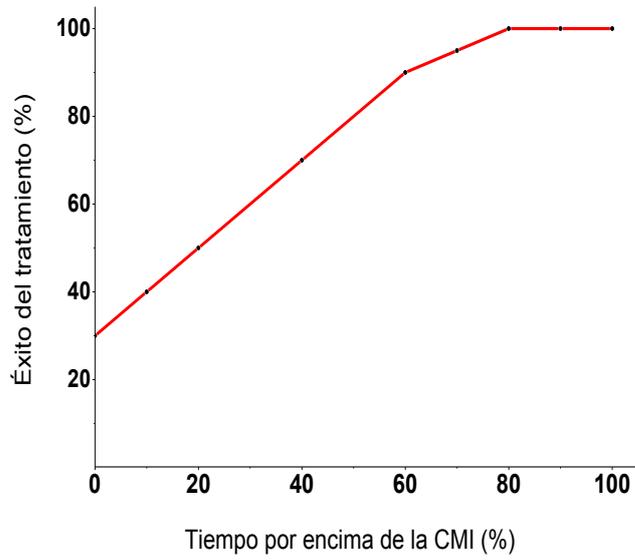


Figura 7. Relación entre el porcentaje de eficacia para el tratamiento de estreptococosis y el tiempo en el cual las concentraciones plasmáticas están por arriba o a nivel de la CMI en términos porcentuales con respecto al intervalo de dosificación (Craig, 1998).

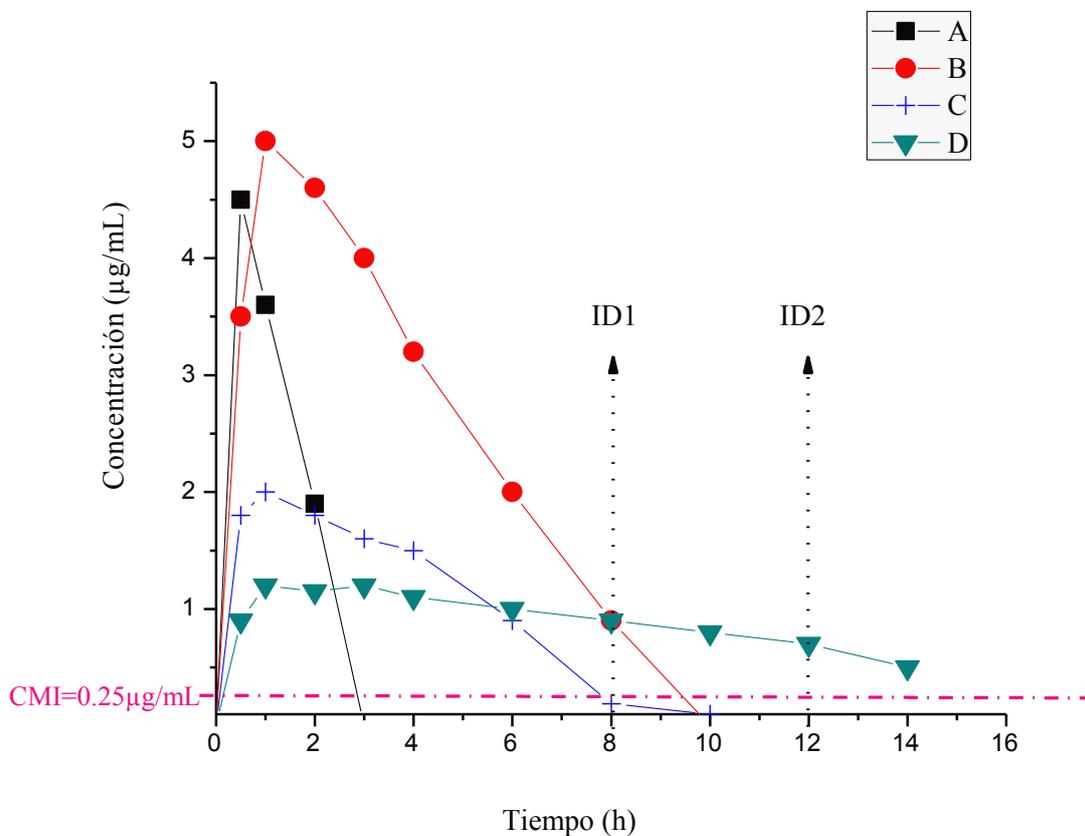


Figura 8. Representación gráfica de la concentración plasmática hipotética de varios fármacos β -lactámicos. Dada la CMI señalada, el mejor efecto puede lograrse con los perfiles B y D para el intervalo de dosificación 1 (ID1) y para ID2, el mejor fármaco para el ID2 sería el preparado D. *A= fármaco de C_{max} elevada pero $T_{1/2\beta}$ corta; B= fármaco de C_{max} elevada y $T_{1/2\beta}$ prolongada; C= fármaco de C_{max} baja y $T_{1/2\beta}$ prolongada; D= fármaco de C_{max} baja y $T_{1/2\beta}$ tipo cinética de absorción de orden cero de un preparado farmacéutico de larga acción.

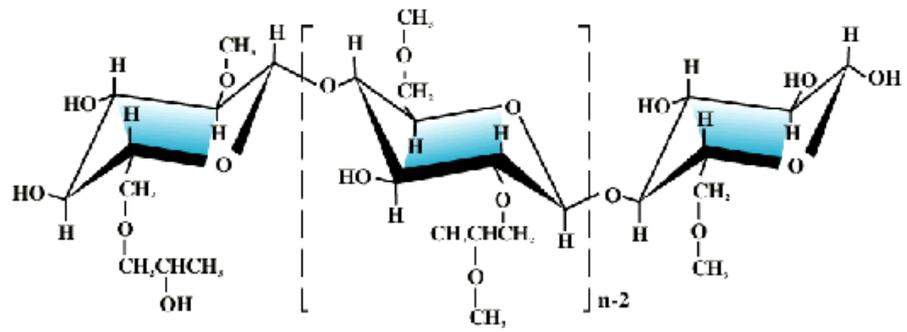


Figura 9. Estructura de la hidroxipropilmetil celulosa (HPMC)

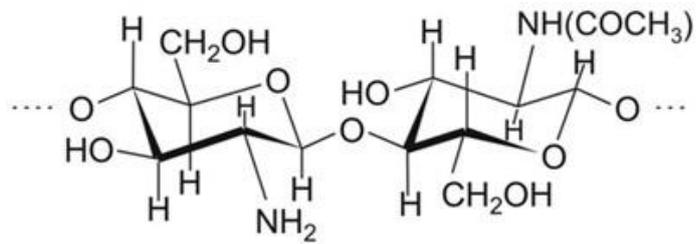


Figura 10. Estructura del chitosan

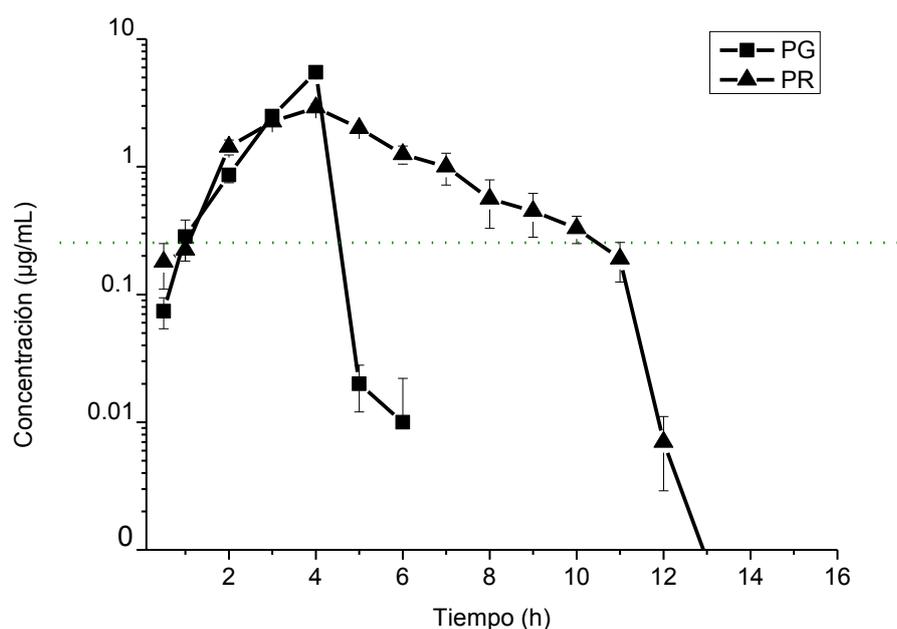


Figura 11. Promedio \pm 1 desviación estándar del perfil de la concentración plasmática vs tiempo de la composición actividad antibacteriana/concentración plasmática de amoxicilina-ácido clavulánico por medio del análisis no compartamental, después de administrar vía oral 12.5 mg/kg de la combinación a partir de 2 preparaciones comerciales (Preparación Genérica: PG; Preparado de referencia: PR)

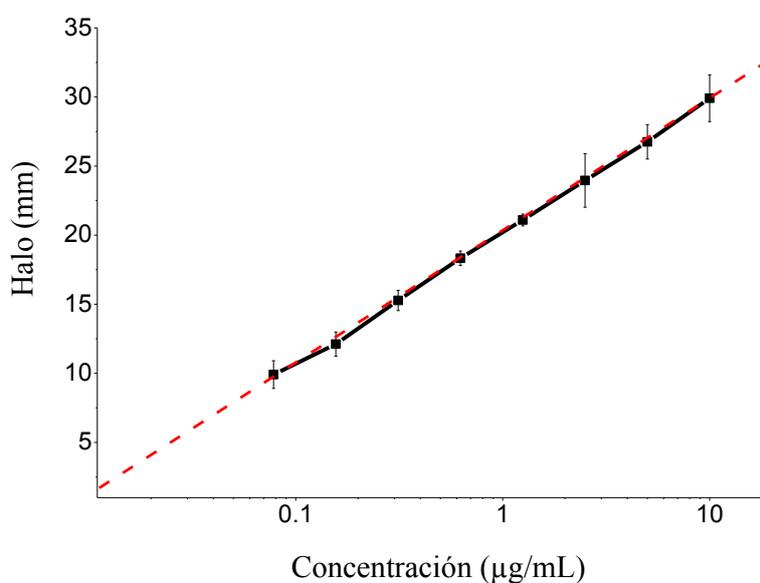


Figura 12. Curva de regresión del estándar de la actividad antibacteriana de amoxicilina mediante el método de difusión en agar descrita por Bennet (1966).

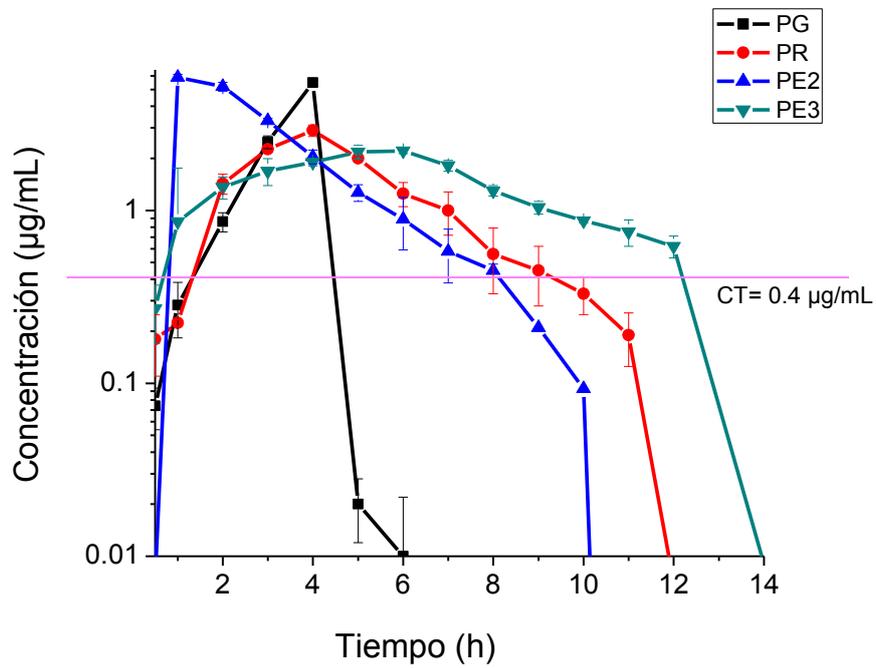


Figura 13. Promedio \pm 1 desviación estándar del perfil de la concentración plasmática vs tiempo de la composición actividad antibacteriana/concentración plasmática de amoxicilina-ácido clavulánico, después de administrar vía oral 12.5 mg/kg de amoxicilina a partir de 4 preparaciones comerciales (Preparación Genérica: PG; Preparado de referencia: PR, Preparación experimental 2: PE2, Preparación experimental 3: PE3)

Cuadro 1. Excipientes elegidos y su porcentaje de inclusión considerado para formulaciones orales.

EXCIPIENTE	CARACTERÍSTICA QUE APORTA	INCLUSIÓN
Hipromelosa	Rápida hidratación, expansibilidad, flotabilidad, mucoadhesión	10-50%
Chitosan	Promotor de la absorción, mucoadhesión	5-20%
Celulosa microcristalina	Compactibilidad	30-60%
Estereato de magnesio	Lubricación	0.2-1%

Cuadro 2. Formulaciones experimentales desarrolladas como tableta en un aparato manual con punzón de 6 mm.

Composición (%)	Formulación		
	1	2	3
Amoxicilina trihidratada	28.5	62.5	67.5
Clavulanato de K	7.14	16.6	18
Chitosan 90%	20	---	2.4
HPMC K4M	-	5.7	9.4
Avicel	44.36	20	---
Estereato de magnesio	1	0.2	0.2
Total 100%	100	100	100

Cuadro 3. Formulaciones elegidas para ser evaluadas *in vivo*.

Composición (mg)	Formulación	
	2	3
Amoxicilina trihidratada	437.5	472.5
Clavulanato de K	116.2	136
Chitosan 90%	70	24.3
Hidroxipropil metilcelulosa K4M	44.9	65.8
Celulosa microcristalina	30	---
Estereato de magnesio	1.4	1.4
Total	700	700

Cuadro 4. Promedio de las medias de las variables farmacocinéticas calculadas por la composición actividad antibacteriana/concentración plasmática de amoxicilina-ácido clavulánico por medio del análisis no compartamental, después de administrar vía oral 12.5 mg/kg de amoxicilina a partir de 2 preparaciones comerciales (Preparación Genérica: GP; Preparado de referencia: RP)

VARIABLE	FORMULACIONES COMERCIALES DE AMOXICILINA-CLAVULANATO DE POTASIO	
	RP	GP
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	13.28 ± 0.34^a	9.08 ± 0.26^b
MRT (h)	4.82 ± 0.07^a	3.45 ± 0.24^b
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	2.90 ± 0.17^a	5.48 ± 0.21^b
T_{max} (h)	4.0 ± 0.03^a	4.0 ± 0.13^a
Fr (%) [*]	68.44	

^{a, b} Valores dentro de una misma fila con diferente exponencial difieren significativamente ($P < 0.05$).

AUC= Área bajo la curva concentración plasmática vs tiempo; MRT = Tiempo de residencia media; C_{max} = Concentración plasmática máxima calculada; T_{max} = Tiempo para alcanzar la concentración máxima; Fr = Biodisponibilidad relativa.

Cuadro 5. Variables de peso, grosor y resistencia a la compresión de cada formulación (dureza) de las 3 formulaciones, tableteadas con un punzón de 10 mm de diámetro y una fuerza de 2 libras de presión, obtenidas del primer ensayo de fabricación.

FORMULACIÓN	Peso de tableta (mg)	Grosor (mm)	Dureza (N)
1	500	1.3	< 1
	600	4	8
	700	6	>12
2	500	1.5	<1
	600	4	9
	700	6	11
3	500	1.5	<1
	600	4	10
	700	6	>12

Cuadro 6. Variables obtenidas del segundo ensayo de fabricación de tabletas.

FORMULACIÓN	Grosor (mm)	Fuerza de compactación (L/pulg²)	Dureza (N)	Tiempo de desintegración (min)
1	4.5	1	8-10	15
		2	11-12	18
2	4.5	1	8-10	35
		2	11-12	25
3	5	1	9-10	45
		2	>12	>1400

Cuadro 7. Promedio de las medias de las variables farmacocinéticas calculadas por la composición actividad antibacteriana/concentración plasmática de amoxicilina-ácido clavulánico por medio del análisis no compartamental, después de administrar vía oral 12.5 mg/kg de la combinación de fármacos, a partir de 2 preparaciones experimentales (PE2 y PE3)

VARIABLE	FORMULACIONES COMERCIALES DE AMOXICILINA-CLAVULANATO DE POTASIO	
	PE2	PE3
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	$18.45 \pm 0.32^{\text{a}}$	$16.83 \pm 0.19^{\text{b}}$
MRT (h)	$2.98 \pm 0.19^{\text{a}}$	$5.99 \pm 0.31^{\text{b}}$
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	$5.89 \pm 0.11^{\text{a}}$	$2.22 \pm 0.09^{\text{b}}$
T_{max} (h)	$1.0 \pm 0.23^{\text{a}}$	$6.0 \pm 0.25^{\text{b}}$

^{a, b} Valores dentro de una misma fila con diferente exponencial difieren significativamente ($P < 0.05$).

AUC= Área bajo la curva concentración plasmática vs tiempo; MRT = Tiempo de residencia media; C_{max} = Concentración plasmática máxima calculada; T_{max} = Tiempo para alcanzar la concentración máxima

10. Referencias

1. Arancibia, A., Guttman, J., González, G., González, C. (1980) Absorption and disposition kinetics of amoxicillin in normal human subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 17, 199–202.
2. Baggaley, K.H., Brown, A.G., Schofield, C.J. (1997) Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. *Nat. Prod. Rep.* 14: 309-333.
3. Barr, W.H., Zola, E.M., Candler, E.L., Hwang, S.M., Tendolkar, A.V., Shamburek, R., Parker, B., Hilty, M.D. (1994) Differential absorption of amoxicillin from the human small and large intestine. *Clinical Pharmacology Therapeutics* 56, 279-285.
4. Barza, M., Cuchural, G. (1985) General principles of antibiotic tissue penetration. *J. Antimicrob. Chemotherapy.* 15:59-75.
5. Bennett, J.V., Brodie, J.L., Brenner, E.J., Kirby, J. (1966) Simplified accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Applied Microbiol* 14, 170 – 177.
6. Bernad Bernad, María Josefa (2010) Comunicación personal.
7. Brook, I. (1989) Inoculum effect. *Rev Infect Dis.* 11:361-368.
8. Burns, J. (1995). Mechanisms of bacterial resistance. *Pediatric clinics of NorthAmerica* 42, 497-507.
9. Chatelet, C., Damour, O., Domard, A. (2001) Influence of degree acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials.* 22:261-268.
10. Chun, M., Sah, H., Choi, H. (2005) Preparation of mucoadhesive microspheres containing antimicrobial agents for eradication of *H. pylori*. *Int. J. Pharm.* 279:172-179.
11. Clausen, A.E., Bempok-Schnurch, A. (2001) Direct compressible polymethacrylic acid-starch compositions for site-specific drug delivery. *J Control Release.* 75: 93-102.
12. Coulthurst, S.J., Barnard, A.M.L., Salmond, G.P.C. (2005) Regulation and Biosynthesis of carbapenem antibiotics in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:295-306.
13. Craig, W. A. (1998) Pharmacokinetic/ Pharmacodynamic parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases* 26, 1-12.

14. Craig, W.A. (2003) Basic pharmacodynamics of antimicrobials with clinical applications to the use of β -lactams, glycopeptides and linezolid. *Infectious Disease Clinics of North America*. 17:479-502.
15. Datta, N., Kontomichalou, P. (1968) Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*. 208: 239-241.
16. Efentakis, M., Vlachou, M., Choulis, N.H. 1997 Effects Of Excipients On Swelling And Drug Release From Compressed Matrices. *Drug Development And Industrial Pharmacy* 23: 107-112.
17. Elander, R.P. (2003) Industrial production of β -lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 385-392.
18. Finlay, J., Miller, L., Poupard, J.A. (2003) A review of the antimicrobial activity of clavulanate. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 18-23.
19. Francis, M.E., Marshall, A.B., Turner, W.T. (1978) Amoxicillin: clinical trials in dogs and cats. *Veterinary Records* 102, 377-380.
20. Ganiere, J.P., Medaille, C., Mangion, C. (2005) Antimicrobial Drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* Clinical Isolates from canine Pyoderma. *Journal of Veterinary Medicine* 52, 25-31.
21. George, M., Frass, I.V., Robinson, J.R. (1978) Sustained and controlled release drug delivery systems. Marcel Dekker: New York; pp. 124-127.
22. Goren, E., Jong, Wa., Doomenbal, P., Laurence, T. (1988) Therapeutical Efficacy Of Doxycycline Hyclate In Experimental E.Coli Infection In Broilers. *The Veterinary Quarterly* 10:48-53.
23. Hilton, A.K., Deasy, P.B. (1992) In vitro and in vivo evaluation of an oral sustained-release floating dosage form of amoxicillin trihydrate. *Int. J. Pharm.* 86: 79-88.
24. Hoffman, A., Stepensky, D. (1999) Pharmacodynamic aspects of modes of drug administration for optimization of drug therapy. *Crit. Rev. Ther. Drug carrier Syst.* 16: 571-639.
25. Ingerman, M.J., Pitsakis, P.G., Rosenberg, A.F., *et al.* (1986). The importance of pharmacodynamics in determining the dosing interval in therapy for experimental *Pseudomonas* endocarditis in the rat. *Journal of Infectious Diseases*. 153: 107-714.
26. Kaye, C.M., Allen, A., Perry, S., Mc Donagh, M., Davy, M., Storm, K., Bird, N., Dewit, O. (2001) The Clinical Pharmacokinetics of a New Pharmacokinetically Enhanced Formulation of Amoxicillin/ Clavulanate. *Clinical Therapeutics* 23, 578-584.

27. Kerc, J., Opara, J. (2007) A new amoxicillin/clavulanate therapeutic system: Preparation, *in vitro* and pharmacokinetic evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 335, 106-113.
28. Lennemas, H., Knutson, L., Knutson, T., Hussain, A., Lesko, L., Salmonson, T., Amidon, G.L. (2002) The effect of amiloride on the *in vivo* effective permeability of amoxicillin in human jejunum: experience from a regional perfusion technique. *Euro J. Pharm. Sci.* 15: 271-277.
29. Levison, M. E. (1995) Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Infectious Disease Clinics of North America.* 18: 451-465.
30. Li, M., Anderson, G.D., Phillips, B.R., Kong, W., Shen, D.D., Wang, J. (2006) Interactions of amoxicillin and cefaclor with human renal organic anion and peptide transporters. *Drug metabolism and Disposition* 34, 547-555.
31. Marier, J.F., Beaudry, F., Ducharme, M.P., Fortin, D., Moreau, J.P., Massé, R., Vachon, P. (2001) A pharmacokinetic study of amoxicillin in febrile beagle dogs following repeated administrations of endotoxin. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 24, 379-383.
32. Mandal, T.K. 1995 The Influence Of Binding Solvents On Drug Release From Hydroxypropyl Metilcellulose Tablets. *Drug Development And Industrial Pharmacy* 21:107-112.
33. Matar, K. M. (2006). Simple and Rapid LC Method for the Determination of Amoxicillin in Plasma. *Chromatographia* 24, 255-260.
34. Nagarajan, R., Boeck, L.D., Gorman, M., Hamill, R.L., Higgins, C.E., Hoehn, M.M. (1971) Beta-lactam antibiotics from *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.* 93: 2308-2310.
35. NCCLS (2002) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals: Approved Standard, second ed. NCCLS document M31-A2 [ISBN 1-56238-461-9]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA.
36. Onishi, H. And Machida, Y. (1999) Biodegradation And Distribution Of Water-Soluble Chitosan In Mice. *Biomaterials* 20:175-182.
37. Papich, M.C. (1987) The β -lactam antibiotics: Clinical Pharmacology and recent developments. *Comp Equine* 9, 68-75.
38. Papich, M.C. (2007) Susceptibility testing in animals- How breakpoints are derived and interpretation of susceptibility data. *Proceeding of 15th AAVPT Biennial Symposium.* Pacific Grove, CA, May 2007.

39. Prescott, J.F., Baggot, J.D., Walker, R.D. (2000) Antimicrobial Therapy in veterinary medicine. Third Edition. Iowa State University Press/Ames. USA.
40. Rajabi-Siahboomi, A.R., Jordan, M.P. (2000) Slow release HPMC matrix systems. Eur. Pharm. Rev. 5:21-23.
41. Reed, M.D. (1998) The clinical pharmacology of amoxicillin and clavulanic acid. Pediatric Infection Journal 17, 957-962.
42. Riviere, J.E. (1994) Unique problems associated with the determination of veterinary drug preparation bioequivalence. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 17, 86-88.
43. Rokem, J.S., Lantz, A.E., Nielsen, J. (2007) Systems biology of antibiotic production by microorganisms. Nat Prod. Rep. 24: 1262-1287.
44. Rolinson, G.N., (1979) 6-APA and the development of the beta-lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 5:7-14.
45. Roy, J., Messier, S., Labrecque, O., Cox, W.R. (2007) Clinical and *in vitro* efficacy of amoxicillin against bacteria associated with feline skin wounds and abscesses. Canadian Veterinary Journal 48, 607-611.
46. Sahasathian, T., Kerdcholpetch, T., Chanweroch, A., Praphairaksit, N., Suwonjandee, N., Muangsin, N. (2007) Sustained release of Amoxicillin from chitosan tablets. Arch. Pharm. Res. 30: 526-531.
47. Schanker, L.S., Jeffrey, J. (1961) Active transport of foreign pyrimidines across the intestinal epithelium. Nature. 190:727-731.
48. Seo, H., Mitsuhashi, K., Tanibe, H. (1992) Antibacterial and antifungal fiber blend by chitosan in: C.J. Brine, P.A. Sanford, J.P. Zakakis (Eds.). Advances in chitin chitosan. Elsevier applied Science, U.K., p.34.
49. Soback, S., Bor, A., Kurtz, B., Paz, R., Ziv, G. (1987) Clavulanate – potentiated amoxicillin: *in vitro* antibacterial activity and oral bioavailability in calves. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutic 10, 105-113.
50. Steinijs, V., Hauschke, D., Jonkman, G. (1992) Controversies in bioequivalence studies. Clinical Pharmacokinetics 22, 247-253.
51. Stevens, D.L., Yan, S., Bryant, A. E. (1993) Penicillin- binding protein expression at different growth stages determines penicillin efficacy *in vitro* and *in vivo*: an explanation for the inoculum effect. Journal of Infectious Diseases. 167: 1401-1405.

52. Susana, T., Pablo, P. de la Torre, P.M., Torrado, S. (2004) Chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complex: in vivo study to demonstrate prolonged gastric retention. *J. Control Release.* 25: 917-923.
53. Sutherland, R., Croydon., E.A.P., Rolinson, G.N. (1972) Amoxicillin: a new semi-synthetic penicillin. *Br. Med. J.* 3:13-16.
54. Tsuji, A., Tamai, I. (1989) Na and pH dependent transport of foscarnet via the phosphate carrier system across intestinal brush border membrane. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1019-1022.
55. Uchida, Y., Izume, M., Ohtakara, A. (1988) Chitin and chitosan, Elsevier applied Science, London and New York, p.373.
56. Vree, T.B., Dammers, E., Van Duure, E. (2003) Variable absorption of clavulanic acid after an oral dose of 25 mg/kg of Clavubactin™ and Synulox™ in healthy dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutic* 26, 165-171.
57. Wang, J., Akiyama, Y., Morimoto, K., Tabata, Y., Ikada, Y. (2000) Positively charged gelatin microspheres as gastric mucoadhesive drug delivery system for eradication of *H. pylori*. *Drug Deliv.* 7: 237-243.
58. Wass, M., Evered, D.F. (1970) Transport of penicillamine across mucosa of the rat intestine *in vitro*. *Biochem Pharmacol. Ther. Toxicol.* 24: 153-158.
59. Westchies, W., Friedrich, C., Wedemeyer, R.S., Schmidtman, M., Kosch, O., Kinzig, M., Trahms, L., Sorgel, F., Siegmund, W., Horkovics-Kovats, S., Schwarz, F., Raneburger, J., Monnikes, H. (2008) Bioavailability of amoxicillin and clavulanic acid from extended release tablets depends on intragastric tablet deposition and gastric emptying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, doi:10.1016/j.ejpb.2008.05.011
60. Westphal, J.F., Deslandes, A., Brogard, J.M., Carbon, C. (1991) Reappraisal of amoxicillin absorption kinetics. *J. Antimicrob. Chemotherapy* 27, 647-654.
61. Yao, K.D., Peng, T., Yin, J., Xu, M.X. (1995) Microcapsules/microspheres related to chitosan. *J.M.S.-REV., Macromol. Chem. Phys.*, C35:155-180.
62. Zia, H., Shalchian, N., Borhanian, F. (1977) Kinetics of amoxicillin degradation in aqueous solution. *Canadian Journal of Pharmacology Science* 12, 80-83.