

00563 2/2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

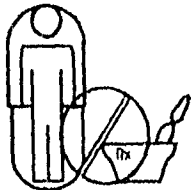
FACULTAD DE QUIMICA

"EVALUACION Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD
DE LA BIOEQUIVALENCIA DE METRONIDAZOL
COMPRIMIDOS 500 mg"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN FARMACIA
(OPCION BIOFARMACIA)
P R E S E N T A :

Q.F.B. MARIA TERESA DE JESUS FRANCISCO DOCE



Biofarmacia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"EVALUACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LA
BIOEQUIVALENCIA DE METRONIDAZOL COMPRIMIDOS 500 mg"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN FARMACIA (OPCIÓN BIOFARMACIA)

PRESENTA:

Q.F.B. MARÍA TERESA DE JESÚS FRANCISCO DOCE

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F.

1996

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: M. en C. Santiago Capella Vizcaino
VOCAL: M. en C. Marcela Hurtado
SECRETARIO: M. en C. Inés Fuentes Noriega
PRIMER SUPLENTE: M. en C. Dinora F. González Esquivel
SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. S. Margarita Rodríguez Alvarado

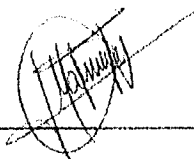
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO EXPERIMENTAL:
CENTRO APLICACIONES FARMACÉUTICAS DE
ESTUDIOS TECNOLÓGICOS, S.A.
(C.A.F.E.T., S.A.)
MÉXICO, D.F.

ASESOR:

M.en C. HELGI JUNG COOK: _____

SUSTENTANTE:

Q.F.B. MA. TERESA DE JESÚS FRANCISCO DOCE: _____



El saber no basta, debemos aplicarlo.
El desear no es suficiente, debemos hacerlo.

Goethe

DEDICATORIA:

SHEMA ISRAEL, ADONAI ELOHENU, ADONAI EHAB.

A MIS PADRES
CON RESPETO Y AMOR

DN. ANGEL FRANCISCO DÍEZ
DÑA. MA. ANUNCIACIÓN DOCE ABAD

A MIS HERMANOS
CON LA ESPERANZA DE SER MEJORES
SERES HUMANOS CADA DÍA

ANGELINES, ANA MARY, PEDRO MANUEL
CANDELAS Y JUAN CARLOS

A LA ESPERANZA DE LA VIDA NUEVA
JUAN CARLITOS Y MIGUEL ANGEL

A G R A D E C I M I E N T O S :

Un agradecimiento muy especial al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) por la oportunidad de poder realizar un logro más en mi vida profesional.

Al CENTRO A.F. DE ESTUDIOS TECNOLÓGICOS, S.A. (CAFET, S.A.) por brindarme el apoyo, paciencia, crecimiento personal y profesional en la realización de este trabajo. Muchas gracias.

Al Q.F.B. JUAN ANGELES URIBE por su gran ayuda tanto profesional como personal, por la oportunidad de crecer y de conocer a un ser humano excelente. Muchas gracias Jefe.

A la M. EN C. HELGI JUNG COOK que ha sido la motivación de muchas personas en el ambiente biofarmacéutico, de quien he aprendido que el éxito se logra con constancia y disciplina, y a quien admiro y respeto profundamente. Muchas gracias Helgi.

A la DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO de la FACULTAD DE QUÍMICA de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por permitirme conocer en sus aulas la ilusión y esperanza de ser mejor.

A la ASOCIACIÓN MEXICANA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA (A.M.I.C.), un agradecimiento especial al DR. ENRIQUE BLANCO DE LA MORA, DRA. LOURDES CARRILLO, Q.F.B. SONIA GÓMEZ, SR. MOYA, a todo el equipo de enfermeras y personal de apoyo de A.M.I.C. y a todos los estupendos chicos de Pachuca que participaron en el estudio de Bioequivalencia de Meltronidazol. Muchas gracias por compartir esta experiencia.

A la Q.F.B. ARACELI GARCÍA y a la Q.F.B. MA. DEL CONSUELO PÉREZ por su apoyo y ánimo para concluir este trabajo.

A los miembros del JURADO agradeciendo el tiempo y esfuerzo invertido en la revisión de este trabajo, el cual también es mérito suyo.

A los amigos y compañeros de la Maestría de Biofarmacia, con quienes compartí muchos buenos momentos, ilusiones y esperanzas :

Angélica Noguez Méndez
Gladys González Muciño
Clara Gpe. Espinosa Marlínez
Eduardo Ramírez

A los compañeros del CENTRO A.F. DE ESTUDIOS TECNOLÓGICOS, S.A. agradeciendo los momentos compartidos en el diario laborar.

A todos los que de un modo u otro han contribuido en este trabajo, ya sea con una palabra de ánimo, un apoyo material, un regalo de su tiempo y con su ejemplo de perseverancia y amor a la vida. Salvador S., Jorge C., Katie M., Mtra. Rosa M. Saavedra, Carmen G., Gaby B., Manuel R., Héctor M., Mary Carmen N. y Dña. Irene Espinosa .

*¿Quién luz propia alcanza?
Nuestro fulgor es el reflejo prestado
de grande y pequeña flama.*

ÍNDICE

ÍNDICE

EVALUACION Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LA BIOEQUIVALENCIA DE METRONIDAZOL (COMPRIMIDOS 500 mg)

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
CAPITULO 1: INTRODUCCION Y OBJETIVO	3
CAPITULO 2: GENERALIDADES	5
2.1 Monografía del METRONIDAZOL	5
2.2. Propiedades físicoquímicas	6
2.2.1. Descripción	
2.2.2. Solubilidad	
2.2.3. pKa	
2.2.4. Punto de fusión	
2.2.5. Coeficiente de partición lípido/agua	
2.2.6. Extracción	
2.2.7. Propiedades espectrales	
2.2.7.1. Espectro Infrarrojo	
2.2.7.2. Espectro de absorción al ultravioleta	
2.2.8. Estabilidad	
2.3. Propiedades farmacológicas	7
2.3.1. Antecedentes históricos	
2.3.2. Mecanismo de acción	
2.3.3. Usos terapéuticos	8
2.3.4. Niveles terapéuticos y dosis	9
2.3.5. Reacciones adversas	
2.3.6. Interacciones y contraindicaciones	
2.3.7. Toxicidad	10
2.4. Farmacocinética	10
2.4.1. Vías de administración	10
2.4.2. Absorción	10
2.4.3. Distribución	11
2.4.4. Metabolismo	
2.4.5. Eliminación	12
2.5. Biodisponibilidad	12
2.6. Métodos analíticos en fluidos biológicos	13
2.7. BIOEQUIVALENCIA: Puntos de vista internacionales en aspectos regulatorios de biodisponibilidad y bioequivalencia.	16
2.7.1. Introducción	
2.7.2. Definición de términos	19
2.7.2.1. Definiciones del CODE OF FEDERAL REGISTER 21 CFR (4-1-91 EDITION) PARTE 320 :REQUISITOS DE BIODISPONIBILIDAD Y BIOEQUIVALENCIA	
2.7.3. Puntos de vista internacionales: E.U, Canadá, C.E.E. y Japón.	20
2.7.3.1. Perspectivas regulatorias en los Estados Unidos de Norteamérica (E.U. y Canadá)	
2.7.3.2. Perspectivas regulatorias en la armonización de los requisitos de Biodisponibilidad y Bioequivalencia en la Comunidad Económica Europea (C.E.E.)	22
2.7.3.3. Perspectivas regulatorias de la Biodisponibilidad y Bioequivalencia en el Japón.	23

ÍNDICE

CAPITULO 3 PARTE EXPERIMENTAL	25
3.1 SELECCION DE PRODUCTOS	25
3.2 PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD	25
3.2.1. Ensayo de identidad	
3.2.2. Pruebas físicas	
3.2.2.1. Dureza	
3.2.2.2. Friabilidad	
3.2.2.3. Tiempo de desintegración	
3.2.2.4. Valoración	
3.3. ESTUDIO DE DISOLUCION	26
3.4. ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA	26
3.4.1. Fase analítica	
3.4.1.1. Sustancias de referencia	
3.4.1.2. Sustancias para evaluación de selectividad	
3.4.1.3. Reactivos	
3.4.1.4. Preparación de soluciones	
3.4.1.4.1. Fase móvil	
3.4.1.4.2. Soluciones estándar para validación del método	
3.5. METODO POR C.L.A.R. PARA CUANTIFICAR METRONIDAZOL EN PLASMA	29
3.5.1. Proceso de extracción de metronidazol en plasma	
3.5.2. Condiciones cromatográficas	
3.6. VALIDACION DEL METODO ANALITICO ANTES DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA	31
3.6.1. Selectividad	
3.6.2. Función respuesta (Linealidad)	
3.6.3. Exactitud	
3.6.4. Precisión	
3.6.5. Límite de detección	
3.6.6. Límite de cuantificación	
3.6.7. Recobro absoluto	
3.6.8. Estabilidad de las muestras en el disolvente de inyección	
3.6.9. Estabilidad de las muestras a largo plazo	
3.7 FASE CLÍNICA ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA	33
3.7.1. Selección de voluntarios	
3.7.1.1. Criterios de inclusión	
3.7.1.2. Criterios de exclusión	
3.7.1.3. Informe de consentimiento	
3.7.2. Diseño experimental del estudio de bioequivalencia	
3.7.3. Protocolo experimental	
3.8. ANALISIS DE LAS MUESTRAS	37
3.8.1. Corrida cromatográfica del análisis de muestras de un sujeto	
3.8.2. Puntos control	
3.9. VALIDACION DEL METODO DURANTE EL ANALISIS DE MUESTRAS DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA (VALIDACION <i>IN VIVO</i>)	38
3.9.1. Establecimiento de la corrida cromatográfica	
3.9.2. Curvas patrón	
CAPITULO 4 RESULTADOS	
4.1 PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD	39
4.2 ESTUDIO "IN VITRO" PRUEBA DE DISOLUCION	40
4.2.1. Resultados de la disolución en HCl 0.1N	
4.2.2. Resultados de la disolución en agua desionizada	
ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA	
4.3 VALIDACION PREVIA DEL METODO ANALITICO	42
4.3.1. Desarrollo del método	
4.3.2. Validación del método analítico	

ÍNDICE

4.3.2.1. Función respuesta	
4.3.2.2. Exactitud	
4.3.2.3. Precisión	
4.3.2.4. Sensibilidad: Límite de detección y límite de cuantificación	
4.3.2.5. Selectividad	
4.3.2.6. Recobro absoluto	
4.3.2.7. Estabilidad durante la inyección	
4.3.2.8. Estabilidad de la muestra a largo plazo	
4.4. VALIDACION DEL METODO ANALITICO DURANTE EL ESTUDIO	60
4.4.1. Cromatogramas	
4.4.2. Curvas patrón	
4.4.3. Puntos control (PC)	
4.5. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA	63
4.5.1. Análisis de las muestras plasmáticas	
4.5.2. Parámetros farmacocinéticos	
CAPITULO 5: ANALISIS DE RESULTADOS	
5.1. PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD	67
5.2. ESTUDIO DE DISOLUCION	
5.2.1. Disolución en HCl 0.1N	
5.2.2. Disolución en agua desionizada	
ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA	
5.3. VALIDACION IN VITRO O PREVIA AL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA	67
5.3.1. Desarrollo del método	
5.3.2. Validación del método analítico	
5.3.2.1. Función respuesta	
5.3.2.2. Exactitud	
5.3.2.3. Precisión	
5.3.2.4. Límite de detección y límite de cuantificación	
5.3.2.5. Selectividad	
5.3.2.6. Recobro absoluto	
5.3.2.7. Estabilidad en el disolvente de inyección	
5.3.2.8. Estabilidad a largo plazo con ciclos de congelación-descongelación	
5.3.2.9. Estabilidad a largo plazo sin ciclos de congelación-descongelación	
5.4. ANALISIS DE LAS MUESTRAS PLASMATICAS	70
5.4.1. Cromatogramas	
5.4.2. Curvas patrón	
5.4.3. Puntos control	
5.5. ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA	71
5.5.1. Análisis farmacocinético	
5.5.2. Análisis estadístico de los resultados	72
CAPITULO 6: ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	80
6.1. Fase de producción	81
6.1.1. Lista de verificación de los aspectos involucrados en la producción del lote de comprimidos de Metronidazol 500 mg	
6.2. Fase clínica	
6.2.1. Lista de verificación de los aspectos involucrados en la fase clínica del estudio de bioequivalencia de Metronidazol.	
6.3. Fase analítica	82
6.3.1. Lista de verificación de los aspectos involucrados en la fase analítica del estudio de bioequivalencia de Metronidazol comprimidos 500 mg	
CAPITULO 7: CONCLUSIONES	86
BIBLIOGRAFÍA	
APÉNDICES	

LISTA DE FIGURAS:

FIGURA 1 : Estructura molecular del METRONIDAZOL	5
FIGURA 2 : Vías metabólicas del METRONIDAZOL en el organismo humano	11
FIGURA 3 : Diseño de un estudio de bioequivalencia	17
FIGURA 4: Preparación de muestras para la cuantificación de METRONIDAZOL en plasma	30
FIGURA 5 : Perfiles de disolución en HCl 0.1 N	41
FIGURA 6 : Perfiles de disolución en agua desionizada	41
FIGURA 7 : Función respuesta: curvas patrón de METRONIDAZOL en plasma: DIA 1 y DIA 2	45
FIGURA 8 : Función respuesta: curvas patrón de METRONIDAZOL en plasma: DIA 3 y DIA 4	46
FIGURA 9A: Cromatogramas típicos del análisis cromatográfico de METRONIDAZOL	50
FIGURA 9B: Análisis espectral de una muestra proveniente de un sujeto que ingirió METRONIDAZOL	51
FIGURA 10 Cromatogramas de fármacos analizados en el sistema cromatográfico de metronidazol	52
FIGURA 11 : Estabilidad de las muestras durante la inyección por 48 horas	55
FIGURA 12 : Estabilidad a largo plazo de muestras de METRONIDAZOL en plasma con ciclos de congelación-descongelación. (-40°C-T.A.)	57
FIGURA 13: Estabilidad a largo plazo de muestras de METRONIDAZOL en plasma sin ciclos de congelación-descongelación. (-40°C-T.A.)	59
FIGURA 14: Cromatogramas obtenidos del análisis de muestras del estudio de bioequivalencia.	61
FIGURA 15 : Puntos control de calidad: análisis de las muestras del estudio de bioequivalencia	62
FIGURA 16 : Perfil de concentración plasmática promedio METRONIDAZOL vs tiempo de 24 sujetos	63
FIGURA 17 : Fases del análisis estadístico de la evaluación de BIOEQUIVALENCIA.	74

LISTA DE TABLAS

TABLA 1 : Criterios para determinar bioequivalencia	21
TABLA 2 : Diseño experimental empleado en el estudio de bioequivalencia de METRONIDAZOL comprimidos 500 mg	35
TABLA 3 : Resultados de pruebas de control de calidad del producto de referencia (FLAGYL) y del producto de prueba (METRONIDAZOL) 500 mg	39
TABLA 4A Y B : Perfiles de disolución en HCl 0.1N y agua desionizada.	40
TABLA 5 : Curvas patrón de METRONIDAZOL en plasma de 0.5 a 20.0 µg/mL.	43
TABLA 6 : Calidad de ajuste para las curvas Patrón de Metronidazol en plasma concentraciones interpoladas	43
TABLA 7 : Curvas patrón de metronidazol en plasma: porcentaje de desviación absoluta de las concentraciones interpoladas	44
TABLA 8 : Exactitud y precisión: concentraciones de METRONIDAZOL en plasma adicionado	47
TABLA 9 : Exactitud y precisión: porcentaje de desviación absoluta	48
TABLA 10: Porcentaje de recobro de METRONIDAZOL: relación de altura de picos	53
TABLA 11: Estabilidad de la muestra durante la inyección	54
TABLA 12: Estabilidad de METRONIDAZOL en almacenamiento con ciclos de congelación-descongelación (-40°C-T.A.)	56
TABLA 13: Estabilidad de METRONIDAZOL en almacenamiento sin ciclos de congelación-descongelación (-40°C-T.A.)	58
TABLA 14: Puntos control de calidad para METRONIDAZOL en plasma durante el estudio de bioequivalencia.	60
TABLA 15: Concentración plasmática promedio de METRONIDAZOL en plasma 24 sujetos	63
TABLA 16: Parámetros farmacocinéticos de METRONIDAZOL	66
TABLA 17: Parámetros farmacocinéticos de diferentes estudios de farmacocinética de METRONIDAZOL	72
TABLA 18: Concentración plasmática promedio a cada tiempo de muestreo	75
TABLA 19: Estadística descriptiva y comparativa de los parámetros farmacocinéticos de ABC 0-36, ABC 0 -inf, C _{máx} y t _{máx}	76
TABLA 20: Estadística descriptiva y comparativa de los parámetros farmacocinéticos de TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (TMR), VOLUMEN DE DISTRIBUCION (VD), DEPURACION (CL/F) Y VIDA MEDIA (t½)	77
TABLA 21: Intervalos de confianza al 90%	78
TABLA 21: Valores de probabilidad	78

RESUMEN

ABSTRACT

It was studied the bioequivalence of two oral formulations of METRONIDAZOLE 500 mg, a mexican test product was compared to an innovator product Flagyl (SEARLE) tablets 500 mg, using an experimental design of two ways, cross, single blind and totally randomized study in healthy subjects, with the goal to aprova) the mexican product like a generic under the Food and Drug Administration (FDA) of the United States of America

It was taken blood samples to 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 30.0 y 36.0 hours before the oral administration of the dose, these samples were analyzed using a High Performance Liquid Chromatographic (H.P.L.C.) method previously validated (0.5-20.0 µg/mL)

The next pharmacokinetics parameters were calculated using an independent model method : AREA UNDER THE CURVE FRON ZERO TO THE LAST TIME (AUC 0-t), AREA UNDER THE CURVE FRON ZERO TO INFINITY (AUC 0-inf), MEAN RESIDENCE TIME (MRT), VOLUME OF DISTRIBUTION (Vd ss), CLEARANCE (Cl), HALF TIME OF ELIMINATION (t_{1/2}), PEAK CONCENTRATION PLASMA (C max) and the TIME TO GET PEAK CONCENTRATION PLASMA (t max).

Statistical analysis were made using the statistical methods of *Clasical Confidence Interval*, *Westlake's Interval*, *Schülman's Hipotesis and the probability value of Anderson-Hauck* resulting no significant statistically differences ($p > 0.05$), it proved that the two products are bioequivalents.

During the bioequivalence study in its different parts, it was given and special emphasis to the various aspects of QUALITY ASSURANCE relatd to the PRODUCTION, ANALYTICAL and STATISTICAL PHASES.

RESUMEN

Se estudió la BIOEQUIVALENCIA de una formulación de METRONIDAZOL de 500 mg en comprimidos de un laboratorio mexicano respecto al producto innovador FLAGYL (SEARLE) comprimidos 500 mg, utilizando para ello un diseño experimental de dos vías, cruzado, simple ciego y completamente al azar en voluntarios sanos, con el fin de obtener la aprobación del producto mexicano como un genérico por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica.

Se tomaron muestras sanguíneas a las 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 30.0 y 36.0 horas después de la administración de la dosis, las cuales fueron analizadas por un método de Cromatografía de Líquidos de alta Resolución (CLAR) previamente validado (0.5 a 20.0 µg/mL).

Se determinaron los siguientes parámetros farmacocinéticos utilizando un método modelo independiente: ÁREA BAJO LA CURVA DE TIEMPO 0 AL ÚLTIMO TIEMPO DE MUESTREO (ABC_{0-t}), ÁREA BAJO LA CURVA DE TIEMPO 0 AL INFINITO ($ABC_{0-\infty}$), TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (TMR), VOLUMEN DE DISTRIBUCIÓN (Vd_{ss}), DEPURACIÓN (Cl), VIDA MEDIA DE ELIMINACIÓN ($t_{1/2}$), CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA MÁXIMA ($C_{m\acute{a}x}$), y TIEMPO PARA ALCANZAR LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA MÁXIMA ($t_{m\acute{a}x}$).

Al efectuar el análisis estadístico utilizando las pruebas estadísticas de *Intervalo de Confianza Clásico*, *Intervalo de Westlake*, *la Prueba de Hipótesis de Schürman* y *el valor de Probabilidad de Anderson-Hauck* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$), lo que demuestra que los dos productos estudiados son bioequivalentes.

Durante el estudio de Bioequivalencia en sus diferentes fases se dio especial importancia a diversos puntos de ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD relacionados a las FASES del estudio de BIOEQUIVALENCIA como son PRODUCCIÓN, CLÍNICA, ANALÍTICA y ESTADÍSTICA.

CAPITULO 1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

En los últimos años en todos los ámbitos del quehacer humano, el término CALIDAD ha marcado y definido una nueva filosofía en la concepción y realización de una actividad. Las ciencias farmacéuticas no han sido excluidas y por lo tanto han surgido en el aspecto regulatorio internacional las BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO (GLP's), BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA (GMP'S), BUENAS PRACTICAS CLÍNICAS (GCP'S), etc., las cuales indican los aspectos mínimos a cubrir para lograr el ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD aplicado a una actividad farmacéutica o clínica en particular.

Es necesario contar con productos farmacéuticos que brinden eficacia terapéutica y seguridad a quien los consuma; así una de las formas de evaluar la calidad de un producto farmacéutico de administración oral o cualquier forma de dosificación, que requiera de un proceso de absorción para poder ejercer su efecto terapéutico es la prueba de BIOEQUIVALENCIA. Esta prueba ha sido considerada como un posible indicador de la eficacia terapéutica de un producto farmacéutico, de ahí la necesidad de realizar este tipo de estudios con productos genéricos que para ser comercializados deben demostrar bioequivalencia con respecto al producto innovador o de referencia.

La bioequivalencia es un requisito regulatorio muy importante para el registro de productos farmacéuticos, en los Estados Unidos, Canadá, la Comunidad Económica Europea y Japón, el cual se considera de mucha importancia tanto desde el punto de vista de la calidad de un producto, como en el aspecto ético y legal.

Los organismos regulatorios internacionales día a día realizan esfuerzos para que los productos farmacéuticos de cualquier país del mundo cumplan con sus características de calidad, eficacia terapéutica y seguridad. Entre las iniciativas más importantes³⁷⁻⁴⁰, destaca la realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que ante la preocupación de la calidad de los productos farmacéuticos emitió una guía o serie de lineamientos (**INTERCHANGEABLE MULTI-SOURCE PHARMACEUTICAL PRODUCTS: WHO DRAFT GUIDELINE ON MARKETING AUTHORIZATION REQUIREMENTS**)⁶¹ que resumen las regulaciones ya elaboradas por diferentes organismos regulatorios internacionales como Australia, Canadá, los países de la Comunidad Económica Europea, Hungría, Japón, los Países Bajos y los Estados Unidos. Cada una de estas fueron consideradas para desarrollar las Guías OMS viéndose además como una herramienta administrativa y regulatoria de los Estados miembros de la OMS, como nuestro país.

La OMS espera que a futuro los productos farmacéuticos, ya sea que se expendan en farmacias o se distribuyan a través del sector público o privado, estén sujetos a los mismos requisitos para autorizar su comercialización. De esta forma se

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

asegura que todos los productos farmacéuticos disponibles son seguros, eficaces y de buena calidad, además de su aplicabilidad y equivalencia terapéutica.

La **BIOEQUIVALENCIA** de un producto se define como la similitud en velocidad y cantidad con que un producto farmacéutico al absorberse alcanza el torrente sanguíneo comparativamente al producto **INNOVADOR** o de **REFERENCIA**.

Basándose en estos antecedentes y con el propósito de obtener la aprobación como **ANDA (ABREVIATED NEW DRUG APPLICATION)** ante la **FDA (Food and Drug Administration)** de los Estados Unidos de Norteamérica de una formulación de **METRONIDAZOL 500 mg** en comprimidos, desarrollada por un laboratorio mexicano, el presente trabajo cubre los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL.

* Realizar un estudio de **BIOEQUIVALENCIA** comparando la formulación de comprimidos recubiertos de 500 mg con respecto al producto innovador **FLAGYL 500 mg (SEARLE)**.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Verificar que el **BIOLOTE** sea producido de acuerdo a las **BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA**.

- Verificar que el **ESTUDIO CLÍNICO** sea realizado de acuerdo a las **BUENAS PRACTICAS CLÍNICAS**.

- Verificar que el **ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS** del estudio de **BIOEQUIVALENCIA** se lleve de acuerdo a las **BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO**.

CAPITULO 2
GENERALIDADES

GENERALIDADES

2.1. MONOGRAFÍA DE METRONIDAZOL ^{1,5}

DESCRIPCIÓN:

El METRONIDAZOL es un agente sintético antiprotozoario y antibacteriano, el cual tiene las siguientes características.

NOMBRES QUÍMICOS:

1-(2-hidroxietil)2-metil-5-nitroimidazol, 1-(Ó-hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol);
1(2-metil-5-nitroimidazol-1-)etanol;
1 H-imidazol-1-etanol-2-metil-5-nitro,2-metil-5-nitroimidazoletanol.
1-(β-etilol)-2-metil-5-nitro-3-azopirrol.

NOMBRES COMERCIALES MAS COMUNES:

Sanizol, Tricocet; Flagyl, Orvagil, Trichazol; Trivazol,(E.U.A.) Amiyodazol;
Antral, Flagenase, Flagyl, Fusanidazol, Giatricol; (MEXICO).

FORMULA CONDENSADA: $C_6H_9N_3O_3$

FORMULA DESARROLLADA:

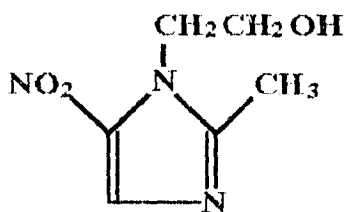


FIGURA 1: ESTRUCTURA MOLECULAR DEL METRONIDAZOL

PESO MOLECULAR : 171.16 g/mol

GENERALIDADES

2.2. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS^{1,5}

2.2.1. DESCRIPCIÓN⁴: Se presenta como un polvo cristalino, de color blanco o crema, con ligero olor, sabor amargo y ligeramente salino; se oscurece a la luz, aún cuando es estable en contacto con el aire.

2.2.2. SOLUBILIDAD⁴: Soluble a 20°C en 100 partes de agua, 200 partes de alcohol, 250 partes de cloroformo, soluble en ácidos diluidos; en acetona caliente, ligeramente soluble en éter (menos de 0.05 g/100 ml.), poco soluble en dimetilformamida.

2.2.3. pKa⁶ : 2.5

2.2.4. PUNTO DE FUSIÓN^{4,5} : Alrededor de 160⁰ C

2.2.5. COEFICIENTE DE PARTICIÓN LÍPIDO/AGUA¹ :
Log P (octanol/pH 7.4) -0.1

2.2.6. EXTRACCIÓN : Se extrae fácilmente con solventes orgánicos como el acetonitrilo.

2.2.7. PROPIEDADES ESPECTRALES^{1,2,6}:

2.2.7.1. ESPECTRO INFRARROJO: El espectro de absorción infrarrojo de un estándar de METRONIDAZOL, comprimido en una pastilla de KBr presenta las siguientes señales que se obtienen en las bandas de absorción; las bandas que aparecen a los 3230, 3105, 1538, 1375, 1078, 830 cm⁻¹, corresponden a los picos de OH, C=CH, C-H, NO₂, N-O, C-OH, C-O, C-NO₂, C-N respectivamente ².

2.2.7.2. ESPECTRO DE ABSORCIÓN AL ULTRAVIOLETA: El METRONIDAZOL exhibe una absorción máxima cerca de los 274 nm en solución de ácido sulfúrico 0.1 N en metanol como disolvente. La absorbancia molar en éste solvente es de 6333.

2.2.8 ESTABILIDAD: El METRONIDAZOL es sensible a la luz tanto en forma sólida como en solución. El efecto de la luz en soluciones parenterales de METRONIDAZOL se debe a una caída del pH y a un incremento del ión nitrito, formándose una coloración amarillina ¹⁶. Se han realizado estudios con diferentes estabilizadores del METRONIDAZOL en solución, entre ellas el urato de sodio ¹⁷.

2.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS⁴² :

2.3.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS:

En 1955 el descubrimiento de la azomicina (2-nitroimidazol) por Nakamura y la demostración de sus propiedades tricomonocidas por Horie (1956), abrieron el camino a la síntesis química y las pruebas biológicas de muchos nitroimidazoles. En 1959, Cousar y Julou anunciaron la actividad tricomonocida *in vitro* e *in vivo* del 1-(beta-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol molécula conocida actualmente como METRONIDAZOL.

Durel y col. (1960) comprobaron que las dosis orales del fármaco impartían actividad tricomonocida en el semen y la orina, y demostraron que podía obtenerse un alto porcentaje de curaciones en hombres y mujeres afectados de tricomoniasis. El éxito de éste tratamiento estimuló la síntesis y el ensayo de muchos compuestos similares. Dos nitroimidazoles estrechamente relacionados en su estructura y actividad al METRONIDAZOL: TINIDAZOL y NIMORAZOL, se emplean actualmente en algunas partes del mundo como amebicidas y tricomonocidas efectivos.

Antes de la introducción del METRONIDAZOL, la terapia con diferentes agentes curaba gran proporción de mujeres infectadas con tricomonas, pero dejaba un grupo intratable de casos crónicos por el cual poco podía hacerse además de aliviar los síntomas. Asimismo, la infección masculina forma un reservorio de parásitos que lleva a la reinfección femenina por el contacto sexual, ya que los hombres no pueden tratarse tópicamente. Con el uso del METRONIDAZOL gran parte de estos pacientes pueden curarse. Este principio activo es muy útil en el tratamiento de la amebiasis intestinal y extraintestinal, además de ser efectivo en el tratamiento de la lambliasis⁴².

2.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN:

El mecanismo de acción se refleja en una toxicidad selectiva para los microorganismos anaerobios o microaerófilos y para otras células anóxicas o hipóxicas. En las células susceptibles, el grupo nitro del METRONIDAZOL es reducido por las proteínas portadoras de electrones con bajo potencial de redox (como la ferredoxina de los clostridios), las cuales tienen un papel mucho más importante en el metabolismo de células de anaerobios que en los aerobios. De ésta forma, el METRONIDAZOL actúa como un *aspirador* de electrones y priva a la célula de los equivalentes reductores que requiere.

GENERALIDADES

Actualmente se cree que la forma reducida del fármaco es la que realmente produce las lesiones bioquímicas que llevan a la muerte de la célula. Aunque los trabajos anteriores habían establecido que el fármaco inhibe la síntesis del ADN en la *Trichomona vaginalis* y causa la degradación del ADN en *Clostridium bifermentans*; otros estudios con ADN de limo de ternera indican que el METRONIDAZOL reducido ocasiona una pérdida de la estructura helicoidal del ADN, ruptura de los cordones y consiguiente deterioro de su función de matriz. Estos hallazgos concuerdan con sus efectos antimicrobianos y su capacidad para potenciar los efectos de la radiación sobre las células tumorales hipóxicas⁴².

2.3.3. USOS TERAPÉUTICOS :

Probablemente el progreso más importante en el tratamiento de la infección protozoaria ha sido la introducción y el uso exitoso del METRONIDAZOL como amebicida. Primero se le introdujo como agente tricomonocida sistémico por vía oral en hombres y mujeres. El fármaco es extremadamente activo contra la *Entamoeba histolytica*. En cultivo, la morfología de los microorganismos se altera marcadamente de 6 a 20 horas en concentraciones entre 1 y 10 µg/mL de METRONIDAZOL. A las 24 horas todos los microorganismos han muerto. En concentración de 0.2 µg/mL se observa el mismo efecto en 72 horas.

El progreso del uso del fármaco consiste en su utilidad en el tratamiento de todas las formas de amebiasis. En todas las áreas geográficas de la tierra, cualquiera que sea la virulencia de las cepas o la forma de amebiasis que se trate, se recomienda que los pacientes reciban 750 mg de METRONIDAZOL tres veces al día durante 5 a 10 días. La dosis diaria infantil es de 35-50 mg/kg dividida en tres tomas durante 10 días. El tratamiento con METRONIDAZOL tiene su mínimo de efectividad cuando el fármaco se administra al portador asintomático de quistes.

Pese al considerable uso clínico del METRONIDAZOL en los últimos años, no se ha presentado resistencia de la *E. histolytica*, además de que los intentos para producir resistencia al fármaco *in vitro*, han sido infructuosos. Con el tratamiento en masa o intensivo con una alta dosificación mensual por unos cuantos meses se ha observado un considerable decremento en la incidencia de la disentería amebiana en comunidades relativamente aisladas con un alto índice endémico.

La terapia con METRONIDAZOL también ha resultado efectiva para el tratamiento de absceso hepático amebiano y giardiasis⁶⁸, además de encontrarse muy buenos resultados en su aplicación como radiosensibilizador en células anóxicas de tumores, disminuyéndose de esa manera la dosis de radiación. Se ha encontrado que la terapia con

GENERALIDADES

METRONIDAZOL tiene poca o ninguna efectividad contra microorganismos aerobios.

Los 5-nitroimidazoles¹¹ (como el METRONIDAZOL) también son comúnmente administrados después de apendicectomías, cirugía del colon e intervenciones ginecológicas para prevenir complicaciones sépticas postoperatorias.

2.3.4. NIVELES TERAPÉUTICOS Y DOSIS:

Los estudios realizados *in vitro* indican que el METRONIDAZOL es efectivo contra microorganismos anaerobios en una concentración de 6 µg/mL⁶⁹. Después de una dosis oral de 400 mg en 7 sujetos se obtuvieron concentraciones máximas desde 4.5 hasta 11.6 µg/mL (media de 6.9 µg/mL) a las 2 horas después de administrar la dosis. También se encontró una concentración plasmática media de 1.6 µg/mL de hidroximetil-METRONIDAZOL (metabolito principal) a las 8 horas después de la administración.⁴⁰

La administración oral de dosis de METRONIDAZOL de 250, 500 o 2000 mg produce concentraciones máximas de 6, 12 y 40 µg/mL, respectivamente. Se han utilizado diferentes formas de dosificación en el tratamiento de la tricomoniasis femenina, pero el régimen actualmente aceptado es de un comprimido de 250 mg administrado por vía oral, tres veces por día durante 7 a 10 días. El tratamiento para la lambliasis es el mismo que en la tricomoniasis.⁴²

2.3.5. REACCIONES ADVERSAS:

El uso de dosis altas ocasiona reacciones secundarias como náuseas, cefalea, boca seca y sabor metálico, pero raramente es necesario interrumpir la dosificación. Los efectos secundarios no son lo bastante severos como para requerir la suspensión del fármaco. Los más comunes se experimentan en el tracto gastrointestinal: anorexia, diarrea, molestias epigástricas y cólicos abdominales.

2.3.6. INTERACCIONES Y CONTRAINDICACIONES:

El METRONIDAZOL tiene un efecto "disulfiram" bien documentado y algunos pacientes sufren molestias abdominales, vómito, rubor o cefalea si se toman bebidas alcohólicas durante el tratamiento con METRONIDAZOL. Se han reportado reacciones después de la administración de preparaciones farmacéuticas formuladas con alcohol⁶¹. El tratamiento debe interrumpirse si hay ataxia o cualquier otro síntoma sobre el sistema nervioso central (SNC). El METRONIDAZOL está contraindicado en pacientes con enfermedad activa del SNC y con pruebas de antecedentes de discrasia sanguínea.⁴²

GENERALIDADES

Psicosis aguda o confusión han sido asociados con el uso concomitante de METRONIDAZOL y disulfiram⁴⁹

2.3.7. TOXICIDAD:

El METRONIDAZOL es carcinógeno en roedores y mutágeno en bacterias⁴⁹. Además la actividad mutágena asociada al METRONIDAZOL y varios de sus metabolitos se encuentra en la orina de pacientes tratados con dosis terapéuticas del fármaco⁵⁰. Aunque el significado clínico de estos fenómenos es difícil de evaluar, los mismos deben aconsejar un uso prudente del fármaco. El METRONIDAZOL se ha administrado sin efectos adversos aparentes durante todas las etapas del embarazo⁵¹, pero aún así, su uso está contraindicado en el primer trimestre.

2.4. FARMACOCINÉTICA:

2.4.1. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN:

Las principales vías de administración son la oral, intravenosa, tópica y rectal. En México, las diversas formas farmacéuticas en las que se encuentra disponible comercialmente el METRONIDAZOL son: suspensión, tabletas y comprimidos, óvulos e inyecciones. En el comercio nacional se encuentran 11 productos conteniendo METRONIDAZOL como principio activo único y en combinación existen otros 10 productos principalmente con otros antibacterianos como la dihidroquinotona⁵⁰.

2.4.2. ABSORCIÓN:

Después de una administración oral de METRONIDAZOL, éste es bien absorbido con una concentración máxima en plasma que se alcanza entre 1 y 2 horas después de la administración. Las concentraciones plasmáticas son proporcionales a la dosis administrada.

GENERALIDADES

2.4.3. DISTRIBUCIÓN:

La disposición del METRONIDAZOL en el organismo es similar tanto después de una administración oral como intravenosa. Aparece en líquido cefalorraquídeo, saliva y leche materna en concentraciones similares a aquellas encontradas en plasma. También se han detectado concentraciones bactericidas de METRONIDAZOL en pus de abscesos hepáticos. Menos del 20% del METRONIDAZOL circulante está unido a proteínas plasmáticas.

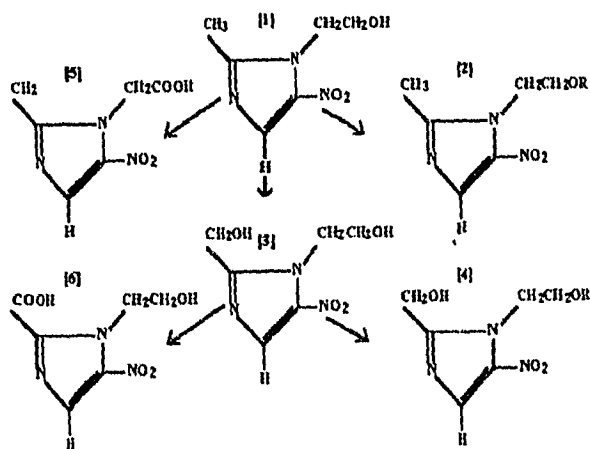
2.4.4. METABOLISMO:

El METRONIDAZOL es el principal componente que se encuentra en el plasma, con pequeñas cantidades del metabolito hidroximetil METRONIDAZOL. Tanto el compuesto inalterado como el metabolito, poseen actividad bactericida *in vitro* contra la mayoría de cepas de bacterias anaerobias, así como actividad tricomónica.

Los metabolitos que aparecen en la orina son productos obtenidos principalmente por oxidación de la cadena lateral (1-hidroxiethyl-2-hidroximetil-5-nitroimidazol y 2-metil-5-nitroimidazol y 1-ácido acético) y por conjugación glucurónica, con una porción de METRONIDAZOL inalterado de aproximadamente el 20% de la dosis administrada.

FIGURA 2: VÍAS METABÓLICAS DEL METRONIDAZOL EN EL ORGANISMO HUMANO. STAMBAUGH Y COLS. 2

[1] METRONIDAZOL; [2] el correspondiente éter glucurónico (R= glucurónico); [3] 1-(2-hidroxiethyl)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol; [4] su correspondiente glucurónico; [5] 2-metil-5-nitroimidazole-1-ácido acético [6] 1-(2-hidroxiethyl)-2-ácido carboxílico-5-nitroimidazol.



GENERALIDADES

2.4.5. ELIMINACIÓN:

La principal vía de eliminación del METRONIDAZOL y sus metabolitos es la vía renal (60-80% de la dosis), con una excreción fecal de cerca del 6 al 15% de la dosis. Los metabolitos que aparecen en la orina son resultado de la oxidación de la cadena lateral [1-(α -HIDROXIETIL)2-HIDROXIMETIL-5-NITROIMIDAZOL y 2-METIL-5-NITROIMIDAZOL-1-IL-ACIDO ACÉTICO] y conjugado glucurónico, así como METRONIDAZOL inalterado en un 20% aproximadamente del total administrado. La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) promedio es de 8 horas. La depuración renal del METRONIDAZOL es aproximadamente de 10 mL/min/1.73 m².

La disfunción renal no altera la farmacocinética del METRONIDAZOL; sin embargo la depuración plasmática de METRONIDAZOL se ve deprimida en pacientes con disfunción hepática.³⁰

2.5. BIODISPONIBILIDAD:

El METRONIDAZOL administrado por vía oral presenta una biodisponibilidad cercana al 100%; algunos estudios realizados revelan que no hay diferencias significativas de biodisponibilidad entre hombres y mujeres, sin embargo, a causa de diferencias de pesos, los niveles plasmáticos resultantes en hombres son más bajos que los determinados en la población femenina.^{7-11, 41, 46-47}

En un estudio realizado en 7 sujetos (tres mujeres y cuatro hombres) se llevó a cabo una comparación dosis única (vía oral e intravenosa) y multidosis, encontrándose que la biodisponibilidad sistémica oral fue de 98.9%.

2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CUANTIFICAR METRONIDAZOL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS:

Se han desarrollado una gran variedad de métodos analíticos para la cuantificación de METRONIDAZOL y otros agentes antibacterianos en fluidos biológicos entre los que se encuentran: Polarografía, Espectrofotometría, Cromatografía en placa fina, Análisis Colorimétrico, Cromatografía Gas-Líquido y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

***ESPECTROFOTOMETRÍA Y POLAROGRAFÍA:** De Silva y col.²⁶ presenta tres métodos para la cuantificación de los 2,5-nitroimidazoles en sangre y orina por espectrofotometría, polarografía y cromatografía de gases utilizando un procedimiento de extracción selectiva. Los extractos en acetato de etilo de sangre y orina son eluidos en cromatografía de placa fina con metanol. Alícuotas de las soluciones metanólicas son analizadas por espectrofotometría (sensibilidad de 0.5-1.0 µg/mL), polarografía (sensibilidad de 0.2 -0.3 µg/mL). El análisis de muestras de sangre y orina cubre un intervalo de 0.01 a 10 µg/mL.

***CROMATOGRAFÍA DE GASES:** Wood²¹ presenta un procedimiento sensible que fue desarrollado para cuantificar METRONIDAZOL en plasma, el cual es extraído con cloroformo y determinado como un derivado trimetilsilil (TMS) por Cromatografía de Gas-Líquido utilizando un detector de ionización de flama. El estándar interno utilizado fue alcohol metilílico y la respuesta evaluada fue la altura relativa, utilizando una columna OV-1 (3%) en Gas Crom Q a 160°C. El intervalo de concentración evaluado fue de 0.5 a 5 µg/mL. El método tiene ciertas desventajas ya que no cuantifica el fármaco inalterado y los trimetilsilil derivados son sensibles a la humedad e inestables. La recuperación promedio fue 102.9 %

***CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN:**

a) Marques y col.²⁴ presentan un método CLAR de fase reversa para el análisis directo de muestras de suero y orina, con detección al UV a 324 nm. Esta técnica es específica para METRONIDAZOL o misonidazol y los metabolitos con el grupo funcional nitroimidazol inalterado. El método utiliza una columna µ-Bondapack C₁₈ y una fase móvil constituida de solución reguladora de fosfatos 1.0 M pH 4.0 y acetonitrilo (92:8) a un flujo de 2.0 mL/min. La técnica de extracción consiste en tratar la muestras de orina y plasma con etanol, agitación, incubación y posterior inyección del sobrenadante al sistema cromatográfico. El método es lineal en el intervalo de 0.5 a 100 µg/mL.

GENERALIDADES

b) Lanbeck y col.²⁷ proponen un método para la cuantificación de METRONIDAZOL y Tinidazol en plasma y heces, utilizando uno a otro como su respectiva sustancia de referencia interna. La fase estacionaria está constituida por una columna Spherisorb S5 ODS y la fase móvil de una solución reguladora de fosfatos (pH 5.5) 0.01 M y acetonitrilo (85:15). Las muestras son extraídas utilizando una mezcla de éter-cloruro de metileno (1.5:1), centrifugación y evaporación bajo corriente de nitrógeno, el residuo se reconstituye con 250 µL de eluente. El método presenta un recobro superior al 90% para METRONIDAZOL y casi cuantitativo para tinidazol. El intervalo de concentración evaluado para METRONIDAZOL es de 0-16 µg/mL con una concentración mínima cuantificable de 25 ng/mL.

c) Kaye y col.²⁶ utilizando un método CLAR y un volumen de muestra de 100 µL de plasma, saliva, suero, orina o sangre completa, cuantificó METRONIDAZOL inalterado y sus dos metabolitos principales (hidroxi-METRONIDAZOL y desmetil-METRONIDAZOL). A la muestra se le adiciona acetonitrilo en el cual se encuentra el estándar interno, se agita y centrifuga. Se toman alícuotas de 5-50 µL del sobrenadante se inyectan en el sistema cromatográfico, donde la fase estacionaria es una columna Spherisorb S5 ODS, precedida por una columna del mismo material; la fase móvil está constituida por solución reguladora de fosfatos (pH 3.0), metanol y acetonitrilo (93:4:3) con detección al UV a 312 nm. En este trabajo se sugiere el seguimiento de los niveles de METRONIDAZOL en saliva, ya que en los estudios realizados en este trabajo se observa correlación con respecto al perfil obtenido en sangre total.

d) Niiesson-Ehle y col.²², desarrollaron un método para cuantificar tinidazol, METRONIDAZOL y sus dos metabolitos principales, en suero y orina. Las muestras (20 µL) se tratan con igual volumen de ácido perclórico al 5%, para posteriormente centrifugarlas, filtrarlas e inyectarlas al cromatógrafo. Los fármacos se eluyen utilizando una columna de fase reversa Nucleosil C₁₈ y detección al UV a 320 nm. Las concentraciones mínimas detectables fueron para METRONIDAZOL 0.3 µg/mL, para hidroxiMETRONIDAZOL 0.15 µg/mL y para tinidazol 0.05 µg/mL.

e) En otro estudio realizado por Woolfard²³, se probaron diferentes agentes precipitantes. Los principales solventes probados para precipitar proteínas fueron alcoholes miscibles con agua y acetonitrilo, evaluándose interferencias de la soluciones obtenidas para el análisis de METRONIDAZOL. La eficiencia de los precipitantes estudiados demostró que el metanol es el menos efectivo y el acetonitrilo el que mejor resultado presentó, quedando como agentes precipitantes intermedios en orden creciente de eficiencia, el etanol y la acetona.

GENERALIDADES

f) Gibson y col.²⁸ presentan un método en el que las muestras de plasma, tratadas con ácido tricloroacético para la desnaturalización de proteínas plasmáticas, son eluidas en una columna C₁₈ con una fase móvil constituida por 8 partes de acetonitrilo y 92 partes de fosfato monobásico de potasio 0.05 M, pH 3.0; la sensibilidad del método fue de 25 µg/mL y una respuesta lineal en un intervalo de concentración de 25 a 500 µg/mL. La variación intra e interdía generalmente resultó menor al 2.5 % para todas las concentraciones evaluadas. Otros antibióticos probados no interfirieron en el análisis de METRONIDAZOL.

g) Róna y Gachály²⁹ desarrollaron un método el cual requiere 1 mL de suero, se adiciona el estándar interno en metanol:agua (1:1) y solución de fosfato monobásico de potasio 1 M, se agita y después de 15 minutos se eluye con 10 mL de cloruro de metileno en una columna cromatográfica conteniendo 1.5 g de Extrelut. La solución obtenida se evaporó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno; el residuo seco se disolvió con 100 µL de metanol:agua (1:1) y se agitó por 30 seg. Se inyectaron alícuotas de 5 µL en la columna analítica, utilizando como fase móvil metanol y fosfato de potasio monobásico (3:7 v/v) con detección al UV a 318 nm .

2.7 BIOEQUIVALENCIA

PUNTOS DE VISTA INTERNACIONALES EN ASPECTOS REGULATORIOS DE BIODISPONIBILIDAD Y BIOEQUIVALENCIA.

2.7.1. INTRODUCCIÓN.

Mucho se ha avanzado desde la introducción del concepto de DISPONIBILIDAD FISIOLÓGICA, como anteriormente se denominaba a la BIODISPONIBILIDAD. Al final de la década de 1950 y principios de 1960, se reportaron en la literatura científica diferentes respuestas terapéuticas en un mismo individuo, debido al uso de medicamentos procedentes de diferentes fabricantes, aún cuando estos contenían exactamente la misma cantidad de principio activo y cumplían con las especificaciones de las Farmacopeas de la época.³⁶, de ahí la necesidad de contar con un requerimiento regulatorio para garantizar la BIODISPONIBILIDAD RELATIVA O BIOEQUIVALENCIA con respecto al producto innovador que ha demostrado eficacia terapéutica y seguridad.

La "Food and Drug Administration" (FDA) clasifica como EQUIVALENTES TERAPÉUTICOS a "Aquellos productos farmacéuticos que han demostrado ser equivalentes en cuanto a efectividad y seguridad, ser equivalentes farmacéuticos (mismo principio activo y misma forma farmacéutica), bioequivalente, que contiene adecuadas indicaciones de uso y que ha sido fabricados bajo condiciones de BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA". De acuerdo a la FDA, se espera que los productos bioequivalentes tengan el mismo efecto terapéutico al ser administrados a pacientes bajo las condiciones prescritas en las indicaciones.

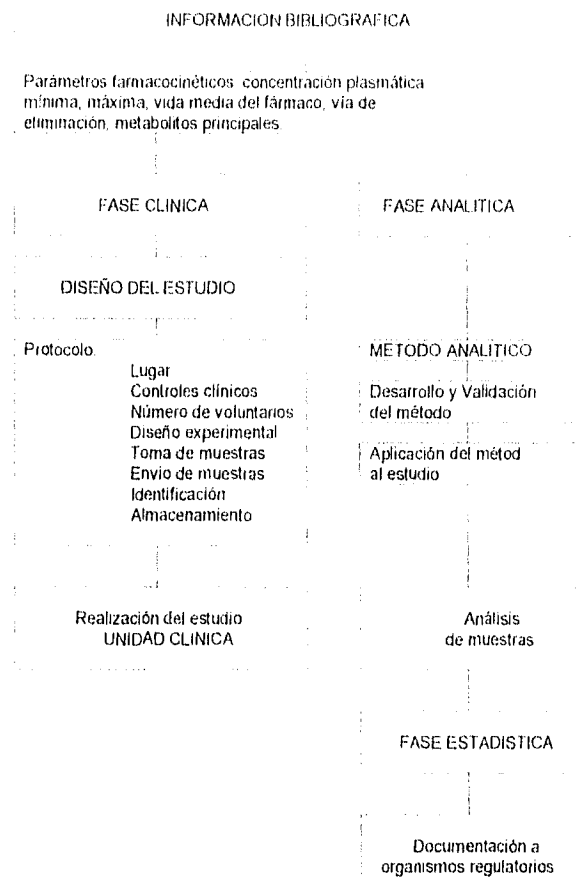
En los Estados Unidos de Norteamérica, un producto genérico que se desee comercializar en dicho país como un "ANDA" (Abbreviated New Drug Application), debe cubrir entre otros el requisito de demostrar BIOEQUIVALENCIA con respecto al producto innovador en el país.

Usualmente la BIOEQUIVALENCIA se establece realizando un estudio en sujetos humanos normales, evaluando la velocidad y cantidad absorbida del fármaco administrado.

Considerando todos los aspectos que pueden incidir para obtener un producto genérico que demuestre ser bioequivalente al producto líder o innovador, los más importantes a saber son:

- A) FASE DE PRODUCCIÓN O MANUFACTURA DEL PRODUCTO FARMACÉUTICO**
- B) FASE CLÍNICA**
- C) FASE ANALÍTICA**
- D) FASE ESTADÍSTICA**

FIGURA 3: DISEÑO DE UN ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA



Cada uno de ellos conforma una parte esencial en el logro de la obtención de un producto farmacéutico bioequivalente y su adecuada evaluación.

Así, se puede decir que en la **FASE DE PRODUCCIÓN** están involucrados todos los aspectos fisicoquímicos y tecnológicos de una formulación farmacéutica, que ha tenido una fase de **PREFORMULACIÓN**

GENERALIDADES

donde se han evaluado "a priori" las características físicas y químicas de la formulación propuesta, un **ESCALAMIENTO** a fin de obtener un tamaño de lote industrial representativo al que se manejará rutinariamente, lo cual incluye desde una adecuada selección de materias primas hasta la aprobación de Control de Calidad. Para llegar a esto último, se requiere pasar por aspectos propios de la fabricación como son: procesos de mezclado, condiciones de secado, fuerza de compresión, empaque, etc., realizándose bajo la filosofía de las **BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA**.

La **FASE CLÍNICA**, involucra todos los aspectos relacionados a la preparación del estudio de **BIOEQUIVALENCIA** en sujetos humanos como son: instalaciones, servicios, personal médico y de enfermería capacitado, selección de voluntarios, estudios clínicos y de gabinete, protocolo aprobado por un Comité de Ética, aspectos nutricionales, etc., sin olvidar que todos estos puntos deben ser cubiertos bajo las **BUENAS PRACTICAS CLÍNICAS**, que no sólo asegurarán la confiabilidad de las muestras biológicas obtenidas, en cuanto a cronología, integridad y almacenamiento; sino también en cuanto a la seguridad y derechos humanos de los sujetos participantes en el estudio.

Posterior a la obtención de las muestras biológicas provenientes del estudio clínico, se presenta la **FASE ANALÍTICA** la cual incluye todos los aspectos relacionados con la obtención del análisis cuantitativo de las muestras biológicas, asegurando que el método analítico a utilizar haya sido validado previamente, cumpliendo los criterios vigentes de validación en cuanto a estabilidad, especificidad, sensibilidad, función respuesta, precisión y exactitud, además de una adecuada capacitación de analistas y personal técnico, mantenimiento y calibración del instrumental analítico, procedimientos estándar de operación de los aspectos propios del desempeño analítico, etc., realizándose todos los puntos anteriormente descritos bajo la guía de las **BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO**.

Como parte concluyente del estudio de **BIOEQUIVALENCIA** está la **FASE ESTADÍSTICA**, la cual en los últimos años ha experimentado avances importantes en nuevos métodos estadísticos para la determinación de la **BIOEQUIVALENCIA**. Esta fase involucra, el cumplimiento de lineamientos o guías emitidos por organismos regulatorios, donde se aconseja el uso de paquetería computacional especializada como **SAS^{MR}** y **BIOPAK^{MR}**, las cuales deben haber sido validadas; se debe contar con procedimientos estándar de operación de todas las actividades involucradas desde el traspaso de los resultados analíticos hasta el informe del análisis estadístico.

Por último, la elaboración del **INFORME FINAL**, incluyendo todas y cada una de las fases involucradas en el estudio de **BIOEQUIVALENCIA**, requiere también de una estructura y organización para conjuntar, dar coherencia y claridad al documento, incluyendo personal vario (investigadores, secretarías, traductores, etc.), tiempo y esfuerzo importantes, que deben

GENERALIDADES

considerarse como otra parte valiosa en el éxito de un estudio de BIOEQUIVALENCIA con fines regulatorios

2.7.2.DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

2.7.2.1. DEFINICIONES DEL CODE OF FEDERAL REGISTER: 21 CFR Ch I(4-1-91 Edition) Parte 320: REQUISITOS DE BIODISPONIBILIDAD Y BIOEQUIVALENCIA.³⁷

BIODISPONIBILIDAD: velocidad y cantidad a la cual el principio activo o la entidad terapéutica es absorbida de un producto farmacéutico y llega a estar disponible en el sitio de acción.

PRODUCTO FARMACÉUTICO: forma farmacéutica p. ej. comprimido, cápsula, o solución, que contiene al principio activo generalmente, pero no necesariamente, en asociación con los ingredientes inactivos

EQUIVALENTES FARMACÉUTICOS: productos farmacéuticos que contienen el mismo fármaco, i.e. la misma sal o éster del mismo principio activo en idénticas formas de dosificación, pero no necesariamente los mismos ingredientes inactivos (excipientes) y que cumplen con los requisitos farmacopéuticos o requerimientos estándar de identidad, dosis, calidad y pureza incluyendo potencia, y donde es aplicable, uniformidad de contenido, desintegración y/o disolución.

ALTERNATIVAS FARMACÉUTICAS: productos farmacéuticos que contienen la misma entidad terapéutica (fármaco) o su precursor, pero no necesariamente en la misma cantidad o forma de dosificación o como la misma sal o éster, que cumplen los requisitos de control de calidad en cuanto a identidad, pureza y dosis, incluyendo potencia y donde es aplicable uniformidad de contenido, desintegración y/o disolución

PRODUCTOS BIOEQUIVALENTES: significa equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas, en los cuales no se observa una diferencia significativa en cuanto a la velocidad y cantidad absorbida del fármaco, cuando son administrados ya sea en dosis única o múltiple a la misma dosis molar de la identidad terapéutica bajo condiciones experimentales similares. Algunos equivalentes o alternativas farmacéuticas, pueden ser equivalentes en la cantidad absorbida, pero no en la velocidad de absorción y aún considerarse bioequivalentes, porque tales diferencias en la velocidad de absorción son intencionales y no son esenciales para la obtención de concentraciones efectivas terapéuticas en el organismo en uso crónico o son considerados clínicamente insignificantes para el producto farmacéutico estudiado en particular

GENERALIDADES

REQUISITO DE BIOEQUIVALENCIA significa un requisito impuesto por la FDA para una prueba *in vitro/in vivo* de los productos farmacéuticos especificados los cuales deben ser satisfechos como una condición de comercialización.

Los fármacos y productos farmacéuticos deberán cumplir el requisito de BIOEQUIVALENCIA cuando:

- a) La forma farmacéutica en la que se presenta el producto debe sufrir un proceso de **DISOLUCIÓN Y ABSORCIÓN**: formas orales, ya sean de liberación inmediata, controlada o prolongada, suspensiones, supositorios, etc.
- b) Se desee comercializar un producto farmacéutico en los E.U. bajo la asignación de "Abbreviated new drug application" ante la FDA, después del 7 de julio de 1977.

2.7.3.PUNTOS DE VISTA INTERNACIONALES: ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA, CANADÁ, COMUNIDAD ECONÓMICA EUROPEA (C.E.E.) y JAPÓN

2.7.3.1.PERSPECTIVAS REGULATORIAS EN LOS ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA (E.U. y CANADÁ)³⁵:

Para un amplio grupo de fármacos que presentan características farmacocinéticas lineales y sin requisitos de dosificación críticos, las autoridades regulatorias de la Comunidad Europea, Canadá y Estados Unidos han acordado en aceptar un modelo similar para realizar las pruebas de bioequivalencia, en donde para éste tipo de fármacos se ha llegado a armonizar en algunos requerimientos como son: estudio de dosis única, azarizado, cruzado de dos vías, y realizado en sujetos sanos bajo supervisión médica de acuerdo a la Declaración de Helsinki, involucrando un Comité de Ética independiente. En los estudios se obtendrán muestras sanguíneas a tiempos adecuados y se analizarán el fármaco inalterado y/o metabolitos ya sea en plasma o suero, para poder estimar la absorción, distribución y eliminación del fármaco bajo estudio en comparación al producto de referencia. El número de voluntarios puede obtenerse de los cálculos de "potencia" con un conocimiento previo de la variabilidad intra-sujeto. El producto de referencia generalmente es el producto innovador o el líder del mercado, pero en muchas jurisdicciones debe ser el producto aceptado en ese mercado.

Los principales parámetros para la evaluación de bioequivalencia son el **ÁREA BAJO LA CURVA DEL TIEMPO O AL ÚLTIMO TIEMPO DE MUESTREO ($ABC_{0,t}$)** y la **CONCENTRACIÓN MÁXIMA OBSERVADA (C_{max})**

GENERALIDADES

El tiempo al que se alcanza la concentración máxima ($t_{m\acute{a}x}$), no es muy utilizado como parámetro de bioequivalencia por la variabilidad que presentan los resultados.

No se ha llegado a un completo acuerdo en los tratamientos estadísticos, las diferencias entre los criterios de E.U., la C.E.E. y Canadá son mínimas, como se puede observar en la TABLA 1. Canadá y la C.E.E. prefieren la transformación logarítmica de los datos de concentración plasmática obtenidos y para E.U. se observa los datos sin transformación de $ABC_{90\%}$ y

$C_{m\acute{a}x}$

TABLA 1
CRITERIOS PARA DETERMINAR BIOEQUIVALENCIA

VARIABLE	C.E.E.	E.U.	CANADÁ
$ABC_{90\%}$	Log 90% I.C.	datos crudos;	Log. I.C.
	80-125%	"two one-sided" 80-120%	80-125%
$C_{m\acute{a}x}$	log I.C. 90% 70-143%	Como ABC	Media geom.** 80-125%
$t_{m\acute{a}x}$	De acuerdo al fármaco	Como ABC y $C_{m\acute{a}x}$ ***	Fármacos "no complicados" no se utiliza.

C.E.E.: Comunidad Económica Europea

E.U.: Estados Unidos de Norteamérica

* La prueba doble unilateral ("two one sided") es equivalente al intervalo de confianza al 90%.

** El intervalo de confianza (I.C.) al 90% bajo consideración para armonización con la Comunidad Económica Europea (C.E.E.)

*** El criterio de $t_{m\acute{a}x}$ no parece ser rígidamente aplicado.

Para el $ABC_{90\%}$, los europeos han adoptado el intervalo de confianza al 90% y requieren que la media geométrica del producto de prueba con respecto a la de referencia, caiga dentro del intervalo del 80 al 125%. En Canadá se ha utilizado el intervalo de confianza al 95%, con éste mismo criterio de decisión se está proponiendo cambiar al I.C. del 90%. La Food and Drug Administration (FDA) después de examinar varios procedimientos desde el tiempo de introducción (1977) de la regulación de la Bioequivalencia, ahora aplica la prueba de los dos unilaterales descrita por Shurman en 1987. Esta prueba da decisiones idénticas al intervalo de confianza clásico al 90%, pero cuando son analizados los datos crudos, el intervalo es de 80-120%, aunque aparentemente éste intervalo es más riguroso que el 80-125%, las escalas geométricas y aritméticas no son comparables.

2.7.3.2 PERSPECTIVAS REGULATORIAS EN LA ARMONIZACIÓN DE LOS REQUISITOS DE BIODISPONIBILIDAD Y BIOEQUIVALENCIA EN LA COMUNIDAD ECONÓMICA EUROPEA (C.E.E.)³³

En el caso particular de formas farmacéuticas de liberación rápida, la C.E.E. considera un estudio con diseño experimental cruzado o si son varios productos farmacéuticos los que se comparan con el de referencia, se recomienda un diseño de "múltiple change-over" para reducir la variabilidad. Se pueden elegir otros diseños si se justifica plenamente la causa de la elección. La asignación del tratamiento a los voluntarios debe ser al azar. No hay un criterio generalmente aceptado para definir los casos en los cuales sea necesario realizar estudios al "estado estacionario". La nueva guía de la C.E.E. establece que se podrán realizar estudios en el "estado estacionario" cuando

- a) Existen problemas en la sensibilidad del método que impida una determinación precisa de la concentración plasmática.
- b) La variabilidad intraindividual en las concentraciones plasmáticas o en la velocidad de disposición es inherentemente grande.
- c) Fármacos que presenten farmacocinética dosis o tiempo-dependiente
- d) Productos de liberación prolongada

En cuanto a los aspectos de Estadística, la C.E.E. ha establecido que los principales parámetros son el ABC y $C_{máx}$, y existe el consenso en que los datos deben ser logarítmicamente transformados antes de realizar cualquier análisis estadístico. El número de sujetos debe ser calculado antes de iniciar el estudio y es parte del protocolo.

Asimismo se establece como requisito para los principios activos nuevos que la disponibilidad sistémica sea comparada con una administración intravenosa, siempre y cuando las características del fármaco lo permitan y de no ser así, se deberá administrar el fármaco en solución.

Para un nuevo principio activo que se planea lanzar al mercado en una forma farmacéutica que no ha sido utilizada en estudios clínicos, se requiere estudio de bioequivalencia demostrando equivalencia con la forma farmacéutica utilizada en los ensayos clínicos. En el caso de fármacos ya aprobados, donde se propone la misma vía de administración y la misma forma de liberación, el producto debe demostrar equivalencia con el innovador.

Los criterios para la decisión de la bioequivalencia se basan en la elección de un intervalo de confianza paramétrico o no paramétrico $100(1-\beta)\%$ y decidir para la equivalencia si el intervalo de confianza está completamente contenido dentro del rango de aceptación clínica. Siendo ABC y $C_{máx}$ los parámetros de interés, las reglas han sido definidas de acuerdo al rango de aceptación clínica. El cociente del ABC del producto de

GENERALIDADES

prueba respecto al producto innovador es el principal parámetro de interés. El intervalo de confianza al 90% del cociente de las medianas de las ABC, deben estar normalmente situadas dentro de un intervalo rango de 0.80 a 1.25, llamado rango de bioequivalencia. El intervalo de confianza para el cociente de las medianas de C_{max} , debe estar normalmente situado dentro de un intervalo de 0.7-1.43; en el caso particular de un índice terapéutico estrecho el intervalo de bioequivalencia debe estar entre 0.8-1.25. Este enfoque está a favor de los límites de confianza y ha demostrado dar resultados equivalentes a la prueba doble unilateral propuesta por Shūirman y adoptada por la FDA.

2.7.3.3. PERSPECTIVAS REGULATORIAS DE LA BIODISPONIBILIDAD Y BIOEQUIVALENCIA EN EL JAPÓN²⁴.

Las regulaciones de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia fueron extensamente revisadas por el Ministerio de Salud en 1980 dando como conclusión que éste tipo de estudios debe realizarse en sujetos sanos, bajo condiciones de ayuno, asimismo coinciden en que los parámetros que establecen la bioequivalencia son C_{max} y el Area Bajo la Curva (ABC) del tiempo 0 al último tiempo de muestreo, calculada por la regla trapezoidal. Las muestras sanguíneas deben colectarse con suficiente frecuencia (por lo menos 7 muestras) durante por lo menos tres vidas medias. Se propone el uso de un diseño cruzado para corregir la variación intrasujeto. La bioequivalencia se concluye al comparar la diferencia del valor medio de los parámetros de ABC_{0-t} y C_{max} del producto de prueba con respecto al producto de referencia y que estén dentro del 80 al 120%. Las medias de ABC_{0-t} y C_{max} son comparadas por un Análisis de Varianza (ANADEVA) en el cual menos de un 20% de la diferencia de un parámetro entre el producto de referencia, puede ser detectado como una diferencia significativa a un nivel de $\alpha = 0.05-0.1$ y $\beta = 0.2$. Además de un ANADEVA, también se propone el uso del intervalo de confianza al 95%, en los casos donde es detectada una diferencia significativa, debida a la excesiva potencia del ANADEVA. También se proponen estudios de disolución o en animales para evaluar cambios menores en las formulaciones para la evaluación de la bioequivalencia de los productos.

EFEECTO DE LA ACIDEZ GÁSTRICA EN LA BIODISPONIBILIDAD DE UN FÁRMACO. Muchas Farmacopeas prescriben el uso de medios de disolución a pH de 1.2 para evaluar las propiedades farmacéuticas de un producto de uso oral. Sin embargo, la acidez gástrica baja tiende a incrementarse con la edad. Estudios hechos en población japonesa han demostrado discrepancias en la biodisponibilidad de acuerdo a la acidez gástrica de los sujetos. Por lo tanto, es deseable que el producto presente una velocidad de disolución constante en un rango de pH de 1 a 7 para asegurar una biodisponibilidad adecuada aún en sujetos hipoclorhídricos o

GENERALIDADES

aclorhídricos. Así, la regulación japonesa propone la inclusión de sujetos normoclorhídricos, aclorhídricos e hipoclorhídricos en los estudios de biodisponibilidad o bioequivalencia de formas de dosificación oral.

La biodisponibilidad está representada por los parámetros de ABC, C_{max} y t_{max} , sin embargo se considera que la variabilidad de este último parámetro es muy grande, para ser utilizado al evaluar la biodisponibilidad de un producto farmacéutico. El TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (TMR), un parámetro obtenido por análisis de momentos, es también solamente una función de la biodisponibilidad. El TMR expone el mismo grado de potencia (o sea baja variabilidad intrasujeto) como C_{max} y ABC_{0-1} , sin tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los fármacos y las formas farmacéuticas. El TMR se recomienda como un parámetro que representa la proporción de fármaco biodisponible en la evaluación de formulaciones de liberación sostenida de acuerdo a las guías japonesas. Sin embargo el valor límite de TMR para bioequivalencia es todavía un problema.

CAPITULO 3
PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. SELECCIÓN DE PRODUCTOS: De acuerdo al objetivo del trabajo se revisó el "Orange Book"⁵² con el fin de seleccionar el producto de referencia para realizar el estudio de bioequivalencia de un producto genérico de METRONIDAZOL comprimidos 500 mg. El producto innovador marcado en el "Orange Book" tiene una clasificación AB (mantenimiento de sus características de innovador), lo cual asegura su permanencia como producto de referencia para realizar el estudio de bioequivalencia.

Los productos evaluados en el estudio fueron:

PRODUCTO DE PRUEBA:

NOMBRE: METRONIDAZOL 500 mg

PRESENTACIÓN: Comprimidos recubiertos

LABORATORIO: NACIONAL

NO. DE LOTE: 208004

PRODUCTO DE REFERENCIA:

NOMBRE: FLAGYL 500 mg

PRESENTACIÓN: Comprimidos recubiertos

LABORATORIO: SEARLE, U.S.A.

NO. DE LOTE: 0691-076

3.2. PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD

Para proceder a realizar el estudio de bioequivalencia, se evaluó previamente si ambos productos cumplían con las especificaciones de control de calidad indicadas tanto por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) como por la United States Pharmacopea (USP) XXII 1990 y USP 23 National formulary (NF) 18, 1995 3-6.

Las pruebas realizadas para cada uno de los productos fueron:

1) Identificación (Ensayo de identidad)

2) Pruebas físicas: Dureza, Friabilidad y Desintegración

**3) Pruebas químicas: Ensayo (Valoración del principio activo),
uniformidad de contenido y disolución.**

PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1. ENSAYO DE IDENTIDAD.

Esta prueba fue realizada como se describe en la USP XXII y 23³⁴. Se utilizó METRONIDAZOL U.S.P. como sustancia de referencia.

3.2.2. PRUEBAS FÍSICAS.

3.2.2.1. DUREZA:

Esta prueba se realizó con un durómetro Schleuniger en 10 comprimidos.

3.2.2.2. FRIABILIDAD:

Se determinó con un friabilizador Roche en 10 comprimidos.

3.2.2.3. TIEMPO DE DESINTEGRACIÓN

Determinado de acuerdo con la U.S.P. XXII y 23³⁴, utilizando agua destilada como medio de desintegración.

3.2.2.4. VALORACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO: Determinada de acuerdo con la U.S.P. XXII Y 23³⁴. Se utilizó METRONIDAZOL U.S.P. como sustancia de referencia.

3.3. ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN

La cantidad disuelta se determinó en 6 comprimidos, siguiendo el procedimiento descrito en la U.S.P. XXII y 23³⁴ y Suplemento 6 ⁶². Esta prueba se realizó en 12 comprimidos utilizando 900 mL de agua y 900 mL de ácido clorhídrico 0.1 N como medio de disolución.

Tiempos de muestreo : 10, 20, 30, 40 y 60 minutos

3.4. ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA

3.4.1 FASE ANALÍTICA: La fase analítica del estudio de Bioequivalencia de METRONIDAZOL comprimidos 500 mg constó de las siguientes actividades descritas en secuencia cronológica.

A) VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO

-PREVIA AL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA (IN-VITRO)

B) ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LOS SUJETOS

VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO

-DURANTE EL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA (IN VIVO)

PARTE EXPERIMENTAL

3.4.1.1. SUSTANCIAS DE REFERENCIA:

METRONIDAZOL Sustancia de referencia USP lote H (RS USP)

TINIDAZOL Sustancia de referencia secundaria, SIGMA.

3.4.1.2. SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA EVALUACIÓN DE SELECTIVIDAD:

CLORTALIDONA, IBUPROFEN, METILDOPA, SULFAMETOXAZOL, TRIMETOPRIM, ÁCIDO ASCÓRBICO, CAFEÍNA ANHIDRA y SALICILAMIDA.
(MATERIAS PRIMAS CERTIFICADAS DE DIFERENTES PROVEEDORES)

3.4.1.3. REACTIVOS :

Acetonitrilo HPLC, FISHER SCIENTIFIC
Acido fosfórico R.A. ACS, J.T. BAKER
Fosfato de potasio monobásico, R.A. ACS, J.T. BAKER
Agua HPLC 12 mΩ obtenida a partir de agua desionizada con equipo MILLI-Q, WATERS.
Dicromato de sodio, R.A. ACS, J.T. BAKER
Acido sulfúrico, R.A. ACS, J.T. BAKER
Tolueno, R.A. ACS, J.T. BAKER
Diclorometil silano, grado reactivo ALDRICH
Metanol, R.A. ACS, MALLINCKRODT
Metanol HPLC, MALLINCKRODT

EQUIPO :

Centrífuga BECKMAN MODELO TJ6
Pipetas automáticas EPPENDORF 4780
Micropipetas LABSYSTEM FINNPIPETTE (5-50 µL, 50-200 µL y 200-1000 µL)
Potenciómetro BECKMAN φ45

EQUIPO CROMATOGRÁFICO

Sistema de entrega de multisolventes, WATERS 600 unidad de fluidos
Sistema de entrega de multisolventes, WATERS 600 E unidad de control
Inyector automático WATERS 717
Detector de longitud de onda variable WATERS 486
Integrador WATERS 745

PARTE EXPERIMENTAL

3.4.1.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

3.4.1.4.1. SOLUCIÓN REGULADORA DE FOSFATOS 0.01 M pH 3.5 : En un matraz volumétrico de 1000 mL colocar 1.36 g de fosfato de potasio monobásico Disolver y llevar a volumen con agua CLAR (12 mL). Ajustar el pH de la solución a 3.5 ± 0.03 con ácido fosfórico diluido (1:1 v/v).

FASE MÓVIL : Mezclar solución reguladora de fosfatos 0.01 M pH 3.5 con Acetonitrilo grado CLAR en una proporción de 85:15, filtrar la solución a través de una membrana Millipore tipo GV de 0.22 μm o equivalente. Desgasificar la solución durante 5 minutos con agitación suave y burbujeo de nitrógeno.

3.4.1.4.2. SOLUCIONES ESTÁNDAR UTILIZADAS PARA LA VALIDACION DEL MÉTODO:

PLASMA

Para la preparación de las curvas patrón y la diversas soluciones a utilizar en la validación del método analítico, se obtuvo plasma humano de acuerdo a la Norma Técnica número 277 para la disposición de sangre humana de la Secretaría de Salud. Se evaluaron los diversos lotes de plasma previamente adicionados de heparina (anticoagulante que se utilizó para las muestras provenientes de 12 sujetos sanos voluntarios) de acuerdo al método propuesto para evaluar si presentaban alguna interferencia de componentes endógenos al procesarse con el método propuesto para cuantificar METRONIDAZOL.

SOLUCIONES EN PLASMA PARA EVALUAR FUNCIÓN RESPUESTA Y CURVAS PATRÓN EN PLASMA :

Obtener diluciones de METRONIDAZOL en plasma cuyas concentraciones sean de 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 10.0 y 20.0 $\mu\text{g/mL}$.

Distribuir cada una de éstas soluciones en alícuotas de 0.5 mL a tubos de ensayo de fondo cónico de 13 x 100 mm y almacenar inmediatamente a -40°C .

SOLUCIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD EN ALMACENAMIENTO EN ULTRACONGELACION (-40°C) DE LAS MUESTRAS PLASMATICAS, EXACTITUD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO.

Se prepararon soluciones plasmáticas de METRONIDAZOL a concentraciones de 0.5, 8.0 y 17.0 $\mu\text{g/mL}$.

PARTE EXPERIMENTAL

SOLUCIÓN DE ESTÁNDAR INTERNO.

Obtener una disolución en Acetonitrilo grado C.L.A.R de Tinidazol a concentración de 7.5 µg/mL.

SOLUCIONES EN EL DISOLVENTE DE INYECCIÓN PARA EL CALCULO DEL PORCIENTO DE RECOBRO ABSOLUTO.

Evaluar el recobro absoluto de METRONIDAZOL en plasma usando muestras de plasma adicionadas con METRONIDAZOL y disoluciones acuosas de METRONIDAZOL preparadas en un intervalo de concentración de 0.5-20.0 µg/mL, en los mismos niveles de concentración especificados en el punto 3.3.4.6.1.

SOLUCIONES PARA EVALUACIÓN DE SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.

Se prepararon disoluciones etanólicas de los siguientes fármacos a concentraciones equivalentes al $C_{p,max}$ reportado en la literatura⁴²:

CAFEÍNA (3 µg/mL),
ACIDO ASCÓRBICO (solución acuosa 50 µg/mL),
IBUPROFEN (25 µg/mL),
CLORTALIDONA (0.1 µg/mL),
SALICILAMIDA (300 µg/mL),
SULFAMETOXAZOL (40 µg/mL),
TRIMETOPRIM (2 µg/mL),
METILDOPA (2.5 µg/mL)

Todas las sustancias de referencia secundaria fueron certificadas internamente en el laboratorio donde se validó el método.

3.5. MÉTODO POR C.L.A.R. PARA CUANTIFICAR METRONIDAZOL EN PLASMA.

El método analítico utilizado para la cuantificación de METRONIDAZOL en plasma, está basado en el método publicado por MARQUES y col²¹ con modificaciones para la optimización del mismo.

PARTE EXPERIMENTAL

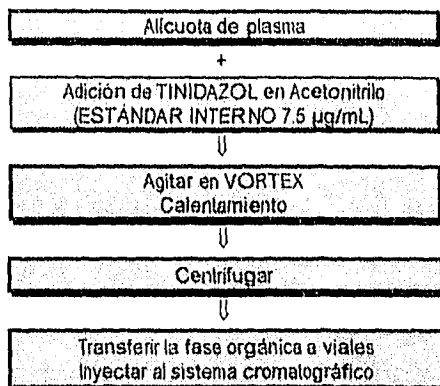


FIGURA 4: PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METRONIDAZOL EN PLASMA

3.5.1. PROCESO DE EXTRACCIÓN DE METRONIDAZOL EN PLASMA:

Transferir una alícuota de plasma a un tubo de ensayo de fondo cónico, adicionar una alícuota de la solución de estándar interno de tinidazol en acetonitrilo, agitar, transferir el tubo a un baño de calentamiento, centrifugar e inyectar una alícuota del sobrenadante al sistema cromatográfico. En la FIGURA 4 se esquematiza el procedimiento utilizado

3.5.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS: Las condiciones cromatográficas utilizadas durante el análisis de las muestras fueron las siguientes:

COLUMNA: µBondapak C18, de 10 µm, 30 cm de longitud x 3.9 mm de diámetro interno (WATERS).
FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.01 M, pH 3.5 y Acetonitrilo (85:15 V/V)
GUARDACOLUMNA: Acero inoxidable de 3.9 mm de diámetro interno x 25 mm de longitud, rellena con empaque µBondapak C18 de 37-55 µm
VELOCIDAD DE FLUJO: 1.2 mL/min
DETECCIÓN: UV a 313 nm
ATENUACIÓN: Ajustar el valor de atenuación para obtener una respuesta entre el 40 o 60% de la carta.
RESPUESTA: Altura relativa del METRONIDAZOL (altura METRONIDAZOL/altura Tinidazol).

PARTE EXPERIMENTAL

3.6. VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO ANTES DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA:

Los criterios adoptados para la validación del método analítico fueron los propuestos en la reunión de armonización "Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies"⁵⁵ realizada en diciembre de 1990 en Washington, D.C., así como de otras propuestas para la aplicación de métodos analíticos a estudios de bioequivalencia.⁵⁶⁻⁵⁷ El método fue evaluado bajo los siguientes parámetros analíticos:

3.6.1. SELECTIVIDAD :

Se evaluó en cada experimento inyectando las muestras procesadas de plasma blanco provenientes de 12 sujetos y de blanco de reactivos. Además, para evaluar la selectividad a los principales metabolitos del METRONIDAZOL, se analizaron muestras plasmáticas provenientes de sujetos voluntarios sanos después de la administración de comprimidos de METRONIDAZOL 500 mg, de quienes se obtuvieron muestras sanguíneas a las 0, 3 y 10 horas después de la administración, para confirmar la no interferencia de los compuestos endógenos del plasma y/o metabolitos de METRONIDAZOL. Se evaluó la posible interferencia de algunos fármacos como: ácido ascórbico, cafeína, clortalidona, ibuprofen, metildopa, salicilamida, sulfametoxazol y trimetoprim, inyectando disoluciones de éstos fármacos en el sistema cromatográfico para cuantificar METRONIDAZOL, asegurando así la no interferencia de estos fármacos en la región cromatográfica del METRONIDAZOL.

3.6.2. FUNCIÓN RESPUESTA (LINEALIDAD) :

Para evaluar la función respuesta entre concentración y respuesta se prepararon durante cuatro días curvas patrón de METRONIDAZOL en plasma a las siguientes concentraciones: 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 20.0 µg/mL procesando seis réplicas por punto de concentración evaluado en cada uno de los experimentos.

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para obtener la ecuación de la recta y verificar la consistencia de pendientes y ordenadas durante los cuatro días de análisis.

Se estableció la variación de la respuesta utilizando la información de las curvas realizadas en días distintos. A partir de las alturas de METRONIDAZOL y Tinidazol se obtuvieron las alturas relativas, a las cuales se les aplicó una regresión lineal con respecto a la concentración, calculándose la pendiente (m), el intercepto (x) y el coeficiente de determinación (r^2) y la calidad de ajuste con respecto a la recta ajustada de los puntos experimentales, los cuales se utilizaron para establecer la función respuesta (linealidad) de las dos variables.

PARTE EXPERIMENTAL

La calidad del ajuste se evaluó comparando las concentraciones calculadas en la recta ajustada con respecto a la concentración verdadera

3.6.3. EXACTITUD:

La exactitud del método fue evaluada empleando soluciones en plasma, a las que se les adicionó METRONIDAZOL a concentraciones de 0.5, 0.8 y 17.0 µg/mL preparadas por sextuplicado y analizándose durante cuatro días, calculando la concentración por interpolación de la respuesta en una curva patrón en plasma. Las concentraciones interpoladas se compararon contra el valor real y se determinó el porcentaje de desviación absoluta respecto a la concentración nominal de la muestra

3.6.4. PRECISIÓN :

Esta fue evaluada con los datos de concentración interpolada de las muestras para determinar la exactitud del método a partir de los cuales se calculó el coeficiente de variación (CV%) a cada nivel de concentración para un día (PRECISIÓN INTRADIA) y el (CV%) a cada nivel de concentración para los 4 días de evaluación (PRECISIÓN INTERDIA).

3.6.5. LIMITE DE DETECCIÓN :

El límite de detección del método se evaluó al procesar diluciones sucesivas de muestras de plasma conteniendo METRONIDAZOL en solución en plasma blanco, considerando como límite de detección aquella concentración que al procesarse e inyectarse produce una respuesta de 2 a 4 veces el nivel del ruido del instrumento de registro de la señal.

3.6.6. LIMITE DE CUANTIFICACIÓN :

Se estableció el límite de cuantificación para aquella concentración mínima en el intervalo dinámico de trabajo que cumpliera con lo establecido para linealidad, exactitud y precisión, entendiéndose por límite de cuantificación la menor concentración del compuesto de interés en una muestra, la cual sea cuantificada con exactitud y precisión aceptable bajo las condiciones normales de operación.

3.6.7. RECOBRO ABSOLUTO :

Los recobros de METRONIDAZOL en muestras plasmáticas, se evaluaron en los niveles de concentración de 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 20.0 µg/mL. Los cálculos se realizaron comparando la relación de alturas de los picos de METRONIDAZOL/Tinidazol (estándar interno), en una curva patrón preparada en el disolvente de inyección contra muestras plasmáticas adicionadas de METRONIDAZOL las cuales fueron procesadas e inyectadas de acuerdo al método propuesto. Ambas curvas fueron procesadas con 5 réplicas por punto.

PARTE EXPERIMENTAL

Para obtener el porcentaje de recobro absoluto, se comparó la relación de alturas de METRONIDAZOL y TINIDAZOL para las muestras acuosas y en plasma

3.6.8. ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS EN EL DISOLVENTE DE INYECCIÓN:

Se aseguró la reproducibilidad de la altura relativa de picos al inyectar las muestras en el disolvente de inyección (Acetonitrilo CLAR) durante un período de 48 horas. Para éste propósito, se procesaron soluciones de METRONIDAZOL en plasma a concentraciones de 0.5, 8.0 y 17.0 µg/mL. y se mantuvieron a condiciones ambientales del laboratorio y se inyectaron a las 0, 12, 24, 36, y 48 horas después de su preparación. Se calculó la media de las alturas relativas de los picos a cada tiempo, la concentración interpolada y el CV%.

3.6.9. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A LARGO PLAZO.

La estabilidad de METRONIDAZOL en plasma se evaluó utilizando muestras de plasma adicionadas con METRONIDAZOL a las concentraciones de 0.5, 8.0 y 17.0 µg/mL las cuales se almacenaron a -40°C y se evaluaron a los tiempos de 0, 15, 30 y 60 días, éstas muestras se evaluaron tanto con ciclos de congelación-descongelación, como sin ciclos, preparando muestras por triplicado para cada una de las concentraciones en cada uno de los tiempos.

3.7. FASE CLÍNICA: ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA.

La parte clínica del estudio se realizó en las instalaciones de la Asociación Mexicana de Investigación Clínica, A.C. ubicadas en el Hospital de la SS, carretera México-Pachuca, Pachuca, Hidalgo.

3.7.1. SELECCIÓN DE VOLUNTARIOS :

En el estudio de Bioequivalencia participaron 24 voluntarios adultos sanos de sexo masculino cubriendo los siguientes requisitos .

3.7.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Sujetos de sexo masculino entre 18 y 45 años de edad, cuyos pesos corporales fueran proporcionales a su altura y talla, de acuerdo a las Tablas de relación altura/peso del Metropolitan Life Statistical Bulletin, exploración física y análisis clínicos cuyos resultados no difirieran más del 10% de los valores normales, electrocardiograma y placa torácica de rayos X.

PARTE EXPERIMENTAL

3.7.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Los siguientes criterios se consideraron para la exclusión de los posibles voluntarios:

- a) Sujetos con historia médica de disfunciones cardiovasculares, renales hepáticas, metabólicas, gastrointestinales, neurológicas, endocrinas u otras.
- b) Aquellos que necesiten medicación de otro fármaco diferente al del estudio.
- c) Sujetos que hubiesen estado hospitalizados por cualquier razón 8 semanas antes del estudio.
- d) Sujetos que hayan participado en un estudio de un fármaco en investigación, previo al estudio o haya ingerido medicamentos durante 14 días o 5 vidas medias (lo que sea más largo), previas al estudio.
- e) Sujetos clínicamente obesos.
- f) Sujetos con historia reciente de abuso de alcohol o drogas.
- g) Sujetos que hayan donado sangre, 30 días antes del inicio del estudio.

3.7.1.3. INFORME DE CONSENTIMIENTO:

De acuerdo al 21 CFR parte 50: PROTECTION OF HUMAN SUBJECTS¹⁸, los participantes firmaron una hoja de consentimiento. Los voluntarios fueron informados de la naturaleza y fines del estudio, así como de los efectos secundarios del fármaco y las indicaciones a seguir durante la realización del estudio. El formato del informe de consentimiento se encuentra en el APÉNDICE 1.

3.7.2 DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA.

La asignación de los voluntarios se realizó al azar, de manera que los 24 voluntarios se dividieron en 4 grupos constituidos de 6 individuos cada grupo. La administración de los productos de prueba y referencia fue realizada de acuerdo a un diseño de cuadrado latino cruzado de 2 x 2 vías, con bloques al azar (TABLA 2) y a lo dispuesto en la GUÍA FDA DE BIOEQUIVALENCIA DE METRONIDAZOL⁵³

PARTE EXPERIMENTAL

TABLA 2

DISEÑO EXPERIMENTAL EMPLEADO EN EL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE METRONIDAZOL COMPRIMIDOS 500 mg

SUJETO	PERIODO 1	PERIODO 2
01	B	A
02	A	B
03	B	A
04	A	B
05	A	B
06	B	A
07	A	B
08	B	A
09	B	A
10	B	A
11	A	B
12	A	B
13	A	B
14	B	A
15	B	A
16	A	B
17	B	A
18	B	A
19	A	B
20	A	B
21	A	B
22	A	B
23	B	A
24	B	A

**TRATAMIENTO A: PRODUCTO DE REFERENCIA
(FLAGYL 500 mg, SEARLE)
TRATAMIENTO B: PRODUCTO DE PRUEBA
(METRONIDAZOL 500 mg)**

PARTE EXPERIMENTAL

3.7.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL :

Durante ambos períodos del estudio, los voluntarios cumplieron los puntos que a continuación se especifican:

1. Se administró una dosis de un comprimido de 500 mg de METRONIDAZOL en ayunas (10 horas) a cada voluntario, junto con 240 mL de agua y verificación visual, para asegurar la ingestión del comprimido.
2. Los alimentos administrados consistieron de un desayuno estándar servido a las 3 horas después de haber ingerido el medicamento; la comida 6 horas después y la cena 12 horas después de la administración del fármaco. Al día siguiente de la administración del fármaco, se sirvió el desayuno a las 9 AM, la comida a la 1 PM y la cena a las 7 PM. Todas las comidas fueron ingeridas en un período de 20 a 25 min.
3. A los voluntarios se les aconsejó evitar ingerir cualquier tipo de alimentos y bebidas, excepto agua, la cual fue ingerida *ad libitum*.
4. Se obtuvieron 10 mL de sangre venosa mediante venopunción con catéter de tipo "Punzocat" núm. 18, acondicionado con una jeringa insulínica conteniendo heparina para mantener la permeabilidad del mismo.
5. El horario de toma de muestras sanguíneas fue el siguiente: 0.0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 30 y 36 horas después de la administración del fármaco.
6. Se dejó una semana de "lavado" entre una administración y otra, con la finalidad de asegurar la completa eliminación de la primera dosis del fármaco.
7. Cada muestra sanguínea fue depositada en un tubo heparinizado, con identificación de voluntario, hora de toma de muestra, fecha y una clave que al final del análisis se descodificó para conocer el tratamiento y tiempo correspondientes. Se separó el plasma por centrifugación de cada muestra, el cual se colocó en dos criotubos (aproximadamente 2 mL) y se almacenó a -40°C hasta el momento de su análisis.

PARTE EXPERIMENTAL

3.8. ANÁLISIS DE MUESTRAS

Después de la realización del estudio de bioequivalencia, las muestras plasmáticas permanecieron almacenadas en un ultracongelador a temperatura de -40°C . Un día antes de realizar el análisis, se transportaron a un congelador con una temperatura de almacenamiento de -12°C y posteriormente se dejaron descongelar en la mesa de trabajo, hasta alcanzar temperatura ambiente para proceder a su análisis. Las muestras plasmáticas fueron cuantificadas de acuerdo al método descrito en la sección 3.4.1.,

El análisis de muestras se llevó a cabo de acuerdo a un plan de trabajo previamente revisado y aprobado. Este plan de trabajo estableció que las muestras de dos sujetos se analizarían en un día por día, usando equipos cromatográficos diferentes. Los analistas desconocían el tiempo de muestreo y el tratamiento correspondiente, conociendo únicamente el período al cual pertenecían las muestras y el sujeto del cual provenían.

3.8.1. CORRIDA CROMATOGRÁFICA DEL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE UN SUJETO.

Para cada sujeto el análisis incluyó una curva patrón con seis puntos en el intervalo dinámico de trabajo y los Puntos Control de Calidad (PC) se analizaron por triplicado a cada nivel, asegurándose así la exactitud y precisión de los resultados obtenidos. Además en cada corrida analítica, también se procesaron blanco de plasma y blanco de reactivos para evaluar posibles interferencias de compuestos químicos o biológicos, incluyendo soluciones de identificación de METRONIDAZOL y tinidazol, cuyos tiempos de retención sirvieron de referencia para identificar los obtenidos en las muestras plasmáticas de los sujetos. Se incluyó un punto de precisión para evaluar la adecuabilidad del sistema cromatográfico. Esta solución se inyectó seis veces determinando que el CV% de las alturas relativas de los picos de METRONIDAZOL y tinidazol fuera menor al 2%, asegurando de esta manera la operación satisfactoria del equipo.

CÁLCULOS

Se determinó la altura relativa (altura de pico de METRONIDAZOL/altura de pico de tinidazol) de los puntos de la curva patrón la cual se graficó contra la concentración de METRONIDAZOL. La ecuación de la recta se calculó por el método de mínimos cuadrados, calculando la pendiente, el intercepto y el coeficiente de determinación. Las alturas relativas obtenidas de los cromatogramas de las muestras analizadas, se sustituyeron en la ecuación de la recta calculando la concentración de METRONIDAZOL correspondiente.

PARTE EXPERIMENTAL

3.8.2. PUNTOS CONTROL DE CALIDAD

Cada día de análisis de las muestras, se incluyó un grupo de puntos control de calidad preparados a tres niveles de concentración dentro del intervalo dinámico de trabajo: alto, medio y bajo; estas muestras se insertaron por triplicado y al azar cada determinado número de muestras durante la corrida analítica. Los niveles de concentración fueron los mismos utilizados durante la validación del método analítico.

Punto Control A (PCA) = 6.500 µg/mL

Punto Control B (PCB) = 17.500 µg/mL

Punto Control C (PCC) = 0.500 µg/mL

La respuesta de los Puntos Control se utilizó como criterio para la aceptación o rechazo del análisis. Este criterio establece que no más de dos puntos control de calidad caigan fuera del intervalo de $\pm 15\%$ del valor verdadero, y no más de un punto en una misma concentración debe caer fuera del intervalo del $\pm 15\%$.

3.9. VALIDACION DEL MÉTODO DURANTE EL ANÁLISIS DE MUESTRAS DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA (VALIDACION *IN VIVO*).

La validación en ésta etapa se llevó a cabo conjuntamente al análisis de muestras del estudio de bioequivalencia, para ello se cubrieron los siguientes puntos:

3.9.1. ESTABLECIMIENTO DE LA CORRIDA CROMATOGRÁFICA: Esta se realizó analizando en un mismo día las muestras de un sujeto en sus dos periodos, curva patrón y los puntos control de calidad los cuales se incluyeron al azar cada 8 a 12 muestras.

3.9.2. CURVAS PATRÓN: Las pendientes, interceptos y coeficientes de correlación de las curvas patrón incluidas en el análisis de cada uno de los sujetos, se compararon al final del análisis del total de las muestras de los sujetos del estudio de bioequivalencia, utilizando el siguiente criterio de aceptación: el coeficiente de variación (CV%) de las pendientes (m), ordenadas (x) y coeficientes de correlación (r), no deberá ser mayor al 2%.

CAPITULO 4
RESULTADOS

RESULTADOS

4. PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD

4.1. CARACTERISTICAS FISICAS DEL PRODUCTO

PRODUCTO DE PRUEBA: Metronidazol 500 mg

DESCRIPCION: Comprimido tipo caplet, con recubrimiento uniforme de color blanco, libre de partículas extrañas. Por una cara grabados con las letras AF y en la otra AA2.

LARGO: 20.23 mm ANCHO: 7.20 mm

PRODUCTO DE REFERENCIA: Metronidazol 500 mg

DESCRIPCION: Comprimido tipo caplet, con recubrimiento uniforme de color azul, libre de partículas extrañas. Por una cara grabados con las leyenda FLAGYL y en la otra 500.

LARGO: 16.07 mm ANCHO: 7.28 mm

En la TABLA 3 se encuentran los resultados obtenidos en las pruebas de control de calidad.

TABLA 3
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD DEL PRODUCTO DE REFERENCIA (Flagyl) Y DEL PRODUCTO DE PRUEBA (Metronidazol 500 mg)

PRUEBA	METRONIDAZOL 500 mg	FLAGYL 500 mg
ABSORCION AL UV	Similar al estándar USP	Similar al estándar USP
TIEMPO DE RETENCION EN CLAR:	Corresponde al estándar	Corresponde al estándar
PESO PROMEDIO ESPECIFICACION 816 mg/comprimido	810.1 mg	778.4 mg
VARIACION DE PESO	CONFORME	CONFORME
FRIABILIDAD ESPECIFICACION No más de 0.8%	0.04%	0.00%
DUREZA ESPECIFICACION Entre 10 y 14 Kp	11.16 Kp	18.56 Kp
DESINTEGRACION ESPECIFICACION No más de 5 min	3 min 21 seg	1 min 24 seg
VALORACION DEL P.A.	METRONIDAZOL PRUEBA X= 98.59%	FLAGYL REFERENCIA X= 99.50%
UNIFORMIDAD DE CONTENIDO	METRONIDAZOL PRUEBA N = 10 X= 100.03% C.V.% = 0.88	FLAGYL REFERENCIA N = 10 X= 100.97% C.V.% = 0.99

RESULTADOS

4.2. ESTUDIO "IN VITRO" PRUEBA DE DISOLUCION

En las TABLAS 4A Y 4B se presentan los resultados de la prueba de disolución efectuada tanto al producto de prueba como al de referencia. En las FIGURAS 5 Y 6 se presentan los gráficos correspondientes.

4.2.1. RESULTADOS DE LA DISOLUCION EN ACIDO CLORHIDRICO 0.1 N

TABLA 4A

METRONIDAZOL PRUEBA (A) (500 mg) N=12		FLAGYL REFERENCIA (B) (500 mg) N=12				
		TIEMPOS DE MUESTREO				
PRODUCTO		10	20	30	40	60
		MINUTOS				
A	X=	83.96	98.01	99.34	99.93	100.22
B	X=	87.96	97.82	99.50	99.64	99.70
A	D.E.	5.5311	1.0019	0.6949	0.9822	1.1386
B	D.E.	5.8666	1.9627	0.8577	0.6290	0.6455
A	C.V.%	6.59	1.02	0.70	0.98	1.13
B	C.V.%	6.67	2.01	0.86	0.63	1.65

4.2.2. RESULTADOS DE LA DISOLUCION EN AGUA DESIONIZADA

TABLA 4B

METRONIDAZOL PRUEBA (A) (500 mg) N=12		FLAGYL REFERENCIA (B) (500 mg) N=12				
		TIEMPOS DE MUESTREO				
PRODUCTO		10	20	30	40	60
		MINUTOS				
A	X=	72.17	90.27	95.53	97.11	98.09
B	X=	70.89	88.57	95.05	97.02	99.39
A	D.E.	1.9101	1.2960	1.3269	1.2086	1.2620
B	D.E.	5.5585	4.4161	1.6104	1.4738	2.5248
A	C.V.%	2.65	1.44	1.39	1.24	1.29
B	C.V.%	7.84	4.99	1.69	1.52	2.54

FIGURA 5
PERFILES DE DISOLUCION EN HCl 0.1 N
N=12

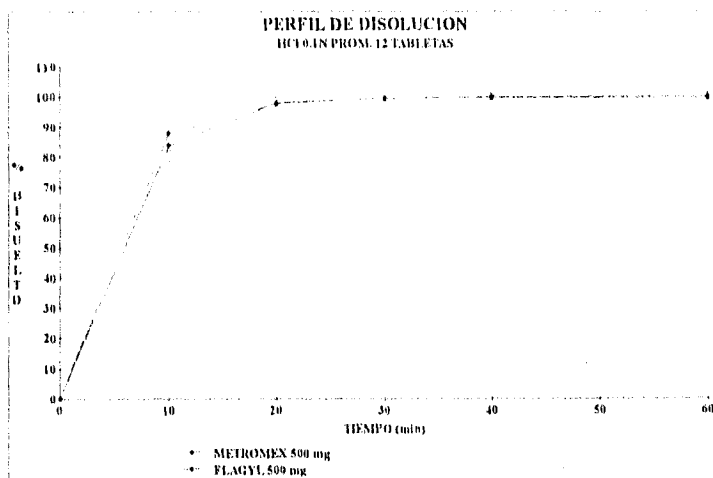
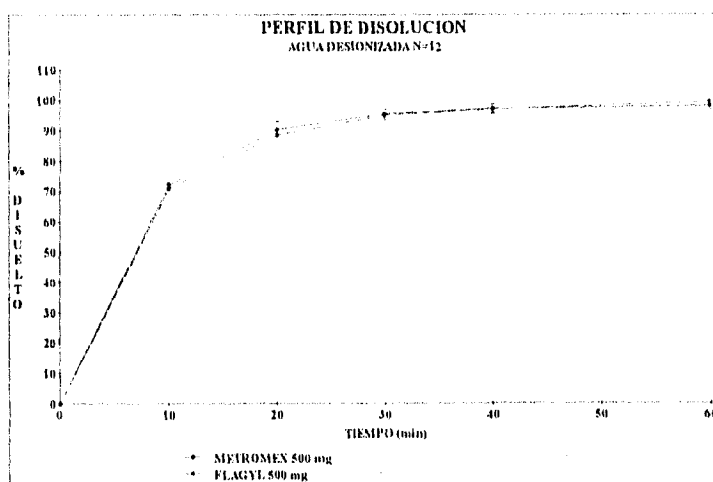


FIGURA 6
PERFILES DE DISOLUCION EN AGUA DESIONIZADA



ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA**4.3. VALIDACION PREVIA DEL METODO ANALITICO****4.3.1. DESARROLLO DEL METODO**

El sistema cromatográfico descrito en la sección 3.4.1.2., permitió obtener los picos de Metronidazol y Tinidazol con buena forma y simetría (FIGURA 9A) con tiempos de retención de 5.5 min y 10.5 min respectivamente. La detección al UV permitió la suficiente sensibilidad para determinar con precisión 0.5 µg/mL y detectar 0.05 µg/mL utilizando una muestra de 0.5 mL de plasma.

4.3.2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO :**4.3.2.1. FUNCION RESPUESTA:**

La TABLA 5 presenta los valores de pendiente (m), intercepto (a) y coeficiente de determinación (r^2) obtenidos a partir de los cálculos de regresión lineal de los resultados de altura relativa de metronidazol/tinidazol. A partir de la interpolación de las alturas relativas, se calculó la concentración y se evaluó la calidad de ajuste de la concentración obtenida con respecto a la recta ajustada (TABLA 6) y el porcentaje de desviación absoluta con respecto al valor nominal de concentración adicionada (TABLA 7). Las rectas obtenidas al graficar la concentración calculada con la ecuación de la recta y la concentración obtenida experimentalmente se presentan en las FIGURAS 7 y 8.

4.3.2.2. EXACTITUD:

En la TABLA 8 se presentan los resultados de EXACTITUD del metodo en el intervalo de concentración de 0.5 a 20.0 µg/mL. El porcentaje de diferencia absoluta entre cada concentración calculada y su concentración verdadera se muestra en la TABLA 9.

RESULTADOS

TABLA 5
CURVAS PATRON DE METRONIDAZOL EN PLASMA DE 0.5 A 20 mcg/mL

DIA	PENDIENTE + ERROR ESTANDAR DE LA PENDIENTE (% COEFICIENTE DE VARIACION)	INTERCEPTO	r ²
DIA 1	0.2641096 + 0.0014447 (0.547)	0.0234	0.998984
DIA 2	0.2849002 + 0.0016092 (0.565)	-0.0044	0.998917
DIA 3	0.2934146 + 0.0013412 (0.457)	-0.0015	0.999290
DIA 4	0.2907984 + 0.0011174 (0.384)	0.0069	0.999498

TABLA 6
CALIDAD DE AJUSTE PARA LAS CURVAS PATRON DE METRONIDAZOL EN PLASMA CONCENTRACIONES INTERPOLADAS

	CONCENTRACIONES VERDADERAS (mcg/mL)					
	0.500	1.000	2.000	5.000	10.000	20.000
	CONCENTRACIONES INTERPOLADAS DE METRONIDAZOL (mcg/mL)					
No. DATOS	24	24	24	24	24	24
MEDIA	0.5270	0.9768	1.9476	5.1530	9.8561	20.0393
D.E.	0.039588	0.039164	0.047231	0.228662	0.176574	0.322850
C.V. (%)	7.51	4.01	2.43	4.44	1.79	1.61
						3.63

TABLA 7

**CURVAS PATRON DE METRONIDAZOL EN PLASMA:
PORCIENTO DE DESVIACION ABSOLUTA DE
LAS CONCENTRACIONES INTERPOLADAS**

		CONCENTRACION DE METRONIDAZOL (mcg/mL)					
		0.50	1.00	2.00	5.00	10.00	20.00
DIA	PORCIENTO DE DESVIACION ABSOLUTA						
DIA 1							
No. DE DATOS	6	6	6	6	6	6	6
MEDIA	6.40	7.62	5.02	6.30	1.04	0.61	
DIA 2							
No. DE DATOS	6	6	6	6	6	6	6
MEDIA	11.70	2.03	2.08	3.02	2.47	1.83	
DIA 3							
No. DE DATOS	6	6	6	6	6	6	6
MEDIA	9.50	0.83	1.51	1.23	1.46	1.54	
DIA 4							
No. DE DATOS	6	6	6	6	6	6	6
MEDIA	6.88	2.67	3.03	3.06	2.14	0.71	

FIGURA 7
CURVA PATRON DE METRONIDAZOL EN PLASMA
0.5 A 20.0 µg/mL

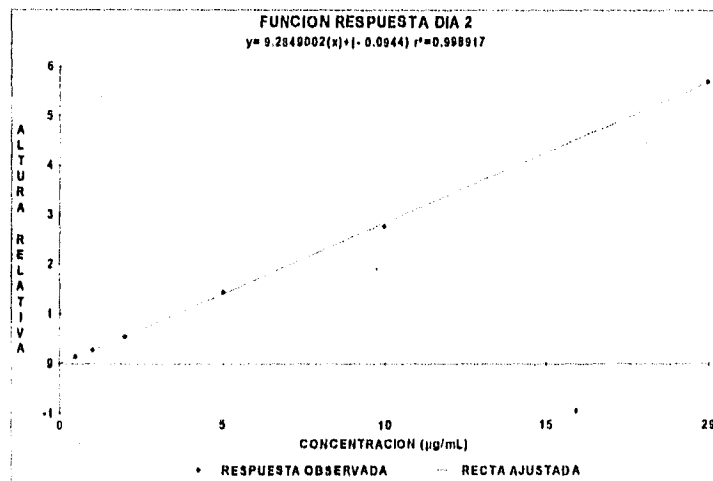
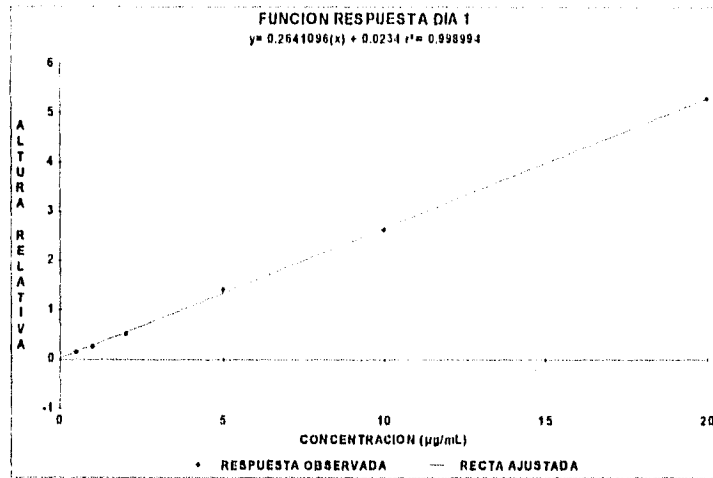
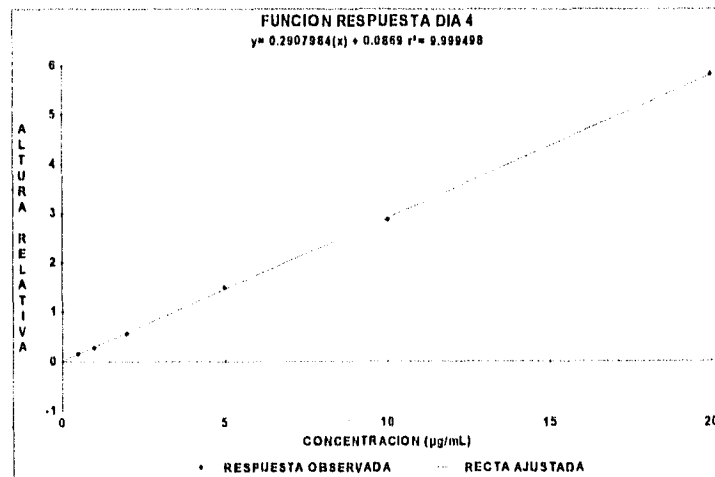
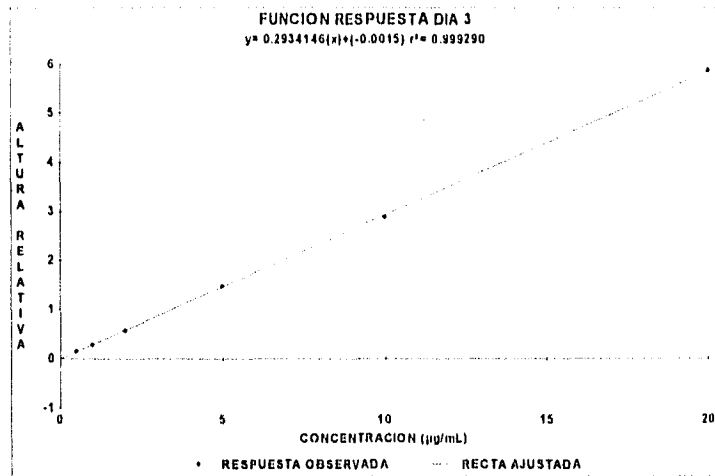


FIGURA 8
CURVA PATRON DE METRONIDAZOL EN PLASMA
0.5 A 20.0 µg/mL



RESULTADOS

**TABLA 8:
EXACTITUD Y PRECISION
CONCENTRACIONES DE METRONIDAZOL ENCONTRADAS EN PLASMA
ADICIONADO**

	PUNTOS PROBADOS (mcg/mL)			
	0.500	8.000	17.000	
DIA	CONCENTRACIONES ENCONTRADAS (mcg/mL)			
DIA 1				
No. DE DATOS	6	6	6	
MEDIA	0.517	7.985	16.761	
D.E.	0.008914	0.144920	0.212819	
C.V. (%)	1.72	1.81	1.27	1.60
DIA 2				
No. DE DATOS	6	6	6	
MEDIA	0.475	8.093	17.265	
D.E.	0.012545	0.074241	0.141726	
C.V. (%)	2.64	0.92	0.82	1.46
DIA 3				
No. DE DATOS	6	6	6	
MEDIA	0.548	7.043	16.543	
D.E.	0.014959	0.029777	0.095217	
C.V. (%)	2.73	0.38	0.58	1.23
DIA 4				
No. DE DATOS	6	6	6	
MEDIA	0.509	8.072	17.303	
D.E.	0.010289	0.088017	0.174728	
C.V. (%)	2.02	1.09	1.01	1.37
TOTAL				
No. DE DATOS	24	24	24	
MEDIA	0.512	7.998	16.960	
D.E.	0.028708	0.133277	0.365170	
C.V. (%)	5.62	1.67	2.15	3.15

RESULTADOS

TABLA 9

EXACTITUD Y PRECISION.

**PORCIENTO DE DESVIACION ABSOLUTA DE LAS
CONCENTRACIONES DE METRONIDAZOL ENCONTRADAS
EN PLASMA ADICIONADO**

FECHA	PUNTOS PROBADOS (mcg/ml)		
	0.500	8.000	17.000
DIA 1			
MEDIA	3.47	1.28	1.41
D.E.	1.782882	1.162917	1.252332
DIA 2			
MEDIA	5.03	1.17	1.56
D.E.	2.508917	0.929231	0.833581
DIA 3			
MEDIA	9.57	1.97	2.68
D.E.	2.991766	0.371681	0.559559
DIA 4			
MEDIA	1.93	1.16	1.78
D.E.	1.831575	0.755107	1.027476

4.3.2.3. PRECISION:

Las concentraciones interpoladas de la evaluación de precisión (variación intradía de muestras replicadas) y la reproducibilidad (variación interdía) se presentan en la TABLA 8. Para cada concentración se calculó el promedio aritmético y el coeficiente de variación de las seis réplicas en cada día y para el periodo de los cuatro días (n=24). El porcentaje de desviación absoluta de las concentraciones interpoladas en los diferentes días se presentan en la TABLA 9.

4.3.2.4. SENSIBILIDAD: LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION:

El límite de cuantificación del método fue de 0.5 mcg/mL y el límite de detección se encontró en la concentración de 0.05 mcg/mL.

4.3.2.5. SELECTIVIDAD:

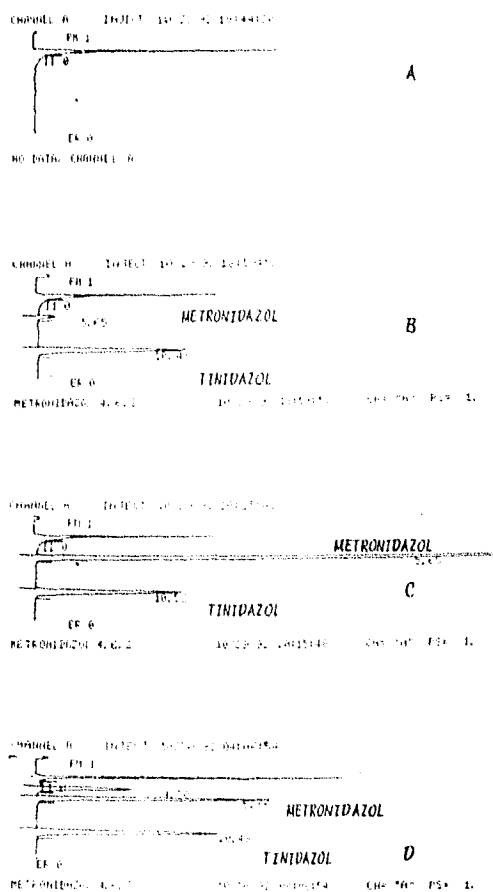
El método demostró ser selectivo asegurando por una parte la ausencia de interferencias de cualquier metabolito del Metronidazol, lo cual se estableció asegurando la pureza de los picos correspondientes a Metronidazol y Tinidazol, evaluándose al sobreponer el espectro de tres tiempos de elución representativos de cada uno de los picos en cuestión.

La FIGURA 9B muestra una concordancia satisfactoria del espectro ajustado, monitoreado de 220 nm a 380 nm, para ambos compuestos. Además se aseguró la selectividad y la identidad de cada uno de los picos por una comparación punto a punto de los espectros obtenidos en las muestras de plasma comparativamente al espectro de Metronidazol sustancia de referencia USP y tinidazol sustancia de referencia de trabajo.

Por otro parte, la respuesta de los fármacos probados indicados en la FIGURA 10 y la del blanco de plasma no mostraron interferencias en la región cromatográfica correspondiente a los tiempos de elución del Metronidazol y del Tinidazol.

RESULTADOS

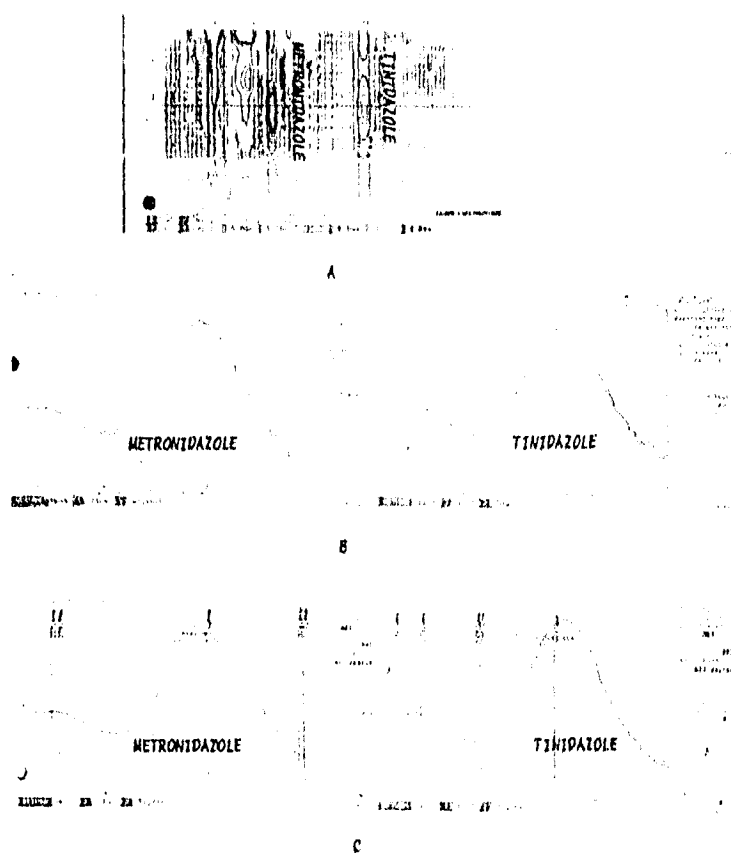
FIGURA 9 A
CROMATOGRAMAS TÍPICOS DEL ANÁLISIS
CROMATOGRÁFICO DE METRONIDAZOL



- A: Blanco de plasma**
- B: Punto de curva patrón 0.5 µg/mL**
- C: Punto de curva patrón 20.0 µg/mL**
- D: Muestra de un sujeto que ingirió Metronidazol 500 mg**

RESULTADOS

FIGURA 9 B
ANÁLISIS ESPECTRAL CON ARREGLO DE DIODOS
DE UNA MUESTRA PROVENIENTE DE UN SUJETO
QUE INGERIÓ METRONIDAZOL (500 mg)



A: Análisis espectral de contorno (313 nm)
B: Sobreposición espectral de METRONIDAZOL y tinidazol
C: Comparación espectral de METRONIDAZOL y tinidazol
respecto a sus correspondientes sustancias de referencia (USP)

RESULTADOS

FIGURA 10: CROMATOGRAMAS DE FARMACOS ANALIZADOS EN EL SISTEMA CROMATOGRAFICO DE METRONIDAZOL

A) BLANCO DE PLASMA

B) CLORTALIDONA

C) IBUPROFEN

D) METILDOPA

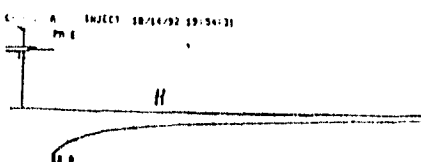
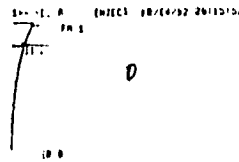
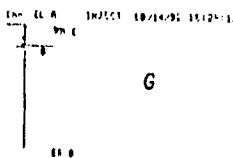
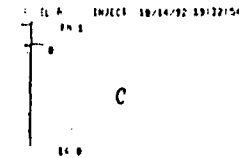
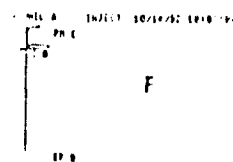
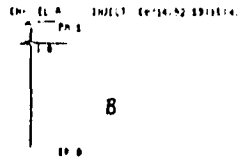
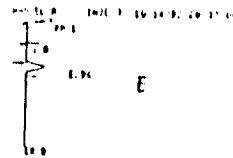
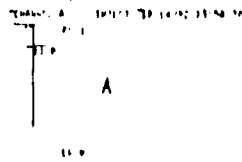
E) SULFAMETOXAZOL

F) TRIMETOPRIM

G) ACIDO ASCORBICO

H) CAFEINA

I) SALICILAMIDA



RESULTADOS

4.3.2.6. RECOBRO ABSOLUTO:

En la TABLA 10 se muestra el porcentaje de recobro de metronidazol en plasma y agua. Este varió de 100.54 a 102.58 % (promedio = 101.44%) en el intervalo de concentración de 0.5 a 20.0 µg/mL.

4.3.2.7. ESTABILIDAD DURANTE LA INYECCION:

En la TABLA 11 se presentan los resultados de las concentraciones interpoladas de las muestras procesadas en un intervalo de 48 horas. La relación de alturas presentó un promedio de variación de 2.93%, y la carta control que contiene los datos de la relación de alturas contra el tiempo (FIGURA 11) muestra que las replicas no variaron más del 15% de la respuesta original.

4.3.2.8. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A LARGO PLAZO:

Los resultados de la evaluación de estabilidad de las muestras plasmáticas con ciclos de congelación-descongelación se presentan en la TABLA 12 con la correspondiente carta control de calidad (FIGURA 12) que representa la concentración cuantificada contra los días de almacenamiento, los resultados correspondientes a la evaluación de las muestras sin ciclos de congelación-descongelación se encuentran en la TABLA 13 y su respectiva representación gráfica en la FIGURA 13.

TABLA 10

PORCIENTO DE RECOBRO DE METRONIDAZOL RELACION DE ALTURA DE PICOS

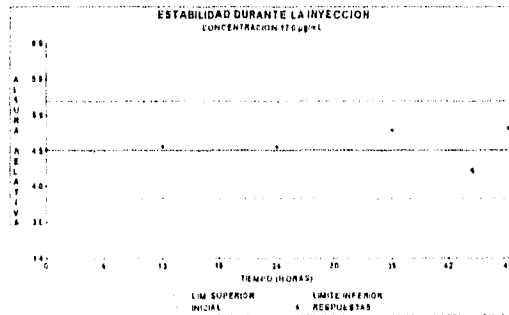
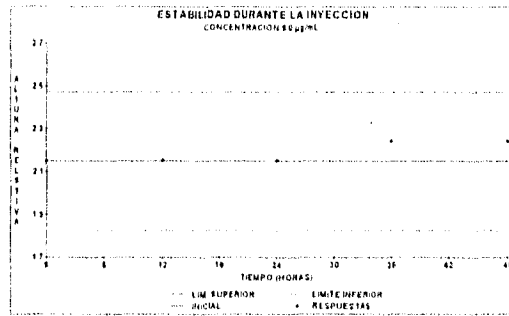
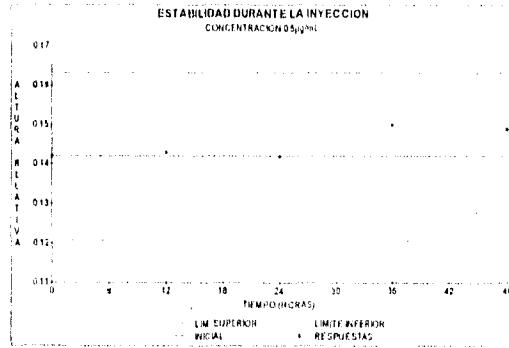
	PUNTOS PATRON (mcg/mL)					
	0.500	1.000	2.000	5.000	10.000	20.000
CURVA	0.1510	0.3009	0.5974	1.5180	3.0072	6.0241
PATRON	0.1432	0.3003	0.5885	1.4846	3.0483	6.0719
EN	0.1474	0.2961	0.5999	1.4987	3.0599	6.1001
AGUA	0.1508	0.2991	0.5873	1.4921	3.0204	6.0990
	0.1485	0.2919	0.5887	1.4825	3.0279	6.0203
MEDIA	0.1482	0.2977	0.5924	1.4952	3.0327	6.0631
D.E.	0.0032	0.0037	0.0056	0.0143	0.0213	0.0390
C.V. (%)	2.16	1.24	0.98	0.96	0.70	0.64
CURVA	0.1457	0.2975	0.6087	1.5135	3.0262	6.0634
PATRON	0.1476	0.3016	0.5984	1.4938	3.0396	6.1171
EN	0.1518	0.3001	0.6126	1.5079	3.0901	6.1586
PLASMA	0.1492	0.3034	0.6087	1.5334	3.0276	6.2118
	0.1505	0.3101	0.6101	1.5378	3.1085	6.2556
MEDIA	0.1490	0.3025	0.6077	1.5173	3.0584	6.1613
D.E.	0.0024	0.0047	0.0054	0.0183	0.0383	0.0758
C.V. (%)	1.61	1.55	0.89	1.21	1.25	1.23
PORCIENTO DE RECOBRO	100.54	101.61	102.58	101.48	100.85	101.62
					GLOBAL: 101.44	

RESULTADOS

TABLA 11
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DURANTE LA INYECCION

MUESTRA	TIEMPO (HORAS)	CONCENTRACIONES VERDADERAS (mcg/mL)		
		0.500	8.000	17.000
		RELACION DE ALTURA DE PICOS		
No. DE DATOS	0	5.000	5.000	5.000
MEDIA		0.142	2.151	4.519
D.E.		0.002286	0.015790	0.058409
No. DE DATOS	12	5.000	5.000	5.000
MEDIA		0.143	2.156	4.565
D.E.		0.002772	0.011074	0.057778
No. DE DATOS	24	5.000	5.000	5.000
MEDIA		0.142	2.155	4.563
D.E.		0.001041	0.009669	0.079009
No. DE DATOS	36	5.000	5.000	5.000
MEDIA		0.150	2.245	4.795
D.E.		0.002370	0.015325	0.125277
No. DE DATOS	48	5.000	5.000	5.000
MEDIA		0.149	2.244	4.825
D.E.		0.003209	0.019979	0.187609
No. DE DATOS		25.000	25.000	25.000
MEDIA		0.145	2.190	4.653
D.E.		0.004406	0.047277	0.167662
C.V. (%)		3.04	2.16	3.60
		GLOBAL: 2.93		

**FIGURA 11: ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DURANTE LA INYECCION
EVALUADA EN UN INTERVALO DE 48 HORAS**



RESULTADOS

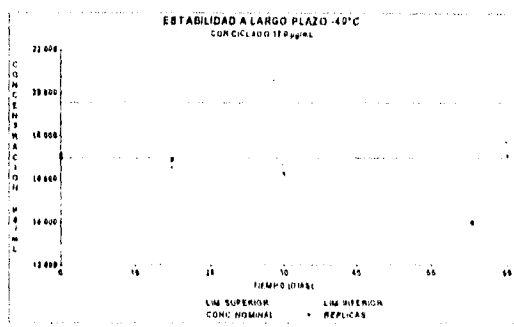
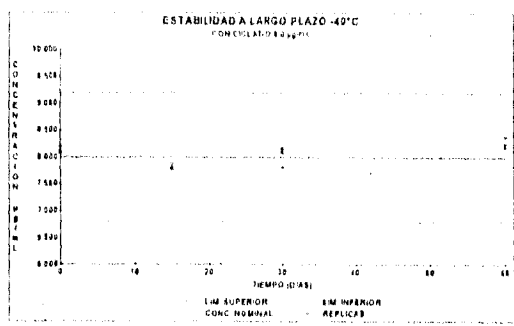
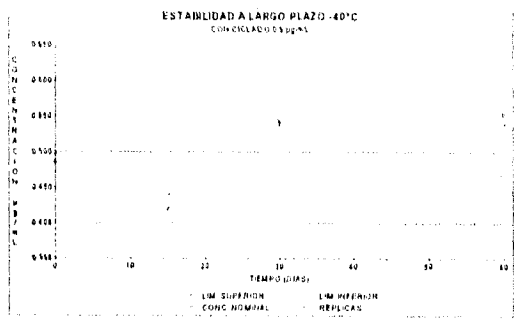
**TABLA 12: ESTABILIDAD DE METRONIDAZOL ALMACENADO A - 40° C
MUESTRAS DE PLASMA CON CICLOS DE CONGELACION-DESCONGELACION**

CONCENTRACIONES DETERMINADAS

	TIEMPO (DIAS)				
	0	15	30	60	
CONCENTRACIONES VERDADERAS (mcg/mL)	CONCENTRACIONES ENCONTRADAS (mcg/mL)				
0.500					
No. DE DATOS	3	3	3	3	12
MEDIA	0.490	0.428	0.542	0.550	0.502
D.E.	0.006429	0.012097	0.003512	0.008505	0.051183
C.V. (%)	1.31	2.83	0.65	1.55	10.20
8.000					
No. DE DATOS	3	3	3	3	12
MEDIA	8.133	7.821	8.024	8.289	8.067
D.E.	0.065826	0.054308	0.185971	0.103326	0.203147
C.V. (%)	0.81	0.69	2.32	1.25	2.52
17.000					
No. DE DATOS	3	3	3	3	12
MEDIA	17.082	16.769	16.407	17.724	16.995
D.E.	0.099651	0.207606	0.254838	0.585690	0.582276
C.V. (%)	0.58	1.24	1.55	3.30	3.43

RESULTADOS

**FIGURA 12: ESTABILIDAD DE METRONIDAZOL ALMACENADO A -40° C
MUESTRAS DE PLASMA CON CICLOS DE CONGELACION-DESCONGELACION**



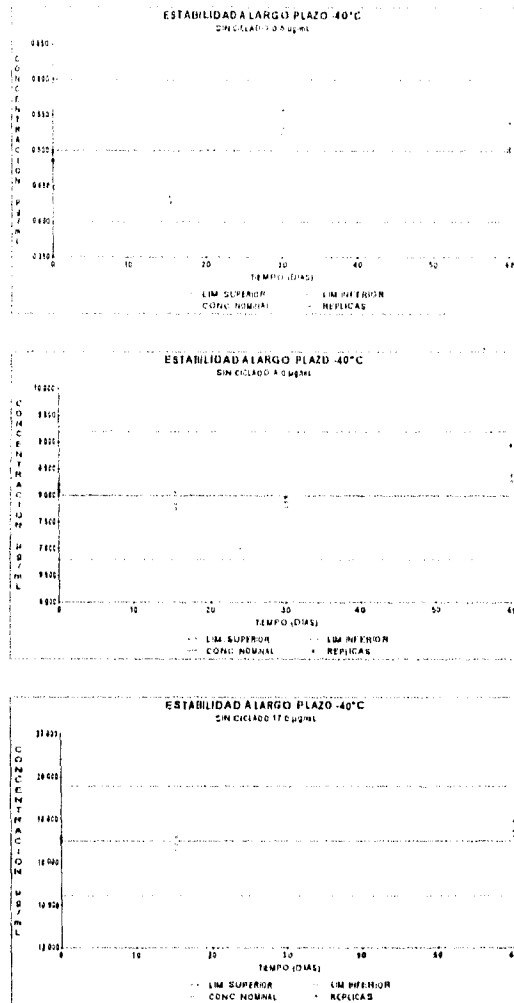
RESULTADOS

**TABLA 13: ESTABILIDAD DE METRONIDAZOL ALMACENADO A -40° C
MUESTRAS DE PLASMA SIN CICLOS DE CONGELACION-DESCONGELACION**

CONCENTRACIONES DETERMINADAS

	TIEMPO (DIAS)				
	0	15	30	60	
CONCENTRACIONES VERDADERAS(mcg/mL)	CONCENTRACIONES ENCONTRADAS (mcg/mL)				
0.500					
No. DE DATOS	3	3	3	3	12
MEDIA	0.490	0.431	0.537	0.514	0.493
D.E.	0.006429	0.004619	0.017388	0.021794	0.043263
C.V. (%)	1.31	1.07	3.24	4.24	8.78
8.000					
No. DE DATOS	3	3	3	3	12
MEDIA	8.133	7.887	7.882	8.542	8.111
D.E.	0.065826	0.156427	0.084050	0.356215	0.329325
C.V. (%)	0.81	1.98	1.07	4.17	4.06
17.000					
No. DE DATOS	3	3	3	3	12
MEDIA	17.082	16.869	16.431	17.532	18.978
D.E.	0.099651	0.307880	0.070086	0.354868	0.462955
C.V. (%)	0.58	1.83	0.43	2.02	2.73

FIGURA 13: ESTABILIDAD DE METRONIDAZOL A -40° C
MUESTRAS DE PLASMA SIN CICLOS DE CONGELACION-DESCONGELACION



RESULTADOS

4.4. VALIDACION DEL METODO ANALITICO DURANTE EL ESTUDIO

4.4.1. CROMATOGRAMAS

La FIGURA 14 muestra los cromatogramas típicos de: una muestra plasmática de un sujeto antes de la administración del fármaco (Metronidazol 500 mg), dos puntos de la curva patrón (0.5 y 20.0 µg/mL) y la muestra plasmática de un sujeto después de la administración de 500 mg de Metronidazol.

4.4.2. CURVAS PATRON

De las curvas patrón preparadas para analizar las muestras del estudio, se obtuvieron los siguientes resultados:

Las pendientes (m) de las 24 curvas patrón estuvieron comprendidas en el intervalo de 0.2850520 a 0.3244883, los interceptos (a) variaron de 0.036750 a 0.006859 y los coeficientes de determinación (r^2) obtenidos para todas las curvas estuvieron dentro del intervalo de 0.999116 a 0.999958 con una media de 0.999748.

4.4.3. PUNTOS CONTROL (PC)

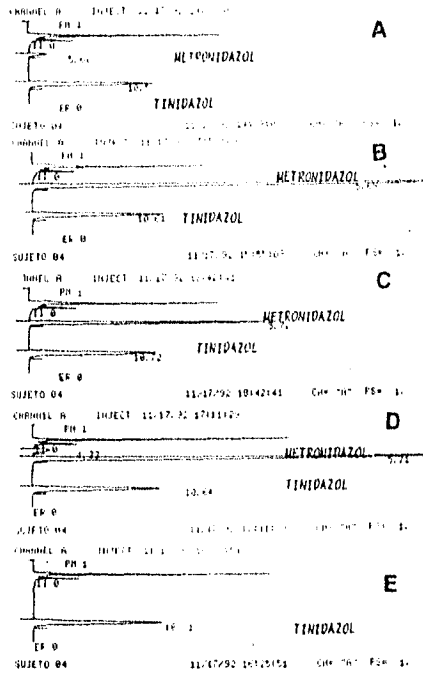
En la TABLA 14 se presentan los resultados de las concentraciones interpoladas de los PUNTOS CONTROL, en la recta de regresión de cada curva patrón realizada para el análisis de las muestras de los 24 sujetos durante el estudio de bioequivalencia.

Los resultados se encuentran en las cartas control de la FIGURA 15, que representa la concentración determinada y los límites superior e inferior para cada nivel de concentración de los puntos control.

TABLA 14
PUNTOS CONTROL DE CALIDAD PARA METRONIDAZOL EN PLASMA
DURANTE EL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA

CONC. ADICIONADA (µg/mL)	RESULTADOS GLOBALES		
	PUNTO A	PUNTO B	PUNTO C
	6.5	17.5	0.55
NUMERO DE DATOS	84	84	84
CONC. PROMEDIO	6.234	16.618	0.545
D.E.	0.246765	0.662623	0.35675
C.V. %	3.96	3.99	6.55

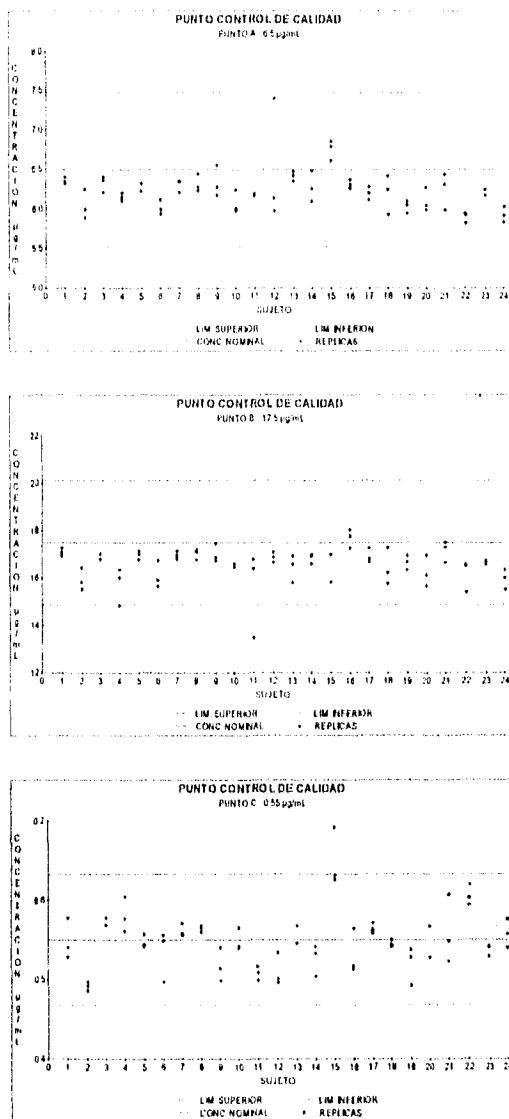
FIGURA 14: CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DEL ANALISIS DE MUESTRAS DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA



- A) Punto 0.5 µg/mL de la curva patrón de METRONIDAZOL
- B) Punto 20.0 µg/mL de la curva patrón de METRONIDAZOL
- C) Punto control A : 6.5 µg/mL
- D) Muestra plasmática del sujeto 4 después de la administración de 500 mg de METRONIDAZOL
- E) Muestra plasmática del sujeto 4 antes de la administración de 500 mg de METRONIDAZOL

RESULTADOS

FIGURA 15 : PUNTOS CONTROL DE CALIDAD DEL ANALISIS DE MUESTRAS DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE METRONIDAZOL COMPRIMIDOS 500 mg



RESULTADOS**4.5. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA****4.5.1. ANALISIS DE LAS MUESTRAS PLASMATICAS**

En la TABLA 15 se presentan las concentraciones promedio de Metronidazol a cada tiempo de muestreo después de la administración de ambos productos. La gráfica correspondiente a estos resultados se presenta en la FIGURA 16.

**TABLA 15: CONCENTRACION PLASMATICA
PROMEDIO (mcg/mL)**

TIEMPO (h)	PROMEDIO A (µg/mL)	CV(%)	PROMEDIO B (µg/mL)	CV(%)
0.25	1.6164	114.2577	1.4379	106.9194
0.50	5.7133	77.1252	5.5885	61.5620
0.75	6.7947	43.9087	7.4651	39.0882
1.00	7.1577	33.5508	7.9087	27.9441
1.50	7.8163	24.0794	8.7678	12.6922
2.00	7.8835	19.0385	8.6137	8.7012
2.50	7.9729	16.0458	8.2723	9.5557
3.00	7.9727	12.3929	7.8464	8.0203
4.00	7.1040	12.2187	6.9427	10.4391
6.00	5.8246	12.4263	5.6785	12.3041
8.00	4.6945	12.5821	4.5284	12.6060
12.00	3.4283	15.4606	3.3641	13.9664
24.00	1.4739	22.3476	1.4739	23.9341
30.00	0.8531	35.0246	0.8400	32.9762
36.00	0.3188	103.5250	0.3339	95.4212

A: REFERENCIA (Flagyl 500 mg)
B: PRUEBA (METRONIDAZOL 500 mg)
CV%: COEFICIENTE DE VARIACION

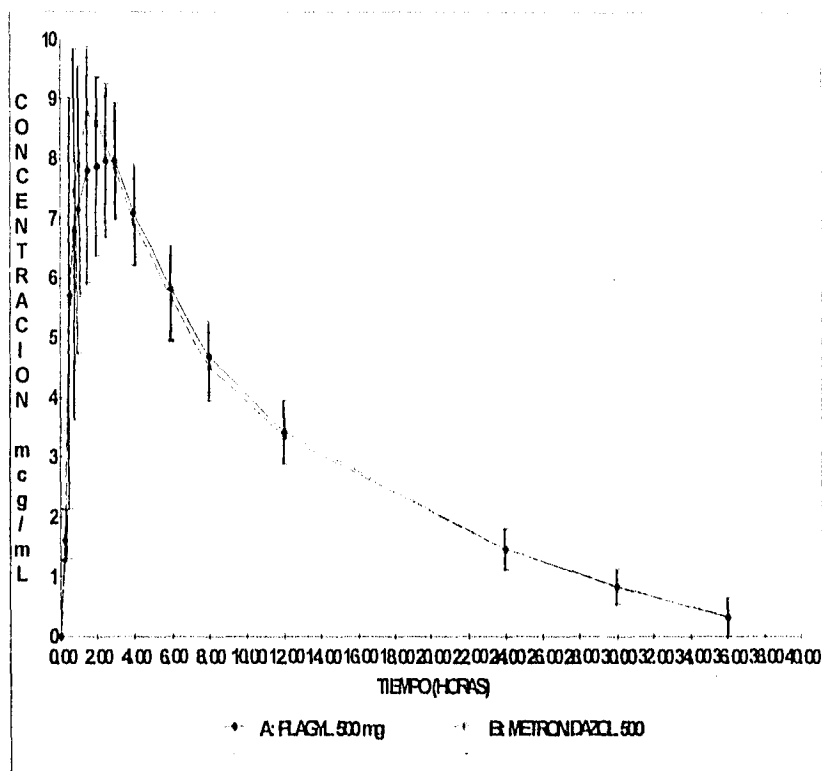


FIGURA 16: VALORES PROMEDIO (n=24) DE LA CONCENTRACION PLASMATICA DE METRONIDAZOL DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE LAS DOS FORMULACIONES DE METRONIDAZOL
A: FORMULACION DE REFERENCIA (Flagyl 500 mg)
B: FORMULACION DE PRUEBA (Metronidazol 500 mg)

4.5.2. PARAMETROS FARMACOCINÉTICOS :

A partir de los valores plasmáticos obtenidos de cada sujeto (APÉNDICE 3), se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos:

Los valores de CONCENTRACION PLASMÁTICA MÁXIMA (C_{max}) y TIEMPO PARA ALCANZAR LA CONCENTRACION PLASMÁTICA MÁXIMA (t_{max}), fueron obtenidos directamente de la gráfica del perfil plasmático, mientras que los valores de AREA BAJO LA CURVA DE 0 A 36 horas (ABC_{0-36}), AREA BAJO LA CURVA DE 0 A INFINITO ($ABC_{0-\infty}$), TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (TMR), VOLUMEN DE DISTRIBUCION APARENTE (Vd/F), DEPURACION (Cl/F) y VIDA MEDIA DE ELIMINACION ($t_{1/2}$) se calcularon de acuerdo a las fórmulas descritas en el APÉNDICE 2.

Los resultados promedio para cada parámetro farmacocinético calculado, se presentan en la TABLA 16. Los resultados individuales de parámetros farmacocinéticos se encuentran en el APÉNDICE 3.

RESULTADOS

TABLA 16: PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE METRONIDAZOL DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE LOS DIFERENTES PRODUCTOS

PARAMETROS FARMACOCINETICOS	MEDIA ARITMETICA +/- D.E.	
	REFERENCIA (A)	PRUEBA (B)
ABC 0-36 (mcg.h/mL)	107.0249 ± 14.2496	106.5836 ± 13.3589
ABC 0-inf (mcg.h/mL)	114.6175 ± 15.4005	114.0205 ± 14.8108
C máx (mcg/mL)	9.5910 ± 2.0853	9.8033 ± 1.2449
t máx (h)	2.0632 ± 1.1990	1.3646 ± 0.7109
TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (h) (TMR)	12.7351 ± 1.3632	12.5680 ± 1.4057
VOLUMEN DE DISTRIBUCION (mL) (Vd/F)	48428.28 ± 6000.73	47779.82 ± 3733.74
DEPURACION (mL/h) (Cl/F)	4440.27 ± 611.70	4460.86 ± 614.71
VIDA MEDIA (h) (t½)	8.8698 ± 0.8743	8.9126 ± 0.9902

AREA BAJO LA CURVA DE 0 A 36 horas (ABC₀₋₃₆), AREA BAJO LA CURVA DE 0 A INFINITO (ABC_{0-inf}), CONCENTRACION PLASMATICA MAXIMA (C_{máx}), TIEMPO (t_{máx}) PARA ALCANZAR LA CONCENTRACION PLASMATICA MAXIMA, TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (TMR), VOLUMEN DE DISTRIBUCION APARENTE (Vd/F), DEPURACION (Cl/F), VIDA MEDIA DE ELIMINACION (t½).

CAPITULO 5
ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1. PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD

De los resultados obtenidos (TABLA 2) se encontró que tanto el **producto de prueba A** (METRONIDAZOL 500 mg) como el **producto de referencia B**, cumplen con las especificaciones, tanto de la FEUM⁶ como de la USP 23 NF 18⁴ no existiendo diferencias significativas entre ambos productos farmacéuticos.

5.2. ESTUDIO DE DISOLUCIÓN

La prueba de disolución ha demostrado en muchos casos ser una prueba *in vitro* que tiene carácter evaluatorio y predictivo del comportamiento *in vivo* del producto farmacéutico analizado, de ahí su importancia, como un indicador de la cinética de absorción del fármaco en el organismo.

5.2.1. DISOLUCIÓN EN AGUA DESIONIZADA : Como lo indica el Suplemento 6⁶³, al realizar la prueba de disolución en agua, los productos cumplen también la especificación de (Q) 85% a los 60 minutos

5.2.2. DISOLUCIÓN EN HCl 0.1 N : La disolución en ácido clorhídrico se ve ligeramente incrementada respecto a los resultados en agua en los primeros tiempos, esto es probablemente debido a las características de solubilidad del METRONIDAZOL en condiciones ácidas. Los productos cumplieron con el requisito de (Q) 85% a los 60 minutos

Con base en estos resultados se consideró que el producto desarrollado cumplía con los requerimientos farmacopéicos y podía ser incluido en el estudio de bioequivalencia.

5.3. VALIDACIÓN IN VITRO O PREVIA AL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA

5.3.1. DESARROLLO DEL MÉTODO

Se realizaron experimentos dirigidos a optimizar la técnica en la parte referente a la precipitación de proteínas plasmáticas, utilizando para ello varios agentes orgánicos; el acetonitrilo fue el que mejores resultados presentó junto con el calentamiento de las muestras en baño de agua a 45°C después de la adición de acetonitrilo y agitación.

El método presenta ciertas ventajas en que es rápido, sencillo y económico, lo cual lo hace un método adecuado para otras aplicaciones, como sería el ajuste de régimen de dosificación de pacientes con terapia de METRONIDAZOL.

5.3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PREVIO AL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA

5.3.2.1. FUNCIÓN RESPUESTA

De los datos de la TABLA 5 y las FIGURAS 7 y 8 se puede observar que el coeficiente de determinación (r^2) fue mayor a 0.998 y el CV% de las pendientes obtenidas fue menor de 0.6%. Los resultados de calidad del ajuste (TABLA 6) de las concentraciones interpoladas en la ecuación de la recta ajustada, para todos los niveles de concentración y el correspondiente porcentaje de desviación absoluta del valor real de concentración (TABLA 7) no fue mayor del 11.70%. La relación entre las variables evaluada por un ANADEVIA a un nivel de significancia del 0.05% demostró una relación altamente significativa entre la respuesta y la concentración. Tomando en consideración los bajos coeficientes de variación de la pendiente, los altos valores del coeficiente de determinación (r^2), así como el análisis de varianza para evaluar la significancia debida al modelo de regresión y la carencia de ajuste, fueron utilizados para establecer la relación y linealidad entre las dos variables; por lo tanto todas las pruebas anteriores apoyan que la relación entre la concentración y la respuesta para las curvas patrón de plasma fue LINEAL en el intervalo de 0.5 a 20.0 µg/mL.

5.3.2.2. EXACTITUD

Para evaluar este parámetro, se utilizaron los valores presentados en la TABLA 8. El porcentaje de diferencia absoluta entre cada concentración calculada y su concentración verdadera se muestra en la TABLA 9, donde se puede ver que la mayor diferencia promedio es de 9.57%. En cualquier día de análisis, el porcentaje de desviación absoluta a cualquier nivel de concentración interpolada y la concentración verdadera varió del 0.06% al 15.00%.

5.3.2.3. PRECISIÓN

La precisión, evaluada como la variación intradía de las réplicas (n=6) de cada nivel de concentración, en cada uno de los cuatro días de análisis y la reproducibilidad como variación interdía, se establecieron utilizando las concentraciones que se encuentran en la TABLA 8 calculando el coeficiente de variación de las seis réplicas en cada día y para el período de los cuatro días (n=24).

Considerando que el intervalo del coeficiente de variación entre los diferentes días, fue de $\pm 0.38\%$ a $\pm 2.73\%$ en las diferentes concentraciones evaluadas y el coeficiente de variación promedio de todos los niveles de concentración evaluados varió de 1.23% a 1.60% el método se consideró preciso. Asimismo se demostró la reproducibilidad del método ya que los valores del coeficiente de variación global de los 4 días se encontraron entre 1.67% y 5.62% (promedio $\pm 3.15\%$), cumpliendo con

ANÁLISIS DE RESULTADOS

amplitud el criterio especificado para la precisión del método del $\pm 15\%$ (± 20 para el límite de cuantificación).

5.3.2.4. LIMITE DE DETECCIÓN LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación del método fue de $0.5 \mu\text{g/mL}$, ya que esta concentración cumple los criterios de linealidad, precisión y exactitud (el promedio de la concentración interpolada en los 4 días de análisis fue $0.512 \mu\text{g/mL}$).

El límite de detección fue de $0.05 \mu\text{g/mL}$, esta concentración presentó una respuesta de dos a cuatro veces el nivel de ruido encontrado en este sistema cromatográfico en particular.

5.3.2.5. SELECTIVIDAD

Se aseguró la selectividad del método evaluando blancos de plasma y de reactivos en cada experimento. Los resultados obtenidos muestran que el método es selectivo a METRONIDAZOL en presencia de su principal metabolito en plasma (2-hidroxi-5-nitroimidazol). Ello se evaluó analizando muestras plasmáticas de dos sujetos a los que se les administró un comprimido de METRONIDAZOL de 500 mg, evaluando la pureza de los picos de METRONIDAZOL y Tinidazol mediante un detector con arreglo de diodos (FIGURA 9B).

La respuesta cromatográfica de los fármacos probados y la del blanco de plasma (FIGURA 10), no presentaron interferencias en el tiempo de elución del METRONIDAZOL y tinidazol.

5.3.2.6. RECOBRO ABSOLUTO

En la TABLA 10 se muestra el porcentaje de recobro de METRONIDAZOL en plasma. Este varió de 100.54% a 102.58% (promedio= 101.44%) en el intervalo dinámico de concentraciones de 0.5 a $20.0 \mu\text{g/mL}$. El recobro fue muy similar en todos los niveles de concentración, lo que habla de una homogeneidad al procesar las muestras.

5.3.2.7. ESTABILIDAD EN EL DISOLVENTE DE INYECCIÓN

A partir de los resultados del análisis de muestras plasmáticas de METRONIDAZOL a 0.5 , 8.0 y $17.0 \mu\text{g/mL}$ preparadas por quintuplicado de acuerdo al procedimiento e inyectadas después de 0 , 12 , 24 , 36 y 48 horas, se calculó el promedio y el coeficiente de variación para cada concentración en cada réplica. Los datos (TABLA 11) muestran que el promedio de variación dentro de la 48 horas fue

de 2.93%. Asimismo en la FIGURA 11 se muestra que las réplicas no varían más del 15% de la respuesta original

5.3.2.8. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO CON CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

Los resultados obtenidos (TABLA 12 y FIGURA 12) indican que después de 60 días de almacenamiento sometidos a congelación-descongelación, las muestras evaluadas a los 15, 30 y 60 días después de su preparación presentan en cualquier nivel de concentración una desviación máxima promedio de 8.67% con respecto a su valor nominal.

Este aspecto es importante desde el punto de vista de manipulación de las muestras plasmáticas desde su obtención hasta el destino final de su análisis, que en la mayoría de los casos, se realizan en una institución diferente a la unidad clínica en donde se efectúan los estudios de bioequivalencia.

5.3.2.9. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO SIN CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

Los resultados obtenidos (TABLA 13 y FIGURA 13) indican que después de 60 días las muestras plasmáticas almacenadas a -40°C, presentan en cualquier nivel de concentración una desviación máxima promedio de 6.58% con respecto a su valor nominal.

5.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS

5.4.1. CROMATOGRAMAS: En la FIGURA 14 se presentan los cromatogramas de muestras plasmáticas del estudio de bioequivalencia, donde puede observarse que tanto en las muestras provenientes de los sujetos que participaron en el estudio, como en el caso de las muestras plasmáticas adicionadas con METRONIDAZOL (curva patrón y puntos control) los picos cromatográficos de METRONIDAZOL y su respectivo estándar interno tinidazol, no presentan interferencias en la región cromatográfica de resolución, lo cual confirma los resultados de especificidad de método analítico previamente descritos.

5.4.2. CURVAS PATRÓN : Las curvas patrón cumplieron los criterios previamente establecidos en 3.9.2.1., donde los coeficientes de variación de las pendientes (m), los interceptos (b) y el coeficiente de determinación (r^2) de las 24 curvas patrón, no fueron mayores al 2%, lo que habla de una precisión homogénea durante todo el análisis de las muestras del estudio de bioequivalencia (APÉNDICE 4).

5.4.3. PUNTOS CONTROL DE CALIDAD

De acuerdo a los datos presentados en la TABLA 14 y su representación gráfica en carta control (FIGURA 15), se puede observar que cumplieron con los criterios de aceptación de (3.8.2.) donde la respuesta de los puntos control se utilizó como criterio de aceptación o rechazo del análisis. Este criterio establece que no más de dos puntos control caigan fuera del intervalo de $\pm 15\%$ de valor verdadero y no más de un punto de una misma concentración debe salir de ese intervalo ($\pm 20\%$ para el límite de cuantificación). La gráfica muestra que los puntos control cuantificados cumplen este criterio, siendo otro punto de apoyo a la precisión y exactitud del análisis de las muestras de los sujetos del estudio

5.5. ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA

5.5.1. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Los resultados obtenidos del análisis farmacocinético (TABLA 16), permitieron analizar la Farmacocinética del METRONIDAZOL en población mexicana donde se puede observar que el fármaco se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, con una **constante de absorción (k_a)*** de **1.72 h⁻¹ (A)** y **1.95 h⁻¹ (B)** muy similar a la reportada en otro estudio en sujetos sanos¹¹. Los valores de **Cp_{máx}** fueron de **9.59 µg/mL (A)** y **9.80 µg/mL (B)**, los cuales no difieren con lo encontrado en diversos estudios farmacocinéticos⁴² después de una dosis de 500 mg, de manera que los valores obtenidos en el presente trabajo concuerdan con estos resultados.

Se observó una baja variabilidad interindividual (ver resultados de pruebas de hipótesis TABLA 21). La **vida media ($t_{1/2}$)** osciló entre **7.4 h y 11.3 h (8.9 h promedio)**, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura^{7-11,42,47 y 48}. En cuanto al **TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (TMR)** el valor promedio fue de **12.6 h** en un intervalo de **10.17 a 15.59 h**.

El **volumen de distribución (Vd/F)** obtenido fue de **48 L**, suponiendo que la biodisponibilidad (F) es igual a 1, este parámetro indica que el METRONIDAZOL se distribuye ampliamente en todo el organismo. Se ha descrito que el METRONIDAZOL se distribuye⁴² en tejidos y fluidos corporales, incluso en secreciones vaginales, líquido seminal, saliva y leche materna. La **depuración total (Cl/F)** obtenida, suponiendo F=1, fue de **74 mL/min (4440-4460 mL/h)**.

En la TABLA 17 se presenta la comparación de algunos parámetros farmacocinéticos obtenidos en diversos estudios respecto a los resultados obtenidos en población mexicana.

* **k_a obtenida por programa PCNONLIN**
(A) FLAGYL 500 mg (SEARLE) REFERENCIA
(B) METRONIDAZOL 500 mg PRUEBA

ANÁLISIS DE RESULTADOS

**TABLA 17 : PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS
DE DIFERENTES ESTUDIOS DE
FARMACOCINÉTICA DE METRONIDAZOL**

PARAMETRO	ESTUDIO	ESTUDIO	REFERENCIA	REFERENCIA	REFERENCIA	REFERENCIA	REFERENCIA
FC	BE	BE	9	7	11	10	8
MARCA	FLAGYL	LAB. MEXICO	500 mg	250 mg	400 mg	15 g	500 mg
DOSIS-VIA	500 mg ORAL	500 mg ORAL	ORAL	ORAL	IV	INFUSION	ORAL
NUM. SUJETO	24	24		20	7	34	9
POBLACION	MEXICANA	MEXICANA		CANADIENSE			
EDO. CLINICO	SANOS/VOL	SANOS/VOL	MUJERES/VO	SANOS/VOL	SANOS/VOL	PACIENTES	SANOS/VOL
ABC 0-36	107.0234	106.5843	-----	-----	-----	-----	-----
ABC 0-14	114.616	114.0213	159±48	-----	-----	-----	-----
Ka	-----	-----	-----	-----	1.45±0.23	-----	-----
Ke	0.0789	0.0787	-----	-----	-----	-----	-----
Cl	4440.27	4460.86	3400±8.2	-----	1.31 mL/min/Kg	2.7±1.2/h	71.8-80 mL/min
Vd	48428.28	47779.82	-----	-----	VDS 1.05L/Kg	35.8±10.0L	-----
Cmáx	9.591	9.8033	-----	-----	ORAL 6.9 µg/ml	-----	9.0µg/mL
tmáx	2.0632	1.3646	-----	-----	2.3 h	-----	-----
TMR	12.7351	12.558	-----	-----	-----	-----	-----
t½	8.8698	8.9126	7.0 ORAL	7.9-8.64	8.3 ± 0.4	9.0±1.6h	7.9-8.8
			7.3 IV	6.2-8.4			
F				99.3-105.9%	98.9±.3%		

PARAMETRO	REFERENCIA	REFERENCIA	REFERENCIA	REFERENCIA	REFERENCIA
FC	46	47	48	11	42
MARCA	500 mg	200 mg		400 mg	500 mg
DOSIS-VIA	ORAL	ORAL		ORAL	ORAL
NUM. SUJETO	12	8		7	-----
POBLACION					
EDO. CLINICO		SANOS/VOL	PACIENTES	SANOS/VOL	SANOS
ABC 0-36	116	± 10% de	-----	-----	-----
ABC 0-14	-----	valor medio	-----	-----	-----
Ka	-----	-----	-----	-----	-----
Ke	-----	-----	-----	-----	-----
Cl	-----	1.05-0.98	-----	-----	1.3 ± 0.3
		mL/min/Kg			mL/min/Kg
Vd	-----	0.83-0.86 L/Kg	0.65±0.25 L/Kg	-----	0.74±0.10 L/Kg
Cmáx	-----	-----	-----	6.9µg/mL	10 µg/mL
tmáx	-----	-----	-----	2.3 h	-----
TMR	-----	-----	-----	-----	-----
t½	-----	9.15-10.35 h	10.2±3.1	8.3 h	9.2 ±2.1
F	104.00%	-----	-----	98.9	99 ± 8

REFERENCIA: NUMERO DE REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

5.5.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La División de Bioequivalencia ha empleado un procedimiento de prueba denominado prueba doble unilateral ("two one-sided test"), para determinar si los valores promedio de los parámetros farmacocinéticos determinados después de la administración de los productos de prueba y de referencia son comparables. Este procedimiento involucra el cálculo de un intervalo de confianza para el cociente o

diferencia entre los parámetros farmacocinéticos promedio del producto de prueba y de referencia. Los límites de los intervalos de confianza determinados deben caer dentro del intervalo predeterminado para el cociente o la diferencia de los productos. La determinación del intervalo de confianza de los promedios de los productos y el nivel estadístico de significancia son juicios realizados por la División de Bioequivalencia y ya que el objetivo de este trabajo es someter a la FDA un producto genérico de METRONIDAZOL, se seguirán los lineamientos marcados por la FDA para la determinación de la bioequivalencia.⁶⁸

Dentro del análisis estadístico propuesto hay tres aspectos específicos:

1. Transformación logarítmica de los datos farmacocinéticos
2. Efecto de secuencia
3. Consideración de datos aberrantes

La Metodología general propuesta por la guía contiene los siguientes puntos:

1) ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO: como mínimo deberán calcularse los siguientes parámetros farmacocinéticos:

A. ÁREA BAJO LA CURVA de tiempo 0 al tiempo t (ABC_{0-t}) calculado por la regla de los trapecios, donde t es el último tiempo de muestreo cuantificable.

B. ÁREA BAJO LA CURVA de la concentración plasmática del tiempo 0 a tiempo infinito (ABC_{0-inf}), donde $ABC_{0-inf} = ABC_{0-t} + C_t/l_z$, C_t es la última determinación cuantificable del fármaco y l_z es la constante terminal de eliminación calculada de acuerdo a un método apropiado. La vida media terminal o de eliminación ($t_{1/2}$) también debe reportarse.

C. La CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA MÁXIMA ($C_{máx}$) y el tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima ($t_{máx}$) obtenidos directamente de los datos sin interpolación.

2) ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Se recomienda utilizar el modelo general lineal paramétrico (teoría de la normalidad) para los análisis de los datos farmacocinéticos. El análisis de varianza (ANADEVA) debe realizarse para los parámetros farmacocinéticos de ABC y $C_{máx}$ utilizando procedimientos de MODELO GENERAL LINEAL (MGL) de SASMR o un programa equivalente. Deberán emplearse modelos estadísticos apropiados pertinentes al diseño del estudio de bioequivalencia. Por ejemplo para un diseño de estudio cruzado, al azar, dos tratamientos, dos periodos, dos secuencias (2 x 2), como es el caso de este estudio, el modelo estadístico incluye a menudo factores para las siguientes fuentes de variación:

1. SECUENCIA (también denominada Orden o Grupo)
2. SUJETOS, anidados en las secuencias
3. PERIODOS (o Fases)
4. TRATAMIENTO (algunas veces denominado Fármaco o Formulación)

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El efecto de secuencia deberá ser evaluado utilizando el cuadrado medio (sujeto(secuencia)) del ANADEVA como un término de error. Todos los demás efectos principales deben ser probados contra el error residual (cuadrado medio del error) del ANADEVA. Los mínimos cuadrados deben ser calculados para los tratamientos. Los estimados en SAS pueden utilizarse para obtener estimados de las diferencias ajustadas entre medias de tratamientos y el error estándar asociado con estas diferencias.

La hipótesis de la PRUEBA DOBLE UNILATERAL ("two one-sided") debe probarse para ABC y para $C_{m\acute{a}x}$ a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, construyendo un intervalo de confianza al 90% para el cociente de los promedios de los productos de prueba y referencia.

En el siguiente diagrama se esquematiza el procedimiento de análisis estadístico de las muestras:

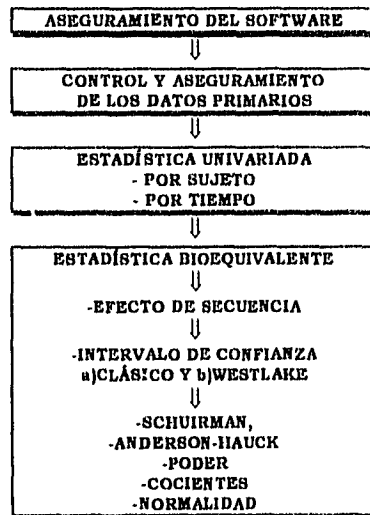


FIGURA 17: FASES DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA EVALUACIÓN DE BIOEQUIVALENCIA

PRESENTACIÓN DE DATOS: Los valores promedio de la concentración plasmática de METRONIDAZOL a cada tiempo de muestreo se presentan en la TABLA 17.

Estos resultados se ordenaron después de descodificar las claves con que fueron identificados para realizar el análisis cuantitativo de las muestras.

Con las concentraciones plasmáticas obtenidas se calcularon los parámetros farmacocinéticos siguientes: ABC_{0-36} , ABC_{0-inf} Y $C_{m\acute{a}x}$ de acuerdo a las fórmulas

ANALISIS DE RESULTADOS

descritas en el ANEXO 2. En las TABLAS 18, 19 y 20 se presentan los resultados de los parámetros farmacocinéticos promedio calculados (Apéndice 2) para el producto de referencia (A), el producto de prueba (B), la diferencia del producto de prueba menos el de referencia (B-A), el cociente (B/A) tanto de los resultados crudos como los datos logaritmo-transformados.

TABLA 18
CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA MEDIA DE METRONIDAZOL (µg/mL) A CADA
TIEMPO DE MUESTREO PARA LOS TRATAMIENTOS A (PRODUCTO
REFERENCIA Y B (PRODUCTO DE PRUEBA)
(N = 24)

TIEMPO DE MUESTREO	TRATAMIENTO		VALOR p
	REFERENCIA (A) MEDIA + ERROR EST	PRUEBA (B) MEDIA + ERROR STD	
0.0000	0.0000 + 0.0000	0.0000 + 0.0000	---
0.2500	1.6164 + 0.3851 W	1.4379 + 0.3138	0.7048
0.2667	0.7210 + 0.0000 X	---	---
0.5000	5.7133 + 0.8994	5.5885 + 0.7023	0.8862
0.7500	6.7770 + 0.6358 W	7.4559 + 0.5826	0.2918
0.7667	7.2010 + 0.0000 X	---	---
1.0000	7.1577 + 0.4902	7.9087 + 0.4511	0.1484
1.5000	7.8163 + 0.3842	8.7678 + 0.2272	0.0408
2.0000	7.8835 + 0.3064	8.6137 + 0.1530	0.0312
2.5000	7.9729 + 0.2668 W	8.2728 + 0.1614	0.2738
2.5167	6.3240 + 0.0000 X	---	---
3.0000	7.7927 + 0.2059 Y	8.0203 + 0.1612	0.3582
3.0167	7.5915 + 1.4895 Z	---	---
4.0000	7.1040 + 0.1772	6.9427 + 0.1479	0.0962
6.0000	5.8246 + 0.1477	5.6785 + 0.1426	0.1487
8.0000	4.6945 + 0.1206	4.5284 + 0.1165	0.0222
12.000	3.4283 + 0.1082	3.3641 + 0.0980	0.2015
12.016	---	2.8080 + 0.0000	---
24.000	1.4739 + 0.0672	1.4568 + 0.0727	0.6114
24.0167	---	1.2360 + 0.0000	---
30.0000	0.8531 + 0.0623	0.8400 + 0.0565	0.3768
30.0167	0.9740 + 0.0000	---	---
36.0000	0.5067 + 0.0313	0.4958 + 0.0315	0.3596
W (n=23) X (n=1) Y (n=22) Z (n=2)			

ANÁLISIS DE RESULTADOS

**TABLA 19: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA Y COMPARATIVA DE LOS
PARÁMETROS DE BIODISPONIBILIDAD: ABC_{0-36} , ABC_{0-inf} , $C_{m\acute{a}x}$, $t_{m\acute{a}x}$
(n= 24 sujetos)**

MEDIA ARITMÉTICA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO) COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%) MEDIA GEOMÉTRICA				
PARAMETROS BIODISPONIBILIDAD	REFERENCIA (A)	PRUEBA (B)	B - A DIFERENCIA	B/A (%)
ABC_{0-36} (mcg.h/mL)	107.0234 ± 14.2515 (76.9325-130.4436) 13.3163	106.5843 ± 13.3577 (78.0249-132.2286) 12.5326	-0.4392	99.5897
log ABC_{0-36}	2.0257 ± 0.0589 (1.8861-2.1154) 2.9089 106.0962	2.0243 ± 0.0561 (1.8922-2.1213) 2.7708 106.7648	-0.0014	99.6769
ABC_{0-inf} (mcg.h/mL)	114.6160 ± 15.4023 (84.6190-139.6703) 13.4382	114.0213 ± 14.8096 (84.2019-142.7269) 12.9885	-0.5946	99.4812
log ABC_{0-inf}	2.0554 ± 0.0590 (1.9275-2.1451) 2.8724 113.6057	2.0533 ± 0.0581 (1.9253-2.1545) 2.8280 113.0577	-0.0021	99.5193
$C_{m\acute{a}x}$ (µg/mL)	9.5910 ± 2.8853 (6.53 - 15.56) 21.7423	9.8033 ± 1.2449 (7.8190 -13.4340) 12.5992	0.2123	102.2130
log $C_{m\acute{a}x}$	0.9727 ± 0.0897 (0.8149 - 1.1928) 9.2231 9.3907	0.9882 ± 0.0529 (0.8932 - 1.1282) 5.3524 9.7320	0.0155	103.6272
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	2.8632 ± 1.1990 (0.5 - 4.0) 58.1120	1.3646 ± 0.7109 (0.5 - 3.0) 52.0935	-0.6986	66.1393
log $T_{m\acute{a}x}$	0.2236 ± 0.3115 (-0.3010-0.6021) 139.3250 1.6734	0.0776 ± 0.2332 (-0.3010-0.4771) 299.0945 1.1956	-0.1459	71.4622

TABLA 20: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA Y COMPARATIVA DE: TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (TMR), VOLUMEN DE DISTRIBUCIÓN (V_d), DEPURACIÓN (Cl/F) Y VIDA MEDIA ($t_{1/2}$)

MEDIA ARITMÉTICA ± DE (MÍNIMO - MÁXIMO) COEFICIENTE DE VARIACIÓN			
PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS	REFERENCIA (A)	PRUEBA (B)	VALOR p
TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (h)	12.7351 ± 1.3532 (10.5950 15.3250) 10.7041	12.5580 ± 1.4057 (10.1765 15.5773) 11.1938	0.1966
VOLUMEN DE DISTRIBUCIÓN (mL) (V_d/F)	48428.28 ± 6000.73 (40696.03 58613.50) 10.3261	47779.82 ± 3733.74 (40994.68 55632.17) 7.8145	0.3445
DEPURACIÓN (mL/h) (Cl/F)	4440.27 ± 611.70 (3579.86 5908.84) 13.7763	4460.86 ± 614.71 (3503.19 5938.11) 13.7802	0.7089
VIDA MEDIA (h) ($t_{1/2}$)	8.8898 ± 0.8743 (7.5860 10.5412) 9.8671	8.9128 ± 0.9902 (7.4381 11.2884) 11.1097	0.6637

ANÁLISIS DE RESULTADOS

TABLA 21: INTERVALOS DE CONFIANZA AL 90%

PRUEBA	AUC0-36	AUC0-inf	Cmáx	Tmáx
CLÁSICO	97.1729, 102.0023	97.1578, 101.8007	98.4555, 107.0705	47.6794, 84.5902
DATOS Antilog	97.4163, 101.9847	97.3385, 101.7445	98.3185, 109.2226	57.6728, 88.5488
WESTLAKE	97.4922, 102.5078	97.5265, 102.4735	93.2156, 106.7844	51.9389, 148.0611
DATOS Antilog	97.6572, 102.3428	97.6635, 102.3385	92.0860, 107.9140	60.5968, 139.4031

CRITERIO DE ACEPTACIÓN (INTERVALO DE CONFIANZA AL 90%) DATOS NO TRANSFORMADOS : 80-120% DATOS LOGARÍTMICOS : 80-125%

TABLA 22: VALORES DE PROBABILIDAD

PRUEBA	AUC0-36	AUC0-inf	Cmáx	Tmáx
SCHUIRMANN	0.0000	0.0000	0.0000	0.8947
DATOS Log	0.0000	0.0000	0.0000	0.8124
ANDERSON-HAUCK	0.0000	0.0000	0.0000	0.8947
DATOS Log	0.0000	0.0000	0.0000	0.8119

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para comprobar la bioequivalencia entre los dos productos evaluados, se compararon los parámetros farmacocinéticos⁶⁷, realizando un análisis de varianza, los cálculos de intervalo de confianza clásico, de Westlake y las pruebas de Anderson-Hauck, utilizando para ello el programa BIOPAK^{MR}. Los resultados obtenidos (TABLA 21 Y 22) muestran que los intervalos obtenidos, cumplen con el criterio de bioequivalencia establecido por la FDA⁶⁷, tanto para los parámetros farmacocinéticos obtenidos con los datos crudos como para los datos transformados (logaritmos decimales).

El tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima (t_{max}) no cumplió con el intervalo de confianza, tanto para los datos no transformados como para los datos logarítmicos, aunque cabe mencionar que este parámetro no es concluyente en la bioequivalencia⁶⁸ de dos productos ya que el ABC y C_{max} reflejan directamente la VELOCIDAD y CANTIDAD absorbida de un fármaco. Por lo tanto se puede concluir que los productos evaluados cumplen los criterios estadísticos establecidos y se pueden considerar:

BIOEQUIVALENTES

CAPITULO 6

**ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD**

ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA

Un estudio de BIOEQUIVALENCIA está constituido de 4 fases importantes que por sí mismas constituyen un estudio particularmente extensivo

- a) FASE DE PRODUCCIÓN
- b) FASE CLÍNICA
- c) FASE ANALÍTICA
- d) FASE ESTADÍSTICA

Cada una de estas fases debe regirse por requisitos especificados en algunos casos por el CODE OF FEDERAL REGISTER (CFR)^{37,39} y en otros por Guías específicas emitidas por los departamentos pertinentes al área de la FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), que aunque no tienen un peso regulatorio, dan la pauta de los aspectos mínimos que deben cubrirse para elaborar un programa de ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, que se aplique a los estudios de Bioequivalencia y que incluya todos los aspectos involucrados en estos

Considerando que el objetivo del trabajo era que el producto farmacéutico bajo estudio fuera aprobado por la FDA, se siguieron los lineamientos del CODE OF FEDERAL REGISTER (CFR). Las guías básicas involucradas en cada una de las fases de un estudio de bioequivalencia fueron:

- a) FASE DE PRODUCCIÓN: CFR DE BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA
- b) FASE CLÍNICA: CFR DE BUENAS PRACTICAS CLÍNICAS
CFR DE PROTECCIÓN A LOS SUJETOS HUMANOS³⁸
CFR DE REQUERIMIENTO DE BIODISPONIBILIDAD Y BIOEQUIVALENCIA³⁷
- c) FASE ANALÍTICA: CFR DE BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO
CFR DE REQUERIMIENTOS DE BIODISPONIBILIDAD Y BIOEQUIVALENCIA
- d) FASE ESTADÍSTICA: GUÍAS DE PRESENTACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS DE UN ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA

Con el fin de garantizar la validez de las diferentes etapas del estudio es necesario que las PARTES INVOLUCRADAS cumplan lo más estrechamente posible con las BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA, BUENAS PRACTICAS CLÍNICAS Y BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO lo que permitirá cubrir estos requisitos y documentarlos adecuadamente.

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

6.1. FASE DE PRODUCCIÓN. De acuerdo a las BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA (GOOD MANUFACTURING PRACTICES, CFR 210 y CFR 211) se realizó el BIOLOTE de comprimidos de METRONIDAZOL 500 mg. Este lote además de cumplir con las especificaciones marcadas por las BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA, cumplió con el tamaño de lote a escala industrial de 100, 000 comprimidos que se requiere para iniciar el estudio de bioequivalencia con respecto al producto innovador.

6.1.1. LISTA DE VERIFICACIÓN DE LOS ASPECTOS INVOLUCRADOS EN LA PRODUCCIÓN DEL BIOLOTE DE COMPRIMIDOS DE METRONIDAZOL 500 mg

Los aspectos principales evaluados con respecto a las BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA fueron:

- 1)FORMULA MAESTRA
- 2)PESADAS
- 3)VALIDACIÓN DEL PROCESO
- 4)MÉTODOS ANALÍTICOS
- 5)CONTROL DE CALIDAD
- 6)ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN DEL BIOLOTE
- 7)ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

6.2. FASE CLÍNICA: La fase clínica fue realizada de acuerdo a las BUENAS PRACTICAS CLÍNICAS (GOOD CLINICAL PRACTICES, 21 CFR PART 50) en donde se verificaron como monitor los siguientes aspectos:

6.2.1. LISTA DE VERIFICACIÓN DE LOS ASPECTOS INVOLUCRADOS EN LA FASE CLÍNICA DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE METRONIDAZOL.

- PROTOCOLO
- INFORME DE CONSENTIMIENTO
- HORARIOS
- MATERIAL CLÍNICO
- LISTAS DE HORARIOS
- CAPACITACIÓN DEL PERSONAL
- EQUIPO DE RESUCITACIÓN CARDIOVASCULAR, ETC.

6.3. FASE ANALÍTICA

En cada una de las partes involucradas en el análisis de las muestras se revisaron previamente a su realización, los siguientes aspectos relacionados al ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD entre ellos

1. Que existieran los PROCEDIMIENTOS ESTÁNDAR DE OPERACIÓN (PEO) relacionados con todos los aspectos analíticos y logísticos del estudio de BIOEQUIVALENCIA.

2. Después de la fase de desarrollo del método analítico para realizar la VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO que se aplicaría al análisis de las muestras provenientes del estudio de bioequivalencia se elaboró un PLAN DE TRABAJO para la validación del método, en el cual se presentaron detalladamente cada uno de los puntos involucrados en esta parte; este plan de trabajo estuvo aprobado previamente por la jerarquía competente.

3. Se realizó un PLAN DE TRABAJO, el cual incluyó todos los puntos relacionados al análisis de las muestras provenientes del estudio de bioequivalencia, este contempló la realización de un SIMULACRO donde se evaluaron "tiempos y movimientos" de analistas y asistentes técnicos. Todos estos puntos fueron documentados por un monitor o supervisor interno.

6.3.1. LISTA DE VERIFICACIÓN DE LOS ASPECTOS INVOLUCRADOS EN LA FASE ANALÍTICA DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE METRONIDAZOL COMPRIMIDOS 500 mg CUMPLIENDO LAS BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO (GOOD LABORATORY PRACTICES FOR NON CLINICAL STUDIES, 21 CFR 58).³⁹

De acuerdo a este documento regulatorio los principales puntos a cubrir desde el punto de vista de BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO PARA ESTUDIOS DE LABORATORIO NO CLÍNICOS, como lo es el análisis de muestras de un estudio de bioequivalencia fueron:

- A) ORGANIZACIÓN Y PERSONAL
- B) INSTALACIONES
- C) EQUIPO
- D) EVALUACIÓN DE LAS INSTALACIONES DE PRUEBA
- E) ARTÍCULOS DE PRUEBA Y CONTROL
- F) PROTOCOLO Y CONDUCCIÓN DE UN ESTUDIO DE LABORATORIO NO CLÍNICO
- G) REGISTROS Y REPORTES
- I) CALIFICACIÓN DE INSTALACIONES DE PRUEBAS
- J) MÉTODO ANALÍTICO

Los aspectos involucrados en la supervisión del análisis de muestras del estudio de Bioequivalencia de METRONIDAZOL comprimidos 500 mg incluyeron:

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- INSPECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS
- INSTALACIONES Y EQUIPOS
- MATERIALES Y REACTIVOS
- DOCUMENTACIÓN
- ACTIVIDADES DE ANALISTAS
- ACTIVIDADES DE APOYO TÉCNICO
- CAPTURA DE DATOS
- REGISTROS: BITÁCORAS, LIBRETAS Y ARCHIVOS

Las actividades a supervisar se realizaron con diferente frecuencia y tiempo de inspección: ÚNICA, PREVIA, DIARIA Y ALEATORIA, de acuerdo a las características de la actividad a supervisar.

Cada una de las inspecciones realizadas se documentaron por medio de LISTAS DE VERIFICACIÓN. Los aspectos críticos del análisis de muestras que se verificaron en forma rutinaria fueron:

- CONFRONTACIÓN DE CLAVES DE LAS MUESTRAS
- TOMA DE ALICUOTAS DE LAS MUESTRAS
- PESOS DE LAS SUSTANCIAS DE REFERENCIA
- CONDICIÓN GENERAL DEL EQUIPO CROMATOGRÁFICO.

Se puede concluir que la filosofía del aseguramiento de la calidad consiste básicamente en:

1. Un CONOCIMIENTO profundo y oportuno de los aspectos científicos, técnicos y regulatorios involucrados de cada una de las fases del estudio en particular.

2. Una DOCUMENTACIÓN adecuada, concisa y oportuna de esos aspectos.

3. Y finalmente CONSISTENCIA durante todas las fases involucradas en la obtención de un producto farmacéutico, ya que no sólo basta con **LOGRAR calidad sino que hay que **MANTENERLA**.**

CAPITULO 7
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El presente estudio se realizó tomando en consideración las guías de las BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA, BUENAS PRACTICAS CLÍNICAS Y BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO³⁷⁻⁴⁰ desde su concepción hasta su realización.

1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Los productos farmacéuticos estudiados: FLAGYL (SEARLE) Y METRONIDAZOL 500 mg, cumplieron satisfactoriamente los requerimientos de control de calidad, tanto para la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos⁵ como las de la USP XXII y 23^{3,4}.

El método analítico por C.L.A.R. para la cuantificación de METRONIDAZOL en plasma fue ESPECIFICO, SENSIBLE, PRECISO Y EXACTO para un intervalo de concentración de 0.5 a 20.0 µg/mL. El volumen de muestra a utilizar es de 0.5 mL lo que suma una ventaja más al método además del sencillo procesamiento de la muestra.

2. RESULTADOS DE BIOEQUIVALENCIA

Se demostró la bioequivalencia entre los dos productos estudiados de acuerdo a las pruebas estadísticas propuestas por la Food and Drug Administration.

3. COMPARACIÓN FARMACOCINÉTICA

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos son muy similares a los encontrados en la literatura en estudios realizados en sujetos sanos, por lo que puede considerarse que aparentemente la población mexicana tienen un comportamiento farmacocinético similar al de otros grupos humanos.

4. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

De los resultados obtenidos se puede concluir que el conjunto de BUENAS PRACTICAS permite lograr que los productos genéricos fabricados en un laboratorio farmacéutico, cumplan y mantengan los criterios internacionales de calidad y así poder empezar a introducir estos productos a mercados internacionales con el mismo estándar de calidad que el país destinatario.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

1. MARTINDALE The Extra Pharmacopeia. Edition 29 th, London The Pharmaceutical Press. (1989), pág. 666-672
2. FLOREY, KLAUS "Analytical Profiles of Drug Substances" The American Pharmaceutical Association. Vol. 5 (1976), pág 327-344
3. U.S. PHARMACOPEIAL CONVENTION, INC. (1990); The United States Pharmacopeia XXII Ed.; National Formulary XVII Ed. Rockville, Md. pág. 890-893
4. U.S. PHARMACOPEIAL CONVENTION, INC. (1995); The United States Pharmacopeia 23 Ed.; National Formulary 18 Ed.; Rockville, Md. pág. 1020-1021
5. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS (FEUM),
Págs. 1332-1333
6. CLARKE'S ISOLATION and IDENTIFICATION OF DRUGS in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. SECOND EDITION. THE PHARMACEUTICAL PRESS ANALYTICAL, (1986), pág. 780-781
7. HENDERSON, SHRIKANT, DIGHE AND ROGER; "Subject Selection and Mangement in Bioequivalence Studies" CLIN. RESEARCH AND REG. AFFAIRS 9 ; (1992) pág. 71-87
8. MCGILVERAY, MIDHA, LOO AND COOPER, "The bioavailability of commercial Metronidazole Formulations ". INT. J. CLIN. PHARMACOL. 16 ; (1978) pág. 110-115
9. MATTILA, MANNISTO, MANTYLA, NYKANEN. "Comparative Pharmacokinetics of Metronidazole and Tinidazole as Influenced by Administration Route"; ANTIMICOB. AGENTS CHEMOTER. 23(5); (1983) pág. 721-725
10. HOUGHTON, THORNWE, SMITH, TEMPLETON & COLLIER; "Comparison of the Pharmacokinetics of Metronidazole in healthy female volunteers following either a single oral or intravenous dose"; BR. J. CLIN. PHARMAC. 8; (1979) pág. 337-341
11. BERGAN ET AL.; "Comparative Pharmacokinetics of Metronidazole and Tinidazole and Their Tissue Penetration"; SCAND. J. GASTROENTEROL. 20 ; (1985) pág. 945-950
12. JENSEN y GUGLER, "Single and multiple-dose metronidazole kinetics" CLIN. PHARMACOL. THER. 34(4); (1983) pág. 481-487
13. FOSTER ET AL.; "A Randomized Comparative Study of Sulbactam plus Ampicilim vs Metronidazole plus Cefotaxime in the Management of Acute Appendicitis in Children"; REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES , 8(5); (1986) pág. 634-638

BIBLIOGRAFIA

14. VIITANEN, AUWINEN ET AL.; "Concentrations of metronidazole and tinidazole in abdominal tissues after a Single Intravenous Infusion and Repetitive Oral Administration"; CHEMOTHERAPY 30 (1984) pág. 211-215
15. BEAULIEU R. KOCH; "A metronidazole metabolite in human urine and its risk " SCIENCE, 211(2 3);(1981) pág. 398-400
16. GODFREY AND EDWARDS; "A Chromatographic and Spectroscopic Study of Photodegraded Metronidazole in Aqueous Solution"; J. PHARM. SCI. 80(3) (1991) pág. 212-218
17. HABIB AND ASKER; "Complex Formation Between Metronidazole and Sodium Urate: Effect of Photodegradation of Metronidazole"; PHARM. RESEARCH; 6 (1) (1989) pág. 58-61
18. CHO ET AL.; "Metronidazole Phosphate- A Water-Soluble Prodrug for Parenteral Solutions of Metronidazole"; J. PHARM. SCI. 71(4); (1982) pág. 410-413
19. VEDAS GUPTA; "Quantitation of Metronidazole in Pharmaceutical Dosage Forms Using High-Performance Liquid Chromatography"; J. PHARM. SCI. 73(9); (1984) pág. 1331-1333
20. ALTON AND PATRICK; "High Performance Liquid Chromatography Assay for the Antiprotozoal Agent, Tinidazole, in Human Plasma"; J. PHARM. SCI. 68(5) (1979) pág. 599-601
21. N.F. WOOD; "GLC Analysis of Metronidazole in Human Plasma"; J. PHARM. SCI. 64(6); (1985) pág. 1048-1049
22. NILSON-EHLE, URSIONG AND NILSON-EHLE; "Liquid Chromatographic Assay for Metronidazole and Tinidazole: Pharmacokinetic and Metabolic Studies in Human Subjects"; ANTIMICROB. AGENTS AND CHEMOTHER. 19; (1981) pág. 754-760
23. WOOLLARD, GERARD A.; "Effect of precipitating agents on the analysis of metronidazole by high-performance liquid chromatography"; J. CHROMATOGR. 303; (1984) pág. 225-228
24. MARQUES, STAFFORD, FLYNN AND SADEÉ; "Determination of metronidazole and misonidazole and their metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography"; J. CHROMATOGR. BIOMED. APPL. 246; (1978) pág. 163-166
25. DE SILVA, MUNNO AND STROJNY; "Absorptiometric, Polarographic and Gas Chromatographic Assays for the Determination of N-1-substituted Nitroimidazoles in Blood and Urine"; J. PHARM. SCI. 59(15); (1979) pág. 201-210

BIBLIOGRAFIA

26. KAYE, SANKEY & THOMAS (Letter to the Editor), "A Rapid and Specific Semi-Micro Method Involving High-Pressure Liquid Chromatography for the Assay of Metronidazole in Plasma, Saliva, Serum, Urine and Whole Blood"; BR. J. CLIN. PHARMAC. 9; (1980) pág. 528-529
27. KERSTING, LANBECK AND BJOR LINDSTROM ; "Determination of metronidazole and tinidazole in plasma and feces by high-performance liquid chromatography"; J. CHROMATOGR. 162; (1979) pág. 117-121
28. GIBSON, LATTANZIO AND McGEE; "Optimized Liquid Chromatographic Determination of Metronidazole and Its Metabolites in Plasma"; CLIN. CHEMISTRY 305 (1984) pág. 784-787
29. RONA AND GACHALY (Letter to the Editor); "Simple liquid chromatographic method for the determination of ornidazole and metronidazole in human serum"; J. OF CHROMATOGR. 420 ; (1987) pág. 228-230
30. FLAGYL R. SEARLE (METRONIDAZOLE) información anexa a producto farmacéutico, revisado julio 19, 1990.
31. LABORATORIO A.F. (METRONIDAZOL) Información anexa a producto farmacéutico.
32. G. LEVY; "Pharmacodynamic considerations in bioavailability and bioequivalence assessments"; TOPICS IN PHARMACEUTICAL SCIENCES, D.J.A. CROMMELIN, K.K. MIDHA (EDITORES); (1991) pág. 243-257
33. U. GUNDE-REMY, "European initiatives in standards for harmonization of bioavailability-bioequivalence requirements"; TOPICS IN PHARMACEUTICAL SCIENCES, D.J.A. CROMMELIN, K.K. MIDHA (EDITORES), (1991) pág. 253-257
34. H. OGATA ; "Bioavailability and bioequivalence criteria in Japan"; TOPICS IN PHARMACEUTICAL SCIENCES D.J.A. CROMMELIN, K.K. MIDHA (EDITORES) (1991) pág. 259-262
35. I.J. MCGILVERAY AND E. ORMSBY; "North american initiatives in bioavailability/bioequivalence assessment"; TOPICS IN PHARMACEUTICAL SCIENCES, D.J.A. CROMMELIN, K.K. MIDHA (EDITORES) (1991) pág. 263-291
36. DONALD H. SORBY; "Evaluación de la biodisponibilidad biológica de medicamentos"; REV. MEX. DE CIENCIAS FARMACEUTICAS. 6; (1974) pág. 49-55
37. 21 CFR, Ch (4-1-91) EDITION, PART 320 "BIOAVAILABILITY AND BIOEQUIVALENCE REQUIREMENTS"
38. 21 CFR, Ch (4-1-91) EDITION, PART 50 "PROTECTION OF HUMAN SUBJECTS"

BIBLIOGRAFIA

39. 21 CFR, Ch (4-1-91) EDITION, PART 58 "GOOD LABORATORY PRACTICE FOR NONCLINICAL LABORATORY STUDIES"
40. HBP, USFDA AND USP; 'International Open Conference on Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence': Toronto, CANADA, junio 1992.
41. FONSECA GONZALEZ, Lidiette; 'Farmacocinética clínica de Metronidazol'; Tesis para obtener el grado de Maestría en Farmacia, 1985
42. GOODMAN Y GILMAN; 'Las bases farmacológicas de la Terapéutica' 5a. Edición, Capítulo 42 (1994) pág. 1002-1005
43. E. Rohlstein and D.D. Clanay; NEW ENG J. MED. 280; (1969) pág. 1006
45. SIEGMUND, W. et al.; "Bioavailability of Metronidazole formulations (Vagimid MR); PHARMAZIE; 47; (1992) pág. 522-525
46. PATON, D.M., WEBSTER, D.R.; "Comparative Bioavailability of two tablet preparations of Metronidazole"; INT. J. CLIN. PHARMACOL. RES.; 8(4) ,(1988) pág. 227-229
47. LAU, A.; "Pharmacokinetics of Metronidazole in Hospitalized Patients"; INT. J. CLIN. PHARMACOL. THER. TOXICOL. 24; (1986) pág. 643-645
48. DRUG INTERACCIONS NEWS 7 ; (1987) pág.19
49. VOOGD, C.E.; "On the mutagenicity of nitroimidazoles"; MUTAT. RES. 86; (1981) pág. 243-277
50. SPECK, W.T.; STEIN, A.B. Y ROSENKRANZ, H.S.; "Mutagenicity of metronidazole: presence of several active metabolites in human urine"; J. NATL. CANCER INST., 56; (1976) pág. 283-284
51. PETERSON, W.F. et al.; "Metronidazole in pregnancy"; AM. J. OBSTET. GYNECOL., 94; (1966) pág. 343-349
52. "ORANGE BOOK": APPROVED DRUG PRODUCTS with therapeutic equivalence evaluations 14th Edition , US. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, (1994)
53. GUIA FDA PARA ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE METRONIDAZOL
54. SHAH, VINOD P. "Analytical Methods in Bioavailability Studies: a Regulatory Viewpoint"; CLIN. RES. PRACTICES & REG. AFFAIRS, 5 (1); (1987) pág. 51-60

BIBLIOGRAFIA

55. SHAH et al. "Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies". PHARM. RES. 9(4); (1992) pág. 588-592
56. SHRIKANT, V. DIGHE; "Current Bioavailability and Bioequivalence Requirements and Regulations". CLIN. RES. PRACTICES & DRUG REG. AFFAIRS, 2(4); (1984) pág. 401-421
57. CARTWRIGHT, A.C.; "INTERNATIONAL HARMONIZATION AND CONSENSUS DIA MEETING ON BIOAVAILABILITY AND BIOEQUIVALENCE TESTING REQUIREMENTS AND STANDARDS". DRUG INFORMATION JOURNAL, 25; (1991) pág. 471-482
58. GUIDANCE: STATISTICAL PROCEDURES FOR BIOEQUIVALENCE STUDIES USING A STANDARD TWO-TREATMENT CROSSOVER DESIGN (Jul 1, 1992). Preparada por Mei-Ling Chen, Ph. D.(Division of Bioequivalence, Office of Generic Drugs (OGD), de la Food an Drug Administration (FDA).
59. PARDO, G.A.; ARCH. INV. MED. SUPL. 1; (1971) pág. 335-336
60. GEORGES, E. : Metronidazole : Proceedings of the International Metronidazole Conference, Editor Sydney M. Finegold, Montreal, Quebec, CANADA, (1976) pág 3-11
61. DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS, PLM,1995
62. INTERCHANGEABLE MULTI-SOURCE PHARMACEUTICAL PRODUCTS: WHO DRAFT GUIDELINE ON MARKETING AUTHORIZATION REQUIREMENTS); Consultative Document ; 6 December 1993, WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)
63. Suplemento 6, USP XXII (1992) pág. 2866.

APÉNDICES

APENDICE 1

INFORME DE CONSENTIMIENTO

ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE METRONIDAZOL COMPRIMIDOS 500 mg

ESTUDIO No. _____

PROTOCOLO No. _____

NOMBRE COMPLETO: _____

FECHA DE NACIMIENTO: _____

DIRECCION: _____

TELÉFONO: _____

EDAD: _____ SEXO: _____

Doy mi pleno consentimiento y sin coacción alguna para participar en el estudio de Bioequivalencia de comprimidos de METRONIDAZOL. Manifiesto que me han sido informadas las características del estudio, así como de las consecuencias del mismo y que he entendido claramente, los objetivos y la forma en que participaré en él. También se me ha explicado las reglas que me veo comprometido a seguir y los cuidados a los que tengo dercho durante el desarrollo de dicho estudio.

ATENTAMENTE

(NOMBRE Y FIRMA)

TESTIGO : _____ TESTIGO : _____

(NOMBRE Y FIRMA)

(NOMBRE Y FIRMA)

LUGAR: _____ FECHA: _____

RESPONSABLE MEDICO: _____ FECHA: _____

APENDICE 2

FORMULAS UTILIZADAS PARA EL CÁLCULO DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

AREA BAJO LA CURVA DE TIEMPO 0 AL ULTIMO TIEMPO DE MUESTREO (ABC 0-t)

$$(ABC_{0-t}) = \dot{a} \sum_{i=1}^z \frac{(t_i - t_{i-1})(C_i + C_{i-1})}{2}$$

AREA BAJO LA CURVA DE TIEMPO 0 AL INFINITO (ABC 0-inf)

$$(ABC_{0-inf}) = \dot{a} \sum_{i=1}^z \frac{(t_i - t_{i-1})(C_i + C_{i-1})}{2} + \frac{C_z}{l_z}$$

MOMENTO DEL AREA BAJO LA CURVA DE TIEMPO 0 AL TIEMPO t (MABC 0-t)

$$(MABC_{0-t}) = \dot{a} \sum_{i=1}^z \frac{(t_i)(C_i t_i + C_{i-1} t_{i-1})}{2} + \frac{C_z}{l_z}$$

MOMENTO DEL AREA BAJO LA CURVA DE TIEMPO 0 AL INFINITO (MABC 0-inf)

$$(MABC_{0-inf}) = \dot{a} \sum_{i=1}^z \frac{(t_i)(C_i + C_{i-1})}{2} + \frac{t_z C_z}{l_z} + \frac{C_z}{l_z^2}$$

TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (TMR)

$$(TMR) = (MABC_{0-inf}) / (ABC_{0-inf})$$

VOLUMEN DE DISTRIBUCION (Vd ss)

$$(Vd_{ss}) = (MABC_{0-inf}) / (ABC_{0-inf}^2) \text{ DOSIS}$$

DEPURACION (Cl)

$$Cl = F \cdot \text{DOSIS} / ABC_{0-inf} \quad (F = 1)$$

VIDA MEDIA TERMINAL O DE ELIMINACION (t 1/2)

$$(t_{1/2}) = 0.693 / l_z$$

CONCENTRACION PLASMATICA MAXIMA (Cmáx)

(Cmáx) es la concentración mayor obtenida de los datos plasmáticos de cada sujeto del estudio

TIEMPO PARA ALCANZAR LA CONCENTRACION PLASMATICA MAXIMA (t máx)

(t máx) es el tiempo en el cual se obtuvo la concentración plasmática máxima (Cmáx).

$l_z = K_e$ (constante de velocidad de eliminación)

APENDICE 3

PRESENTACION DE LOS DATOS FARMACOCINETICOS POR SUJETO
 CONCENTRACION PLASMATICA PROMEDIO (µg/mL) A CADA TIEMPO DE MUESTREO (h) Y ESTADISTICA DESCRIPTIVA PARA
 LOS TRATAMIENTOS A Y B

FORM	TIEMPO (h)	N Obs	N	Minimo (µg/mL)	Maximo (µg/mL)	Media (µg/mL)	Desv Est	CV (%)	
A	0.00	24	24	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	--	
	0.25	23	23	0.0000	5.3030	1.6164	1.8469	114.2577	
	0.2667	1	1	0.7210	0.7210	0.7210	--	--	
	0.50	24	24	0.9600	15.5600	5.7133	4.4064	77.1262	
	0.75	23	23	2.4070	11.8690	6.7770	3.0492	44.9596	
	0.7667	1	1	7.2010	7.2010	7.2010	--	--	
	1.00	24	24	2.5470	10.6210	7.1577	2.4015	33.5568	
	1.50	24	24	3.6410	10.0960	7.8463	1.8621	24.0784	
	2.00	24	24	4.0850	9.5620	7.8693	1.5009	19.0385	
	2.50	23	23	4.4510	8.9770	7.9729	1.2793	16.0458	
	3.0167	1	1	6.3240	6.3240	6.3240	--	--	
	3.00	22	22	5.9920	9.7900	7.7927	0.9657	12.3529	
	3.0167	2	2	6.1020	9.9810	7.5915	2.1055	27.7478	
	4.00	24	24	5.8150	9.5690	7.1040	0.8660	12.2167	
	6.00	24	24	4.6790	7.8960	5.8246	0.7238	12.4263	
	8.00	24	24	3.5110	6.0150	4.6945	0.5907	12.5821	
	12.00	24	24	2.3520	4.6350	3.4283	0.5300	15.4606	
	24.00	24	24	0.9160	2.1040	1.4739	0.3294	22.3476	
	30.00	23	23	0.0000	1.3350	0.8531	0.2956	35.0245	
	30.0167	1	1	0.9740	0.9740	0.9740	--	--	
	36.00	24	24	0.0000	0.7580	0.3168	0.3300	103.5254	
	B	0.00	24	24	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
		0.25	24	24	0.0000	4.3340	1.4379	1.5374	106.9194
		0.50	24	24	0.8880	13.4340	5.5885	3.4404	61.5600
0.75		24	24	1.7590	11.9530	7.4559	2.8542	38.2608	
1.00		24	24	3.4280	11.2480	7.5087	2.2100	27.9441	
1.50		24	24	5.3520	10.7950	8.7678	1.1128	12.6923	
2.00		24	24	7.3660	10.1230	8.6137	0.7495	8.7012	
2.50		24	24	6.9930	9.8960	8.2728	0.7905	9.5557	
3.00		24	24	6.6220	9.5400	8.0203	0.7897	9.8464	
4.00		24	24	5.6900	8.1140	6.9427	0.7248	10.4391	
6.00		24	24	4.3500	6.8780	5.6765	0.6987	12.3042	
8.00		24	24	3.4650	5.5140	4.5284	0.5706	13.6040	
12.00		23	23	2.4000	4.0530	3.3641	0.5698	13.9664	
12.0167		1	1	2.8080	2.8080	2.8080	--	--	
24.00		23	23	0.7980	2.0140	1.4568	0.3487	23.9341	
24.0167		1	1	1.2360	1.2360	1.2360	--	--	
30.00		24	24	0.0000	1.2890	0.8400	0.2770	32.9762	
36.00		24	24	0.0000	0.7770	0.3339	0.3166	95.4212	

Form A: Tratamiento A (Flagyl 500 mg) Form B: Tratamiento B (METRONIDAZOL 500 mg)

APENDICE 3 PARAMETROS DE BIODISPONIBILIDAD

PARAMETROS DE BIODISPONIBILIDAD PARA TRATAMIENTO A (FLAGYL 500 mg) Y TRATAMIENTO B (METRONIDAZOL 500 mg)

SU	F	P	SE	ABCO-36 (mcg h/mL)	ABCO-inf (mcg h/mL)	Cmax (mcg/mL)	Tmax (h)	ABMCO-36 (mcg h/mL)	ABMCO-inf (mcg h/mL)
1	A	2	2	97.4021	101.9746	9.619	1.50	890.3878	1096.5344
2	A	1	1	100.9789	105.4515	9.513	1.50	915.6404	1117.2555
3	A	2	2	89.7761	96.9336	8.422	1.50	887.8112	1224.2142
4	A	1	1	122.8539	129.0507	11.869	0.75	1228.4570	1526.2533
5	A	1	1	110.8735	117.7156	9.306	2.00	1051.6553	1366.1224
6	A	2	2	104.2966	109.5920	11.226	0.75	940.6851	1180.5975
7	A	1	1	111.3272	119.2870	9.298	1.50	1204.5148	1597.1928
8	A	2	2	115.4099	124.0276	9.081	3.02	1267.6318	1697.4593
9	A	2	2	128.1429	139.6703	15.560	0.50	1418.6595	2008.9516
10	A	2	2	108.2293	117.0813	12.772	0.50	1157.4770	1602.9435
11	A	1	1	104.0148	111.8268	8.489	2.00	1048.6900	1413.1514
12	A	1	1	103.4755	112.9276	6.962	4.00	1255.1705	1730.6105
13	A	1	1	76.9325	84.6190	7.290	2.00	640.4761	943.8148
14	A	2	2	130.4436	139.4213	9.946	2.50	1419.5837	1864.1623
15	A	2	2	120.4805	130.9796	12.333	0.58	1306.4140	1838.9859
16	A	1	1	90.5301	95.9683	8.750	2.50	846.6694	1095.8600
17	A	2	2	89.2101	93.7232	8.510	1.50	807.9311	1012.2109
18	A	2	2	110.5733	119.4280	11.313	0.50	1147.2087	1592.6489
19	A	1	1	95.4519	104.5679	6.530	4.00	1050.1967	1480.3333
20	A	1	1	105.9581	112.2753	8.202	4.00	1164.9162	1469.9721
21	A	1	1	92.7258	99.1836	7.116	3.00	934.6896	1231.0783
22	A	1	1	125.7498	133.9097	9.977	2.50	1386.1356	1786.0908
23	A	2	2	104.7545	112.2790	8.531	3.00	1068.2696	1416.9636
24	A	2	2	128.9719	138.8901	9.569	4.00	1539.7482	2029.0210
1	B	1	2	97.2470	102.5748	10.078	0.75	873.1002	1116.7235
2	B	2	1	99.1388	105.0414	9.419	1.50	914.0942	1185.9686
3	B	1	2	85.9189	91.1874	7.819	1.50	807.3676	1049.4628
4	B	2	1	106.0535	112.4432	9.825	1.00	987.6744	1279.6048
5	B	2	1	111.7626	119.9429	9.424	2.00	1091.2855	1471.6517
6	B	1	2	96.5236	101.1881	11.143	1.00	870.3726	1081.1389
7	B	2	1	112.6068	120.5177	9.798	1.00	1202.8932	1593.7597
8	B	1	2	125.9710	134.1637	10.010	1.50	1329.0593	1732.0839
9	B	1	2	117.5188	127.9278	11.173	0.75	1310.8382	1842.5920
10	B	1	2	104.7050	113.2781	13.434	0.50	1123.0974	1557.5846
11	B	2	1	116.3658	123.3794	9.540	3.00	1257.7916	1597.3452
12	B	2	1	99.5630	107.6524	9.375	1.50	1102.9401	1508.1648
13	B	2	1	78.0249	84.20190	8.184	0.50	616.6262	856.8800
14	B	1	2	121.1173	128.0794	9.233	2.00	1318.2949	1655.9528
15	B	1	2	116.3820	129.0360	9.317	0.75	1348.4157	2010.0367
16	B	2	1	92.4059	97.3463	9.176	1.50	849.6502	1074.0044
17	B	1	2	88.0246	92.3840	10.021	0.50	775.9065	973.5862
18	B	1	2	114.6118	123.8336	10.158	0.75	1261.0221	1725.0596
19	B	2	1	104.5580	115.0722	8.476	1.50	1186.2538	1611.2946
20	B	2	1	110.2883	117.3043	8.742	2.00	1163.9924	1505.5859
21	B	2	1	94.8805	100.7874	8.407	3.00	949.0112	1219.1591
22	B	2	1	116.6920	124.6493	10.795	1.50	1233.6941	1624.8140
23	B	1	2	115.4346	121.7940	9.778	2.00	1182.8114	1490.1269
24	B	1	2	132.2285	142.7269	11.953	0.75	1433.5328	1960.8227

- (SU) SUJETO, (F) FORMULATION, (P) PERIODO, (SE) SECUENCIA: 1=AB y 2=BA

APENDICE 3

PARAMETROS FARMACOCINETICOS PARA TRATAMIENTO A (FLAGYL 500 mg) Y TRATAMIENTO B (METRONIDAZOL 500 mg)

SU	F	P	SE	MRT (h)	Vd/F (mL)	Cl/F (mL/h)	K (h ⁻¹)	T1/2 (h)
1	A	2	2	10.7530	46925.09	4903.18	0.0913	7.5915
2	A	1	1	10.5950	44898.69	4741.52	0.0914	7.5860
3	A	2	2	12.6294	55076.06	5158.17	0.0763	9.0868
4	A	1	1	11.8268	40696.03	3874.45	0.0829	8.3567
5	A	1	1	11.6053	42774.79	4247.53	0.0836	8.2870
6	A	2	2	10.7727	43238.83	4562.38	0.0892	7.7701
7	A	1	1	13.3895	48593.66	4191.57	0.0750	9.2417
8	A	2	2	13.6861	47585.76	4031.36	0.0721	9.6189
9	A	2	2	14.3835	43197.55	3579.86	0.0658	10.5412
10	A	2	2	13.6909	49407.57	4270.54	0.0698	9.9284
11	A	1	1	12.6370	48464.94	4471.20	0.0706	8.8228
12	A	1	1	15.3250	58613.50	4427.62	0.0699	9.9118
13	A	1	1	11.1537	54106.97	5908.84	0.0878	7.8959
14	A	2	2	13.3707	41714.35	3586.25	0.0740	9.3717
15	A	2	2	14.0402	45000.50	3817.39	0.0679	10.2068
16	A	1	1	11.4190	51653.28	5210.05	0.0847	8.1789
17	A	2	2	10.8000	50759.38	5334.86	0.0896	7.7363
18	A	2	2	13.3356	46915.10	4186.62	0.0699	9.9155
19	A	1	1	14.1567	57633.04	4781.58	0.0751	9.2273
20	A	1	1	13.0926	51879.57	4453.34	0.0814	8.5189
21	A	1	1	12.4121	54354.71	5041.16	0.0842	8.2366
22	A	1	1	13.3380	43829.02	3733.86	0.0768	9.0208
23	A	2	2	12.6200	48674.95	4453.19	0.0808	8.5826
24	A	2	2	14.6088	46283.85	3599.97	0.0750	9.2403
1	B	1	2	10.8869	46161.69	4874.49	0.0855	8.1038
2	B	2	1	11.2905	46502.31	4760.03	0.0829	8.3642
3	B	1	2	11.5089	54684.46	5483.21	0.0837	8.2796
4	B	2	1	11.3800	43907.00	4446.69	0.0859	8.0727
5	B	2	1	12.2696	43683.30	4168.65	0.0796	8.7034
6	B	1	2	10.6844	46709.82	4941.29	0.0903	7.6732
7	B	2	1	13.2243	47431.69	4148.77	0.0746	9.2940
8	B	1	2	12.9102	41876.77	3726.79	0.0758	9.1446
9	B	1	2	14.4034	47457.53	3908.45	0.0663	10.4565
10	B	1	2	13.7501	51221.53	4413.92	0.0681	10.1754
11	B	2	1	12.9466	46443.90	4052.54	0.0806	8.6044
12	B	2	1	14.0096	55632.17	4644.58	0.0710	9.7686
13	B	2	1	10.1765	50643.71	5938.11	0.0932	7.4381
14	B	1	2	12.9291	44933.57	3903.83	0.0800	8.6639
15	B	1	2	15.5773	49776.25	3874.89	0.0614	11.2884
16	B	2	1	11.0328	49752.03	5136.30	0.0883	7.8543
17	B	1	2	10.5385	50069.27	5412.19	0.0888	7.8023
18	B	1	2	13.9305	47999.29	4037.68	0.0698	9.9256
19	B	2	1	14.0825	58595.31	4345.10	0.0703	9.8656
20	B	2	1	12.8349	47847.81	4262.42	0.0788	8.7942
21	B	2	1	12.0963	52789.32	4960.94	0.0855	8.1095
22	B	2	1	13.0351	45299.70	4011.25	0.0760	9.1166
23	B	1	2	12.2348	44382.68	4105.29	0.0811	8.5427
24	B	1	2	13.7383	40994.68	3503.19	0.0703	9.8604

(SU) SUJETO, (F) FORMULACION, (P) PERIODO, (SE) SECUENCIA: 1=AB y 2=BA.

APENDICE 3

PARAMETROS DE BIODISPONIBILIDAD VALORES LOG PARA
TRATAMIENTO A (FLAGYL 500 mg) Y TRATAMIENTO B (METRONIDAZOL 500 mg)

SU	F	P	SE	Log ABC0-36	Log ABC0-inf	Log Cmax	Log Tmax
1	A	2	2	1.9886	2.0085	0.9831	0.1761
2	A	1	1	2.0042	2.0231	0.9783	0.1761
3	A	2	2	1.9532	1.9865	0.9254	0.1761
4	A	1	1	2.0894	2.1108	1.0744	-0.1249
5	A	1	1	2.0448	2.0708	0.9688	0.3010
6	A	2	2	2.0183	2.0398	1.0502	-0.1249
7	A	1	1	2.0466	2.0766	0.9684	0.1761
8	A	2	2	2.0622	2.0935	0.9501	0.4795
9	A	2	2	2.1077	2.1451	1.1920	-0.3010
10	A	2	2	2.0343	2.0605	1.1063	-0.3010
11	A	1	1	2.0171	2.0486	0.9289	0.3010
12	A	1	1	2.0148	2.0528	0.8427	0.6021
13	A	1	1	1.8861	1.9275	0.8627	0.3010
14	A	2	2	2.1154	2.1443	0.9977	0.3979
15	A	2	2	2.0809	2.1172	1.0911	-0.3010
16	A	1	1	1.9568	1.9821	0.9420	0.3979
17	A	2	2	1.9504	1.9719	0.9299	0.1761
18	A	2	2	2.0437	2.0771	1.0536	-0.3010
19	A	1	1	1.9798	2.0194	0.8149	0.6021
20	A	1	1	2.0251	2.0503	0.9139	0.6021
21	A	1	1	1.9672	1.9964	0.8522	0.4771
22	A	1	1	2.0995	2.1268	0.9990	0.3979
23	A	2	2	2.0202	2.0503	0.9310	0.4771
24	A	2	2	2.1105	2.1427	0.9809	0.6021
1	B	1	2	1.9879	2.0110	1.0034	-0.1249
2	B	2	1	1.9962	2.0214	0.9740	0.1761
3	B	1	2	1.9341	1.9599	0.8932	0.1761
4	B	2	1	2.0255	2.0509	0.9923	0.0000
5	B	2	1	2.0483	2.0790	0.9742	0.3010
6	B	1	2	1.9846	2.0051	1.0470	0.0000
7	B	2	1	2.0516	2.0811	0.9911	0.0000
8	B	1	2	2.1003	2.1276	1.0004	0.1761
9	B	1	2	2.0701	2.1070	1.0482	-0.1249
10	B	1	2	2.0200	2.0542	1.1202	-0.3010
11	B	2	1	2.0658	2.0912	0.9796	0.4771
12	B	2	1	1.9981	2.0320	0.9720	0.1761
13	B	2	1	1.8922	1.9253	0.9130	-0.3010
14	B	1	2	2.0832	2.1075	0.9653	0.3010
15	B	1	2	2.0659	2.1107	0.9693	-0.1249
16	B	2	1	1.9657	1.9883	0.9627	0.1761
17	B	1	2	1.9446	1.9656	1.0009	-0.3010
18	B	1	2	2.0592	2.0928	1.0068	-0.1249
19	B	2	1	2.0194	2.0610	0.9282	0.1761
20	B	2	1	2.0425	2.0693	0.9416	0.3010
21	B	2	1	1.9772	2.0034	0.9246	0.4771
22	B	2	1	2.0670	2.0957	1.0332	0.1761
23	B	1	2	2.0623	2.0856	0.9903	0.3010
24	B	1	2	2.1213	2.1545	1.0775	-0.1249

(SU) SUJETO, (F) FORMULACION, (P) PERIODO, (SE) SECUENCIA: 1=AB Y 2=BA.

APENDICE 4

RESULTADOS DEL LOS CALCULOS DE ANADEVA , LSM, CONTRASTES, PRUEBA DE EFECTO DE SECUENCIA Y ESTADISTICA BIOEQUIVALENTE BIOPAK (VALORES TRANSFORMADOS).

Dependent variable: Log10 AUC0-36

Total Observations: 48 Observations Used: 48

Model Sum of Squares: 0.1433708 df 25
 Error Sum of Squares 0.0088631 df 22
 Mean Square Error: 0.0004029

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SEQ	0.0084767	1	21.0408	0.0001
SUBJECT (SEQ)	0.1347674	22	15.2054	0.0001
PERIOD	0.0001026	1	0.2546	0.6189
FORM	0.0000241	1	0.0598	0.8091

Weighted Squares of Means (Type 3)

SEQ	0.0084767	1	21.0408	0.0001
SUBJECT (SEQ)	0.1347674	22	15.2054	0.0001
PERIOD	0.0001026	1	0.2546	0.6189
FORM	0.0000241	1	0.0598	0.8091

Contrasts

Weighted Squares of Means (Type 3) Contrast B vs A	0.0000241	1	0.0598	0.8091
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Weighted Squares of Means (Type 3) Test SEQ	0.0084767	1	1.3838	0.2520
Using SUBJECT (SEQ) as error term				

Least Squares Means

SEQ	Value	Std. Error
1.0000	2.01171	0.0040971
2.0000	2.03829	0.0040971
PERIOD	Value	Std. Error
1.0000	2.02354	0.0040971
2.0000	2.02646	0.0040971
FORM	Value	Std. Error
A	2.02571	0.0040971
B	2.02429	0.0040971

Bioavailability Statistics

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.250
Transformation = LOG10 Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORM
Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 2.025710, s.e. 0.004097

Test : B Least squares mean 2.024293, s.e. 0.004097

Difference = -0.0014, s.e.d. 0.0050, df 22
Ratio = 99.6743

	Classical	Restlake
C.L. 80%	= (97.9324 , 101.4471)	(98.1916 , 101.8084)
C.L. 90%	= (97.4163 , 101.9847)	(97.6572 , 102.3428)
C.L. 95%	= (96.9536 , 102.4713)	(97.1792 , 102.8208)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0000 Prob(> 120%)=0.0000 Max=0.0000 Total=0.0000

A.H. p-value = 0.0000
Power = 1.0000

APENDICE 4
RESULTADOS DE LOS CALCULOS DE ANADEVA, LSM, CONTRASTES,
PRUEBA DE EFECTO DE SECUENCIA Y ESTADISTICA BIOEQUIVALENCIA
DE BIOPAK (VALORES TRANSFORMADOS).

Dependent variable: Log10 AUC0-INF

Total Observations: 48 Observations Used: 48

Model Sum of Squares: 0.1495037 df 25
 Error Sum of Squares: 0.0082704 df 22
 Mean Square Error: 0.0003759

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SEQ	0.0086209	1	22.9324	0.0001
SUBJECT (SEQ)	0.1407048	22	17.0130	0.0001
PERIOD	0.0001249	1	0.3323	0.5702
FORM	0.0000530	1	0.1411	0.7108

Weighted Squares of Means (Type 3)

Effect	SS	df	F	Prob
SEQ	0.0086209	1	22.9324	0.0001
SUBJECT (SEQ)	0.1407048	22	17.0130	0.0001
PERIOD	0.0001249	1	0.3323	0.5702
FORM	0.0000530	1	0.1411	0.7108

Contrasts

Weighted Squares of Means (Type 3) Contrast	SS	df	F	Prob
B vs A	0.0000530	1	0.1411	0.7108

Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests

Weighted Squares of Means (Type 3) Test	SS	df	F	Prob
SEQ	0.0086209	1	1.3479	0.2591

Using SUBJECT (SEQ) as error term

Least Squares Means

Dependent variable: Log10 AUC0-INF

SEQ	Value	Std. Error
1.0000	2.04099	0.00395773
2.0000	2.06779	0.00395773

PERIOD	Value	Std. Error
1.0000	2.05278	0.00395773
2.0000	2.056	0.00395773

FORM	Value	Std. Error
A	2.05544	0.00395773
B	2.05334	0.00395773

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Log10 AUC0-INF

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.250
Transformation = LOG10 Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORM

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 2.055441, s.e. 0.003958

Test : B Least squares mean 2.053339, s.e. 0.003958

Difference = -0.0021, s.e.d. 0.0056, df 22
Ratio = 99.5171

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (97.8366 , 101.2264)	(98.1902 , 101.8098)
C.L. 90%	= (97.3385 , 101.7445)	(97.6635 , 102.3365)
C.L. 95%	= (96.8919 , 102.2135)	(97.1954 , 102.8046)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0000 Prob(> 120%)=0.0000 Max=0.0000 Total=0.0000

A.H. p-value = 0.0000
Power = 1.0000

APENDICE 4
RESULTADOS DE LOS CALCULOS DE ANADEVA, LSM, CONTRASTES,
PRUEBA DE EFECTO DE SECUENCIA Y ESTADISTICA BIOEQUIVALENTE
BIOPAK (VALORES TRANSFORMADOS).

Dependent variable: Log10 Cmax

Total Observations: 48 Observations Used: 48

Model Sum of Squares: 0.2056643 df 25
 Error Sum of Squares: 0.0466005 df 22
 Mean Square Error: 0.0021218

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SEQ	0.0531250	1	25.0372	0.0001
SUBJECT(SEQ)	0.1442664	22	3.0905	0.0054
PERIOD	0.0053996	1	2.5440	0.1249
FORM	0.0028733	1	1.3542	0.2570

Weighted Squares of Means (Type 3)

Effect	SS	df	F	Prob
SEQ	0.0531250	1	25.0372	0.0001
SUBJECT(SEQ)	0.1442664	22	3.0905	0.0054
PERIOD	0.0053996	1	2.5440	0.1249
FORM	0.0028733	1	1.3542	0.2570

Contrasts

Weighted Squares of Means (Type 3) Contrast	SS	df	F	Prob
B vs A	0.0028733	1	1.3542	0.2570
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Weighted Squares of Means (Type 3) Test	SS	df	F	Prob
SEQ	0.0531250	1	8.1013	0.0094
Using SUBJECT(SEQ) as error term				

Least Squares Means

Dependent variable: Log10 Cmax

SEQ	Value	Std. Error
1.0000	0.9472	0.00940267
2.0000	1.01374	0.00940267

PERIOD	Value	Std. Error
1.0000	0.969862	0.00940267
2.0000	0.991074	0.00940267

FORM	Value	Std. Error
A	0.972731	0.00940267
B	0.988205	0.00940267

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Log10 Cmax

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.600 Upper = 1.250
Transformation = LOG10 Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORM
Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 0.972731, s.e. 0.009403

Test : B Least squares mean 0.988205, s.e. 0.009403

Difference = 0.0155, s.e.d. 0.0133, df 22
Ratio = 103.6272

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (99.5182 , 107.9060)	(93.5949 , 106.4051)
C.L. 90%	= (98.3185 , 109.2226)	(92.0860 , 107.9140)
C.L. 95%	= (97.2501 , 110.4225)	(90.7738 , 109.2262)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0000 Prob(> 120%)=0.0000 Max=0.0000 Total=0.0000

A.H. p-value = 0.0000
Power = 1.0000

APENDICE 4
RESULTADOS DE LOS CALCULOS DE ANADEVA, LSM, CONTRASTES,
PRUEBA DE EFECTO DE SECUENCIA Y ESTADISTICA BIOEQUIVALENTE
BIOPAK (VALORES TRANSFORMADOS).

Dependent variable: Log10 Tmax

Total Observations: 48 Observations Used: 48

Model Sum of Squares: 2.9511634 df 25
 Error Sum of Squares: 0.7757750 df 22
 Mean Square Error: 0.0352625

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SEQ	0.6215043	1	17.6251	0.0004
SUBJECT(SEQ)	2.0654567	22	2.6624	0.0129
PERIOD	0.0086781	1	0.2461	0.6248
FORM	0.2555243	1	7.2463	0.0133

Weighted Squares of Means (Type 3)

	SS	df	F	Prob
SEQ	0.6215043	1	17.6251	0.0004
SUBJECT(SEQ)	2.0654567	22	2.6624	0.0129
PERIOD	0.0086781	1	0.2461	0.6248
FORM	0.2555243	1	7.2463	0.0133

Contrasts

Weighted Squares of Means (Type 3) Contrast	SS	df	F	Prob
B vs A	0.2555243	1	7.2463	0.0133
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Weighted Squares of Means (Type 3) Test	SS	df	F	Prob
SEQ	0.6215043	1	6.6199	0.0174
Using SUBJECT(SEQ) as error term				

Least Squares Means

Dependent variable: Log10 Tmax

SEQ	Value	Std. Error
1.0000	0.264385	0.0383311
2.0000	0.0368066	0.0383311
PERIOD	Value	Std. Error
1.0000	0.164042	0.0383311
2.0000	0.13715	0.0383311
FORM	Value	Std. Error
A	0.223558	0.0383311
B	0.0776341	0.0383311

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Log10 Tmax

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.250
Transformation = LOG10 Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation Variable: FORM

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 0.223558, s.e. 0.038331

Test : B Least squares mean 0.077634, s.e. 0.038331

Difference = -0.1459, s.e.d. 0.0542, df 22
Ratio = 71.4622

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (60.5960 , 84.2769)	(64.2018 , 135.7982)
C.L. 90%	= (57.6728 , 88.5486)	(60.5969 , 139.4031)
C.L. 95%	= (55.1605 , 92.5816)	(57.6751 , 142.3249)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.8122 Prob(> 120%)=0.0002 Max=0.8122 Total=0.8124

A.H. p-value = 0.8119
Power = 0.3890