

00524
180



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO PRELIMINAR PARA EVALUAR
LA BIOEQUIVALENCIA
DE AMPICILINA CAPSULAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

VERÓNICA / SEGOVIA MENDEZ



MÉXICO, D. F.,



EXÁMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO PRELIMINAR PARA EVALUAR
LA BIOEQUIVALENCIA
DE AMPICILINA CÁPSULAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA:

VERÓNICA SEGOVIA MÉNDEZ

MÉXICO, D.F.

2003.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	M. en F. Inés Fuentes Noriega
Vocal	Dra. Helgi Helen Jung Cook
Secretario	M. en F. Luis Jesús García Aguirre
1er. Suplente	M. en F. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado
2o. Suplente	M. en F. Liz Jannet Medina Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**LABORATORIO DE FARMACOCINÉTICA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:


M. en F. Luis Jesús García Aguirre

SUSTENTANTE:


Verónica Segovia Méndez

A mis padres:

Que siempre me han apoyado, por sus sabios consejos, por su cariño incondicional, porque han sabido ser padres y amigos, por las palabras de aliento me han ayudado a salir adelante en todo momento y sobretodo por sus enseñanzas.

A mi hermano Sergio:

Por haberme apoyado siempre y por el ejemplo que me has dado.

A Pedro:

Por todos los momentos de felicidad que he pasado a tu lado, por haberme ayudado a lograr una de mis metas, por ser tan especial, por la paciencia que has tenido conmigo, por tu apoyo incondicional y sobre todo por esa sinceridad y optimismo que te caracterizan.

A el M. en C. Luis Jesús García Aguirre:

Por ser la guía de este estudio, por haberme brindado la confianza y la oportunidad de realizar esta tesis, por ser un excelente maestro y sobre todo por su amistad.

A la M. en C. Liz Jannet Medina Reyes:

Por su ayuda desinteresada, por haberme enseñado la forma de trabajar de una forma muy especial, por su amistad.

A los profesores de la Facultad de Química:

Por su dedicación, por su tiempo y por compartir con nosotros sus conocimientos.

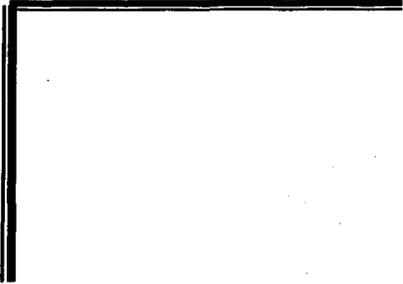
A Cindy , Maribel, Oly, Abraham, Cesar, Elisa:

Por haberme compartido sus conocimientos, por hacer agradable mi estancia en este laboratorio, por que no se dan por vencidos, por su dedicación y mas que nada por su amistad.

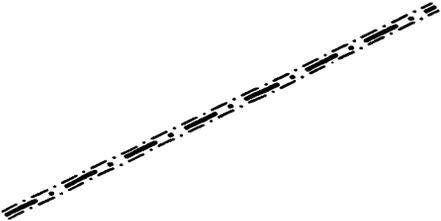
Especialmente a las comadres Cindy y Maribel que forman parte importante en la realización de este estudio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4



RESUMEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1

RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue realizar un estudio preliminar de bioequivalencia en población mexicana de una formulación oral conteniendo Ampicilina como principio activo, además de determinar el número de individuos mínimo y los tiempos de muestreo que se requieren para realizar un estudio de bioequivalencia.

La población en estudio se conformó de 8 individuos, 4 hombres y 4 mujeres distribuidos al azar de acuerdo a un diseño cruzado 2×2 , a los cuales se les administró por vía oral 1g de Ampicilina (2 cápsulas de 500mg).

Se colectaron muestras sanguíneas a los siguientes tiempos: 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.50, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0 horas después de su administración.

Para cuantificar Ampicilina en plasma se desarrolló y validó un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, determinándose linealidad, precisión, exactitud, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), selectividad, tolerancia y estabilidad en el rango de concentraciones de 0.4-12 $\mu\text{g/mL}$.

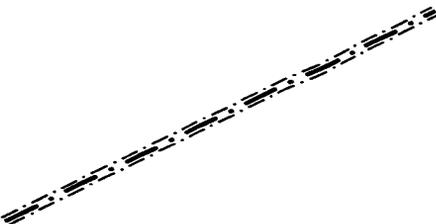
Por el método validado se obtuvo un tiempo de retención de 7.2 minutos para Ampicilina, un LC de 0.4 $\mu\text{g/mL}$ y un LD de 0.2 $\mu\text{g/mL}$. El recobro obtenido fue de 91.81% y la linealidad en el intervalo de concentraciones de 0.4-12 $\mu\text{g/mL}$ fue de 0.9998 promedio.

Los parámetros farmacocinéticos promedio de ABC_{0-t} , $ABC_{0-\infty}$, C_{max} , T_{max} y $t_{1/2}$ encontrados para la formulación de referencia fueron: $21.61 \pm 8.85 \mu\text{g}^*\text{h/mL}$, $24.67 \pm 7.57 \mu\text{g}^*\text{h/mL}$, $8.03 \pm 4.28 \mu\text{g/mL}$, $2.69 \pm 0.88 \text{ h}$, $1.26 \pm 0.51 \text{ h}$ respectivamente mientras que para la de prueba fueron: $23.52 \pm 11.49 \mu\text{g}^*\text{h/mL}$, $25.36 \pm 11.25 \mu\text{g}^*\text{h/mL}$, $8.26 \pm 4.73 \mu\text{g/mL}$, $2.13 \pm 0.44 \text{ h}$, $1.21 \pm 0.34 \text{ h}$ respectivamente.

Se aplicó una ecuación para determinar el número de individuos para realizar un estudio de bioequivalencia de Ampicilina cápsulas y se encontró que se requieren de 22 individuos.



INDICE



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE	
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	13
2. GENERALIDADES.....	16
2.1. PANORAMA DE LOS ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA.....	16
2.2. ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA EN MÉXICO.....	17
2.2.1. Criterios y requisitos.....	17
2.3. MONOGRAFÍA DE AMPICILINA.....	20
2.3.1. Propiedades químicas.....	20
2.3.1.1.Nombre químico de ampicilina.....	20
2.3.1.2.Fórmula condensada.....	20
2.3.1.3.Fórmula desarrollada.....	20
2.3.1.4.Peso molecular.....	21
2.3.2. Propiedades fisicoquímicas.....	21
2.3.2.1.Descripción.....	21
2.3.2.2.Solubilidad.....	21
2.3.2.3.Constante de ionización.....	21
2.3.2.4.Punto de fusión.....	21
2.3.3. Propiedades farmacológicas.....	21
2.3.3.1.Mecanismo de acción.....	21
2.3.3.2.Usos terapéuticos.....	22
2.3.3.3.Dosis utilizadas.....	23
2.3.3.4.Efectos adversos.....	23
2.3.3.5.Interacciones.....	24
2.3.3.6.Contraindicaciones.....	25
2.3.3.7.Sobredosis y tratamiento.....	26
2.3.4. Presentaciones comerciales.....	26

2.3.5. Farmacocinética.....	27
2.3.5.1.Vías de administración.....	27
2.3.5.2.Absorción.....	27
2.3.5.3.Distribución.....	27
2.3.5.4.Metabolismo.....	28
2.3.5.5.Eliminación.....	28
2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CUANTIFICAR AMPICILINA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.....	28
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	33
3.1. DESARROLLO DEL MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR AMPICILINA EN PLASMA.....	33
3.1.1. Material y equipo.....	33
3.1.2. Reactivos.....	34
3.1.2.1.Sustancias de Referencia.....	34
3.1.3. Preparación de soluciones para la fase móvil.....	34
3.1.4. Preparación de soluciones de referencia.....	35
3.1.5. Preparación de la curva patrón.....	35
3.1.6. Selección de la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}).....	36
3.1.7. Elección de la columna cromatográfica.....	36
3.1.8. Elección de la temperatura de la columna.....	37
3.1.9. Elección de la composición de la fase móvil y pH.....	37
3.1.10. Elección del método de extracción.....	38
3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR AMPICILINA EN PLASMA.....	40
3.2.1. Validación del método.....	40
3.2.1.1.Linealidad del método.....	40

3.2.1.2. Precisión.....	41
3.2.1.3. Exactitud.....	42
3.2.1.4. Límite de cuantificación y Límite de detección.....	42
3.2.1.5. Selectividad.....	43
3.2.1.6. Tolerancia.....	43
3.2.1.7. Recobro.....	44
3.2.1.8. Estabilidad.....	44
3.3. ETAPA CLINICA.....	47
3.3.1. Diseño del estudio.....	47
3.3.2. Selección de Voluntarios.....	47
3.3.3. Procedimiento.....	49
3.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS.....	50
3.4.1. Adecuabilidad del Sistema.....	50
3.4.2. Curva de calibración.....	51
3.4.3. Puntos control de calidad.....	51
3.4.4. Cuantificación de las muestras plasmáticas.....	52
3.4.5. Repeticiones.....	52
3.4.6. Análisis farmacocinético.....	54
3.4.7. Análisis estadístico.....	55
3.5. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA.....	55
4. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	58
4.1. DESARROLLO DEL MÉTODO POR CLAR PARA CUANTIFICAR AMPICILINA EN PLASMA.....	58
4.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR AMPICILINA EN PLASMA.....	62
4.2.1. Linealidad del método.....	63
4.2.2. Precisión y exactitud del método.....	64
4.2.2.1. Repetibilidad.....	64

4.2.2.2.Reproducibilidad.....	65
4.2.3. Limite de cuantificación.....	66
4.2.4. Limite de detección.....	66
4.2.5. Selectividad.....	67
4.2.6. Tolerancia.....	68
4.2.7. Recobro.....	70
4.2.8. Estabilidad.....	71
4.3. ANÁLISIS DE LAS MUSRAS PLASMÁTICAS DE VOLUNTARIOS.....	75
4.4. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO.....	78
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	80
4.6. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA.....	81
5. CONCLUSIONES.....	85
6. BIBLIOGRAFÍA.....	87
7. APÉNDICE I.....	91
8. APÉNDICE II.....	100
9. APÉNDICE III.....	102
10. APÉNDICE IV.....	123

INCICE DE TABLAS

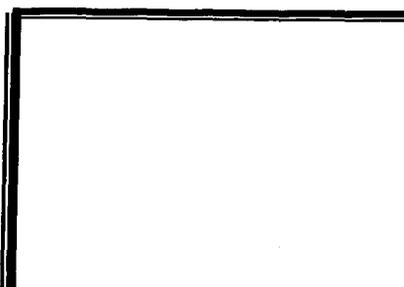
Tabla 1. Presentaciones de Ampicilina disponibles en México.....	26
Tabla 2. Preparación de la curva patrón de Ampicilina.....	36
Tabla 3. Fases móviles probadas para el análisis de Ampicilina.....	37
Tabla 4. Soluciones empleadas en el método de extracción sólido-líquido.....	39
Tabla 5. Aleatorización de voluntarios para el estudio de bioequivalencia de Ampicilina.....	47
Tabla 6. Parámetros de adecuabilidad del sistema.....	50
Tabla 7. Condiciones cromatográficas.....	62
Tabla 8. Parámetros cromatográficos evaluados.....	62
Tabla 9. Linealidad del método.....	63
Tabla 10. Repetibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar Ampicilina en plasma.....	64
Tabla 11. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar Ampicilina en plasma.....	65
Tabla 12. Condiciones originales del método.....	68
Tabla 13. Tolerancia del método al cambiar la proporción de fase móvil.....	68
Tabla 14. Tolerancia del método al cambiar la velocidad de flujo.....	69
Tabla 15. Tolerancia del método al cambiar la longitud de onda.....	69
Tabla 16. Recobro de Ampicilina de plasma humano.....	70
Tabla 17. Estabilidad de Ampicilina a temperatura ambiente.....	71
Tabla 18. Estabilidad de Ampicilina en refrigeración.....	72
Tabla 19. Estabilidad de Ampicilina en ciclos de congelación-descongelación.....	73
Tabla 20. Estabilidad de la muestra de Ampicilina en congelación.....	74
Tabla 21. Estabilidad de la muestra procesada de Ampicilina.....	75

INDICE

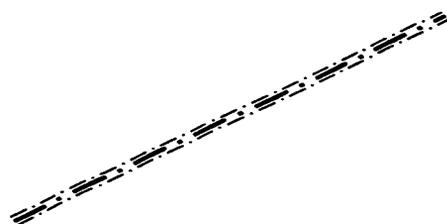
Tabla 22. Seguimiento de las muestras de control de calidad para Ampicilina.....	76
Tabla 23. Seguimiento de curvas de calibración para Ampicilina.....	77
Tabla 24. Concentración plasmática promedio de Ampicilina ($\mu\text{g/mL}$) \pm D.E., después de la administración de ambos productos.....	78
Tabla 25. Parámetros farmacocinéticos promedio correspondientes a Ampicilina para ambas formulaciones.....	80
Tabla 26. Resultados del análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos de Ampicilina (datos sin transformar).....	80
Tabla 27. Resultados del análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos de Ampicilina (transformación logarítmica).....	81
Tabla 28. Tamaño de muestra a partir de los resultados de análisis de varianza de 8 voluntarios.....	83

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la ampicilina anhidra.....	20
Figura 2. Espectro de absorción de Ampicilina en UV.....	58
Figura 3. Método de extracción para cuantificar Ampicilina en plasma.....	61
Figura 4. Linealidad del método para cuantificar Ampicilina en plasma.....	63
Figura 5. Selectividad del método.....	67
Figura 6. Gráfica de la concentración plasmática promedio de Ampicilina (\pm D.E) <i>versus</i> tiempo.....	79



**INTRODUCCIÓN
Y
OBJETIVOS**



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Los antibióticos β -lactámicos son productos útiles que se recetan frecuentemente y comparten una estructura y un mecanismo de acción comunes, dentro de este grupo se encuentra la Ampicilina que es un antibiótico de amplio espectro bactericida que actúa contra bacterias grampositivas y gramnegativas.⁽¹⁾

La Ampicilina es un fármaco de primera elección en infecciones bacterianas, se utiliza para el tratamiento de infecciones en vías respiratorias superiores como sinusitis, otitis media, exacerbaciones agudas de bronquitis crónica y epiglotitis. La Ampicilina esta indicada también para el tratamiento de la meningitis bacteriana, alguna infecciones gastrointestinales y en vías urinarias. Dicho antibiótico es el principio activo de varios medicamentos genéricos.

En nuestro país los medicamentos genéricos que se han introducido al mercado farmacéutico se evalúan mediante estudios de disolución y bioequivalencia, dichos estudios aseguran la eficacia y seguridad de estos medicamentos.

Para que los resultados de un estudio de bioequivalencia sean confiables se requiere contar con un número de sujetos y tiempos de muestreo adecuados. Un estudio preliminar de bioequivalencia es útil para determinar esas condiciones.

Considerando lo anterior se realizó un estudio preliminar de bioequivalencia de Ampicilina cápsulas cuyos objetivos fueron los siguientes:

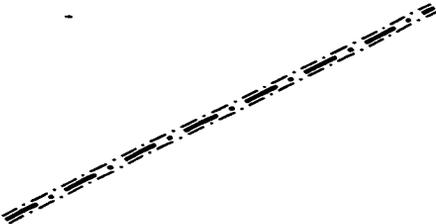
- Desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para cuantificar Ampicilina en plasma.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

- Comparar la biodisponibilidad entre dos formulaciones orales de Ampicilina (innovador contra el de prueba) en términos de velocidad y grado de absorción.
- Establecer el número de individuos y los tiempos de muestreo necesarios para realizar un estudio de bioequivalencia de Ampicilina cápsulas.



GENERALIDADES



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2. GENERALIDADES

2.1. PANORAMA DE LOS ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA

En la actualidad, en México una parte de la industria farmacéutica dedica sus esfuerzos al diseño y optimización de nuevas formulaciones con principios activos ya conocidos, una vez que el período de vigencia de la patente de dichos fármacos ha concluido (medicamentos genéricos).

Los medicamentos genéricos tienen un papel importante en el mercado farmacéutico desde el punto de vista social y económico al permitir reducir el elevado costo de los medicamentos innovadores (medicamento que cuenta con la patente original a nivel mundial).^(2,3)

En ese sentido y con la finalidad de asegurar la eficacia y seguridad de los medicamentos genéricos la Secretaría de Salud implemento un programa de evaluación de este tipo de medicamentos a partir de estudios de disolución y bioequivalencia.⁽⁴⁾

Bioequivalencia se refiere a la velocidad y proporción en que el mismo principio activo de dos medicamentos (innovador y prueba) alcanzan la circulación sistémica, por ello, la bioequivalencia se cuantifica mediante los parámetros de concentración plasmática máxima (C_{máx}), tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima (t_{max}) y área bajo la curva (biodisponibilidad).⁽⁵⁾

En México, se considera que dos productos son bioequivalentes si son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas, siempre y cuando cumplan con las especificaciones de organismos especializados reconocidos internacionalmente y en los cuales no se observa diferencia significativa en la velocidad y cantidad de fármaco absorbida, cuando son administrados ya sea en dosis única o dosis múltiple bajo condiciones experimentales similares.⁽³⁾

Si se demuestra que la biodisponibilidad en el medicamento genérico es equivalente a la del medicamento innovador, entonces podemos considerarlos intercambiables⁽⁵⁾, es decir, el medicamento genérico puede sustituir al medicamento innovador en el tratamiento de una enfermedad o síntoma en un paciente concreto. La evidencia de eficacia clínica y seguridad del innovador se aplica al genérico.⁽⁶⁾

2.2. ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA EN MÉXICO

2.2.1. Criterios y requisitos

Las pruebas de bioequivalencia en humanos deben realizarse con base en lo dispuesto en la Ley General de Salud, en el Reglamentos de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, las Buenas Prácticas Clínicas y demás disposiciones aplicables.

En México la Secretaría de Salud publicó en el Diario Oficial la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, así como los requisitos a que deben sujetarse los laboratorios terceros autorizados.⁽³⁾

La población de voluntarios para un estudio de bioequivalencia se debe seleccionar con la intención de minimizar la variabilidad de los resultados experimentales y permitir la detección de diferencias entre los productos farmacéuticos.⁽⁶⁾

Para la selección de los voluntarios se debe considerar lo siguiente:^(3, 7)

- Características antropométricas: se prefieren individuos de la misma raza, edad (entre 18 y 55 años) y peso ($\pm 10\%$ del ideal).
- Estado físico: deber ser sanos, lo que se determina por medio de la historia clínica y pruebas de laboratorio y gabinete.

- No deben tener antecedentes de drogadicción o de abuso de alcohol, café, tabaco o bebidas de cola ni estar bajo la administración de medicamentos.
- Características psíquicas: Stress y neurosis pueden afectar la biodisponibilidad.

El diseño experimental a emplear debe responder la pregunta de si existe bioequivalencia entre dos medicamentos para lo cual un diseño de tipo cruzado 2×2 es el mas adecuado⁽⁶⁾ ya que permite minimizar la existencia de la variabilidad individual.⁽⁷⁾

El número de voluntarios debe calcularse por métodos estadísticos adecuados.⁽⁸⁾ En los estudios de bioequivalencia el tamaño de la muestra requerido para tener la capacidad de establecer bioequivalencia dentro de limites significativos puede calcularse por hipótesis puntual.⁽⁴⁾

El muestreo debe realizarse por un periodo que permita cubrir por lo menos el 80% del área bajo la curva de concentración plasmática (como mínimo 4 vidas medias, en el caso de sangre o 7 vidas medias en el caso de orina). El horario de obtención de muestras se debe diseñar de forma que permita caracterizar los parámetros farmacocinéticos de área bajo al curva de concentración plasmática en función del tiempo (ABC), concentración plasmática máxima (C_{máx}) y tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima (t_{máx}).⁽⁹⁾

Se deben obtener al menos once tiempos de muestreo, en los cuales se incluyan el tiempo 0, 3-4 puntos antes del C_{máx}, 3-5 puntos alrededor del C_{máx} y 4-6 puntos durante la fase de eliminación.⁽³⁾

Es necesario contar con métodos validados para cuantificar fármacos en fluidos biológicos, entendiéndose por validación a la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado.

Los parámetros con los que se debe validar un método son:⁽³⁾

Linealidad: Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.

Estabilidad: Es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

Exactitud: Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Límite de detección: Mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de cuantificación: Es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad: Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

Reproducibilidad intralaboratorio: Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis.

Recuperación absoluta: Eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

Selectividad: Capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

Tolerancia: Capacidad el método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

2.3. MONOGRAFÍA DE AMPICILINA

La ampicilina es un antibiótico semisintético bactericida contra grampositivos y gramnegativos. Pertenec a las aminopenicilinas y es hidrolizada por β -lactamasas. Se encuentra en varias formas hidratadas (monohidrato, sesquihidrato, trihidrato) y en forma de sal, la forma L(+) es menos activa como antibiótico que la forma D(-). Puede ser administrada por vía oral como trihidrato o por vía parenteral como sal.^(1, 9, 10)

2.3.1. Propiedades químicas⁽¹¹⁾

2.3.1.1. Nombre químico

Ácido 6-[D(-)- α -aminofenilacetamido] penicilánico

2.3.1.2. Fórmula condensada

$C_{16}H_{19}N_3O_4S$

2.3.1.3. Fórmula desarrollada (Figura 1)

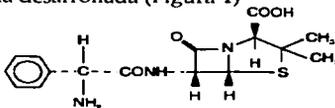


Figura 1. Estructura química de la ampicilina anhidra.

2.3.1.4. Peso molecular

349.41 g/mol

2.3.2. Propiedades fisicoquímicas^(10, 11, 12)

2.3.2.1. Descripción

Polvo blanco cristalino

2.3.2.2. Solubilidad

La solubilidad de ampicilina es 1 en 170 de agua; prácticamente insoluble en etanol, acetona, tetracloruro de carbono, cloroformo y éter.

2.3.2.3. Constante de ionización^(12, 13)

pKa 2.5 (-COOH), 7.3 (-NH₂), (25°).

2.3.2.4. Punto de fusión

Se han reportado puntos de fusión de 199-202°C.

2.3.3. Propiedades farmacológicas

2.3.3.1. Mecanismo de acción⁽¹⁴⁾

La ampicilina se adhiere a las proteínas bacterianas fijadoras de penicilina inhibiendo así la síntesis de la pared celular bacteriana.

Actúa inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBPs (Penicillin-Binding Proteins) localizadas en la pared celular. Al impedir que la pared celular se construya correctamente, la ampicilina ocasiona, en último término, la lisis de la bacteria y su muerte.

2.3.3.2. Usos terapéuticos^(1, 9)

-Infecciones de vías respiratorias superiores.

La ampicilina es activa contra *Streptococcus pyogenes* y muchas cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *H.influenzae* que son las principales bacterias patógenas de vías respiratorias superiores. Es eficaz contra sinusitis, otitis media, exacerbaciones agudas de bronquitis crónica y epiglotitis causada por cepas sensibles de estos microorganismos.

-Infecciones de vías urinarias.

Las infecciones de vías urinarias por enterococos, infecciones no complicadas causada por Enterobacteriaceae siendo la especie más común *E.coli*. La ampicilina suele ser un compuesto eficaz aunque se ha vuelto más común la resistencia a ella.

-Meningitis.

La ampicilina posee excelente actividad contra *L.monocytogenes*, una causa de meningitis en sujetos inmunodeficientes. La meningitis bacteriana aguda suele ser causada por *H.influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *N.meningitidis*. Dado que 20 a 30% de las cepas de *H.influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* son resistentes a dicho antibiótico, la ampicilina no está indicada como fármaco único para tratar la meningitis.

-Infecciones por *Salmonella*.

Los cuadros que acompañan bacteremia, enfermedades con focos metastásicos y síndrome de fiebre entérica (incluida la fiebre tifoidea) mejoran adecuadamente con ampicilina.

-Septicemia y endocarditis (la adición de un aminoglucósido puede incrementar la efectividad de la ampicilina cuando se trate de una endocarditis por enterococo).

Deben realizarse estudios bacteriológicos para determinar el agente etiológico y su sensibilidad a la ampicilina.

2.3.3.3. Dosis utilizadas^(9, 14)

La dosis de ampicilina varía con el tipo y la gravedad de la infección que se busca tratar así como con la función renal y la edad.

Los neonatos (incluso de una semana de vida) deben recibir de 25 a 50 mg/kg de peso corporal cada 12 horas. Los niños de 1 a 4 años de edad deben recibir 100 a 200 mg/kg al día en tres fracciones y los de mayor edad, la misma dosis diaria en cuatro porciones.

En enfermedades leves a moderadas, la dosis para adultos es de 1 a 4 gramos cada seis horas. La ampicilina se administra por vía parenteral cuando se trata de infecciones graves, en estos casos la dosis es de 6 a 12 g al día. En presencia de choque, la absorción a partir de los sitios intramusculares está reducida, por lo tanto, se recomienda la vía intravenosa.

Se administran hasta 400 mg/Kg de peso para el tratamiento de meningitis.

2.3.3.4. Efectos adversos.

Como cualquier penicilina, se pueden presentar reacciones principalmente debidas a fenómenos de hipersensibilidad. Es más probable que se presenten en individuos quienes previamente han demostrado ser hipersensibles a la penicilina y en aquellos con antecedentes de alergia, asma, fiebre del heno o urticaria.

Se han reportado las siguientes reacciones adversas con el uso de la ampicilina:

- a) Gastrointestinales. Se deben a la reducción de la flora: náusea, vómitos, anorexia, diarrea, gastritis y dolor abdominal. En algunos casos puede producirse colitis pseudomembranosa. Estas reacciones se asocian usualmente con la forma oral.^(9, 14, 15)

- b) Reacciones de hipersensibilidad. A menudo se han reportado exantemas cutáneos y urticaria, así como algunos casos de dermatitis exfoliativa y eritema multiforme. La anafilaxia es la reacción más grave experimentada y a menudo se le asocia con las formas de dosificación parenteral. La ampicilina y sus productos de degradación actúan como haptenos después de su reacción covalente con proteínas. El producto intermediario antigénico más importante es la fracción peniciloil que se forma al abrirse el anillo β -lactámico, y se le considera como el determinante mayor (predominante) de la alergia a la penicilina.⁽¹⁾ Si se presentara cualquiera de las reacciones de hipersensibilidad debe descontinuarse la ampicilina a menos que, en opinión del médico, la infección con se está tratando atente contra la vida del paciente y sólo pueda tratarse con ampicilina.
- c) Hemático y linfático. Se han reportado anemia trombocitopénica, púrpura trombocitopénica, eosinofilia, leucopenia y agranulocitosis durante el tratamiento con penicilinas. Estas reacciones suelen ser reversibles al descontinuar el tratamiento y se piensa que sean fenómenos de hipersensibilidad.^(14, 15)
- d) Sistema nervioso central. Se han presentado con poca frecuencia cefaleas, agitación, insomnio y confusión.⁽¹⁵⁾
- e) Locales. Dolor en el sitio de inyección, irritación venosa, tromboflebitis.⁽¹⁴⁾
- f) Embarazo y lactancia. No se ha establecido la seguridad de ampicilina en mujeres en lactancia ni durante el embarazo.

2.3.3.5. Interacciones.⁽¹⁴⁾

El probenecid inhibe la excreción tubular de la ampicilina, aumentando los niveles plasmáticos del antibiótico. En la práctica clínica estos dos fármacos se suelen asociar para el tratamiento de la gonorrea.

Por regla general, esta interacción no ocasiona problemas clínicos excepto en pacientes con insuficiencia renal.

El uso simultáneo con un antibiótico aminoglucósido produce un efecto bactericida sinérgico contra algunas cepas de enterococos y estreptococos del grupo B. Sin embargo, los fármacos son física y químicamente incompatibles y se inactivan si se mezclan o se administran juntos.

El uso concomitante de la ampicilina y clavulanato mejora la actividad bactericida de la ampicilina frente a las bacterias que producen β -lactamasas como *H. Influenzae*, porque el ácido clavulánico es un inhibidor de la β -lactamasa.

La ampicilina en grandes dosis inhibe la excreción tubular renal del metotrexato, retardando así su eliminación y elevando las concentraciones plasmáticas de este último.

El uso simultáneo con alopurinol aumenta la incidencia del exantema cutáneo.^(14, 15)

La ampicilina puede reducir la eficacia de los anticonceptivos orales que contienen estrógenos⁽⁹⁾ debido, a una estimulación del metabolismo de estos, o a una reducción de su circulación enterohepática al reducirse la flora gastrointestinal por acción del antibiótico.

Los inhibidores de la bomba de protones tienen efectos de larga duración sobre la secreción gástrica de ácido. Como la absorción gástrica de la ampicilina está influida por el pH gástrico, la administración concomitante de lansoprazol, rabeprazol, u omeprazol puede tener un efecto significativo sobre la biodisponibilidad de la ampicilina.

2.3.3.6. Contraindicaciones.

Antecedentes de una reacción de hipersensibilidad previa a cualquiera de las penicilinas.⁽¹⁵⁾

La ampicilina esta relativamente contraindicada en pacientes con infecciones virales o leucemia linfoide ya que estos pacientes pueden desarrollar rash.

2.3.3.7. Sobredosis y tratamiento ^(14, 15)

Entre los signos de sobredosis están sensibilidad neuromuscular o convulsiones. Después de ingestión reciente, se debe vaciar el estómago induciendo emesis o con lavado gástrico, para reducir la absorción se debe seguir con carbón activado. En pacientes con alteración de la función renal, los antibióticos de la clase de la ampicilina pueden ser removidos por hemodiálisis pero no por diálisis peritoneal.

2.3.4. Presentaciones comerciales

En México se encuentran disponibles las siguientes presentaciones comerciales que contienen ampicilina. ⁽¹⁵⁾ (Tabla 1)

Tabla1. Presentaciones de Ampicilina disponibles en México.

Nombre Comercial	Forma Farmacéutica	Laboratorio
AMPICLOX-D*	Cápsulas	LABORATORIOS SANFER, S. A. de C. V.
AMSAPEN*	Solución inyectable	ANTIBIOTICOS DE MEXICO, S. A. de C. V.
ANGLOPEN *	Cápsulas, suspensión, solución inyectable y tabletas	LABORATORIOS LIOMONT, S. A. de C. V.
BINOTAL ^{MR}	Cápsulas, comprimidos, suspensión y frasco ampula	BAYER DE MEXICO, S. A. de C. V.
DIFERIN*	Cápsulas	LABORATORIOS GROSSMAN, S. A.
FLAMICINA *	Cápsulas, tabletas, suspensión y solución inyectable	LABORATORIOS FUSTERY, S. A. de C. V.
MAROVILINA *	Cápsulas y suspensión	ATLANTIS, S. A. de C. V.
OMNIPEN*	Cápsulas, suspensión oral y solución inyectable	WYETH, S. A. de C. V.
PENBRITIN*	Tabletas y solución inyectable	LABORATORIOS HORMONA®, S. A. de C. V.
PENBRITIN® T-5	Cápsulas y suspensión	LABORATORIOS HORMONA®, S. A. de C. V.
PENTREXYL*	Cápsulas, solución inyectable, suspensión, tabletas, gotas	BRISTOL-MYERS SQUIBB DE MEXICO, S. de R. L. de C. V.
SINAPLIN	Cápsulas, solución inyectable y suspensión	REPRESENTACIONES E INVESTIGACIONES MEDICAS, S. A. de C. V.
UNASYNA*	Solución inyectable	PFIZER, S. A. de C. V.

2.3.5. Farmacocinética

2.3.5.1. Vías de administración⁽¹⁴⁾

La ampicilina puede ser administrada por vía oral, intramuscular o intravenosa.

2.3.5.2. Absorción⁽¹⁾

La ampicilina es estable en medio ácido y se absorbe adecuadamente después de ser ingerida. Una dosis oral de 0.5 g produce concentraciones plasmáticas máximas de $3 \mu\text{g/mL}$ a las dos horas. La absorción es incompleta si la persona consume alimentos antes de ingerir el fármaco.

La inyección intramuscular de 0.5 a 1g de ampicilina sódica genera concentraciones máximas en plasma de 7 a $10 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, después de una hora.

2.3.5.3. Distribución

Después de la ingesta de ampicilina, esta se absorbe y se distribuye ampliamente por todo el cuerpo. El volumen de distribución es de 0.2 a 0.5 L/Kg y presenta una unión a proteínas plasmáticas de un 20%.^(9, 12)

Se alcanzan concentraciones terapéuticas, en tejidos y secreciones como líquido sinovial, pleural, pericárdico y en bilis. Solo cifras pequeñas se detectan en secreciones prostáticas, tejido encefálico y líquido intraocular. La concentración de ampicilina en líquido cefalorraquídeo es mayor cuando hay inflamación en las meninges que cuando son normales.⁽¹⁾

La ampicilina atraviesa la membrana placentaria.⁽¹⁴⁾

2.3.5.4. Metabolismo^(9, 15)

La ampicilina se metaboliza solo parcialmente a ácido peniciloico. Su metabolismo hepático es de un 7 a 11% por hidrólisis.

2.3.5.5. Eliminación.

La ampicilina se excreta en la orina mediante secreción tubular renal y filtración glomerular.⁽¹⁴⁾

El 30% de una dosis oral es excretada en orina en 6 horas como fármaco inalterado y el 10% como ácido peniciloico; después de una administración parenteral cerca de 75% es excretada inalterada en 6 horas. También se excreta en la leche materna.⁽¹²⁾

La vida media de eliminación es de 1 a 1.5 horas; en pacientes con deterioro renal avanzado, la vida media es de 10 a 24 horas.⁽¹⁴⁾

La ampicilina aparece en la bilis y en cantidades apreciables en las heces.⁽¹⁾

2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CUANTIFICAR AMPICILINA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

A continuación se describen algunos métodos analíticos para la cuantificación de Ampicilina por cromatografía de líquidos de alta resolución.

- 1) Ishida⁽¹⁶⁾ y colaboradores desarrollaron un método para cuantificar Ampicilina en suero humano por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Las muestras sanguíneas fueron extraídas usando una extracción fase sólida con cartuchos conteniendo un sorbente de estireno divinil/benceno. Las muestras extraídas fueron separadas por CLAR fase reversa utilizando una columna C₁₈, la cual fue mantenida a una

temperatura de 30°C. La detección fue por UV a una longitud de onda de 220 nm. Se utilizó N², N⁴, N⁶-trimetilmelamina como estándar interno. La fase móvil consistió de acetonitrilo 10mM -NaH₂PO₄ (6.5:93.5, v/v). Por este método se obtuvieron tiempos de retención de 20.7 min para ampicilina y 15.4 min para el estándar interno. El límite de cuantificación reportado fue de 0.19 μg/mL utilizando 0.5 mL de suero. La linealidad en el rango de concentraciones de 0.19-9.41 μg/mL mostró un coeficiente de correlación de 0.999.

- 2) Marzo A.⁽¹⁷⁾ y colaboradores, diseñaron un método para cuantificar Ampicilina en plasma utilizando el siguiente sistema cromatográfico: una columna μ Bondapak C₁₈, con una fase móvil constituida de metanol-KH₂PO₄ 0.067M (20:80, v/v) a un flujo de 1.5 mL/min. La detección se realizó a 225 nm. El tratamiento de la muestra consistió en tomar 0.5 mL de plasma y adicionar 1 ml de metanol para precipitar las proteínas, después de agitar por 5 minutos y centrifugar a 2400 g por 10min, 1mL de sobrenadante fue separado y se adicionaron 2 μg de cefazolin como estándar interno. Los tiempos de retención para ampicilina y el estándar interno fueron 9.0 y 14.0 min respectivamente. El coeficiente de correlación fue de 0.9997 en el rango de 0.1-10 μg/mL. Los autores reportan un recobro de ampicilina de 97.6% y un límite de detección de 0.5 μg/mL.

- 3) Lee⁽¹⁸⁾ y colaboradores, desarrollaron un método para determinar metampicilina y su metabolito ampicilina en plasma utilizando la técnica de swicheo, para la cual se utilizó una precolumna Novo-Pak C₈ y una columna analítica Ultracarb5 ODS-30.

La fase móvil consistió en dos componentes:

- A) Acetonitrilo : solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 0.02M (4:96,v/v).
- B) Acetonitrilo : solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 0.02M (30:70,v/v).

Se utilizó un gradiente lineal:

45% B en A (0-10minutos)

de 45% B en A a 100% B (10-18 minutos)

100% B (18-30 minutos) a un flujo de 1.0ml/min.

En esta técnica se realizó una inyección directa de una pequeña cantidad de plasma diluido con una solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH 7.0 , junto con el estándar interno Cefalexina. La longitud de onda utilizada fue de 230 nm. Los tiempos de retención para ampicilina y metampicilina fueron 10 y 20 minutos respectivamente. Los autores reportaron un Limite de detección de $0.1 \mu\text{g/mL}$, un recobro promedio de ampicilina de 93.7 ± 1.1 . En el rango de concentraciones de $0.1\text{-}100 \mu\text{g/mL}$ se observó un comportamiento lineal con un coeficiente de correlación de 0.999.

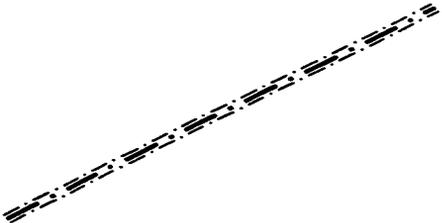
- 4) Vallén⁽¹⁹⁾ y colaboradores desarrollaron un método para cuantificar ampicilina en plasma por CLAR, el cual incluye un paso de desproteinización y separación en un sistema cromatográfico columna acoplada seguido por derivatización post-columna y una detección por fluorescencia. El sistema cromatográfico utilizado incluye una precolumna RP18. Una columna Perkin-Elmer 3x3TM y una fase móvil constituida por una mezcla metanol en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 al 17% conteniendo hexilsulfato de sodio 1 mM. Una segunda columna

utilizada fue Microspher C18 para la cual se empleó una fase móvil de metanol en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 al 35% a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. El tiempo de retención reportado para ampicilina después de la primera columna fue aproximadamente de 2.5 minutos en tanto que en la segunda columna fue de 5 minutos.

Una vez que la muestra salía de la segunda columna se mezcló con una solución de fluorescamina en Acetonitrilo (0.16 mg/mL), la fluorescencia se monitoreo a 470 nm. El limite de detección reportado fue de 14 nmol/L y se observó una linealidad en el rango de concentraciones de 0.1-20 μ mol/L.



**PARTE
EXPERIMENTAL**



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

3. PARTE EXPERIMENTAL

El estudio realizado consistió de dos partes:

- a) Desarrollo y validación del método analítico.
- b) Análisis de las muestras de los voluntarios

3.1. DESARROLLO DEL MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR AMPICILINA EN PLASMA

3.1.1. Material y equipo

Agitador Vortex Thermolyne Maxi Mix II.

Balanza Ohaus Mod AS120.

Potenciómetro OAKTON pH 1000 series.

Baño de Agua Fisher Scientific.

Membranas de filtración Millipore de 0.45 μ m .

Micropipetas Eppendorf.

Micropipeta Repetidora Eppendorf.

Sistema de Filtración Millipore.

Sonificador Fisher Scientific FS20.

Cromatógrafo de Líquidos Waters Millenium compuesto por:

Dos bombas isocráticas Waters 510 con controlador de gradiente.

Integrador Paquete computacional Millennium 32, Waters.

Detector de arreglo de diodos, modelo 996 Waters.

Automuestreador (Inyector automático), modelo 717 plus de Waters.

Equipo para extracción sólido-líquido Waters.

3.1.2.Reactivos

Borato de sodio 10-hidrato, J.T. Baker .

Fosfato dibásico de sodio anhidro J. T. Baker.

Hidróxido de Sodio, J. T. Baker.

Ácido o-fosfórico, Merck.

Ácido acético glacial, J. T. Baker.

Acetonitrilo HPLC, J.T. Baker.

Metanol HPLC, J. T. Baker.

Nitrógeno UN1066.

Agua HPLC, obtenida a partir de agua destilada y desionizada con equipo Milli Q-Waters System.

Plasma humano fresco congelado, con etiqueta de sangre segura y resultado negativo a las pruebas de VIH, hepatitis B y VDRL donado por el Centro Nacional de Transfusión sanguínea.

3.1.2.1.Sustancias de Referencia

Ampicilina trihidrato Estándar primario. Laboratorio COSUFAR, lote 35D0.

3.1.3.Preparación de soluciones para la fase móvil

Solución amortiguadora de Borato de Sodio 0.01M pH 10.0

Transferir 7.63g de borato de sodio 10-hidrato a un matraz volumétrico de 2L, disolver y llevar a volumen con agua desionizada. Ajustar a pH 10.0 con hidróxido de sodio. Filtrar la solución al vacío a través de una membrana millipore de 0.45 μ m y desgasificar por sonicación al vacío durante 20 minutos.

3.1.4. Preparación de soluciones de referencia

Solución patrón de Ampicilina de 200 $\mu\text{g/mL}$

Pesar con exactitud 0.01g de Ampicilina, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y llevar a volumen con solución amortiguadora de fosfato dibásico de sodio 0.02M pH 10.0.

La concentración de esta solución es de 200 $\mu\text{g/mL}$ de Ampicilina (Solución patrón 1).

Solución patrón de Ampicilina de 20 $\mu\text{g/mL}$

Tomar una alícuota de 10mL de la solución patrón 1 y transferirla a un matraz volumétrico de 100 mL. Llevar a volumen con solución amortiguadora de fosfato dibásico de sodio 0.02M pH 10.0. La concentración final de ésta solución es de 20 $\mu\text{g/mL}$ (Solución patrón 2).

3.1.5. Preparación de la curva patrón

Se evaluaron siete puntos correspondientes a la curva de calibración, 0.4, 0.6, 1.5, 2.0, 6.0, 8.0 y 12.0 $\mu\text{g/mL}$ y tres puntos control de calidad con valores de concentraciones diferentes a las establecidas para la curva de calibración pero que se encontraban dentro del intervalo. Los valores de concentración asignados para los puntos control fueron de 1.0, 4.0 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

PARTE EXPERIMENTAL

En la tabla 2 se establece la preparación de los puntos de la curva de calibración así como, la de los puntos control, a partir de las soluciones patrón de Ampicilina.

Tabla 2. Preparación de la curva patrón de Ampicilina.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen solución patrón de Ampicilina 20 $\mu\text{g/mL}$ (μL)	Volumen solución patrón de Ampicilina 200 $\mu\text{g/mL}$ (μL)	Volumen solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.02 M pH 7.0 (μL)	Volumen de plasma (μL)
0.4	20	-	80	1000
0.6	30	-	70	1000
1.0	50	-	50	1000
1.5	75	-	25	1000
2.0	100	-	-	1000
4.0	-	20	80	1000
6.0	-	30	70	1000
8.0	-	40	60	1000
10.0	-	50	50	1000
12.0	-	60	40	1000

3.1.6. Selección de la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}).

Se realizó un barrido de Ampicilina en la región de 190 a 300 nm del ultravioleta (UV), con el fin de identificar la longitud de onda de máxima absorción para Ampicilina.

3.1.7. Elección de la columna cromatográfica.

Se probaron dos columnas cromatográficas fase reversa, se seleccionó aquella que permitiera obtener parámetros cromatográficos óptimos, factor de capacidad >2.0 y simetría de pico ≤ 2.0 .

Las columnas evaluadas fueron las siguientes:

- 1) Symmetry Shield™ C₁₈ 5 μm 3.9 × 150mm
- 2) X Terra RP18 5 μm 4.6 × 250mm

3.1.8. Elección de la temperatura de la columna.

Se probaron dos temperaturas de la columna 25°C y 40°C, con el fin de evaluar su efecto sobre la respuesta cromatográfica de Ampicilina.

3.1.9. Elección de la composición de la fase móvil y pH.

Se evaluó el comportamiento de Ampicilina utilizando solución amortiguadora de Fosfato de sodio 0.01 M pH (3, 5, 7, 10) y solución amortiguadora de Borato de sodio 0.01 M pH 10 a diferente proporción.

La fase móvil se seleccionó considerando la obtención de parámetros cromatográficos óptimos como: factor de capacidad > 2.0 y simetría de pico ≤ 2.0.

En la tabla 3 se muestran las soluciones amortiguadoras, pH y proporción de fase móvil que se probaron para el análisis de Ampicilina.

Tabla 3. Fases móviles probadas para el análisis de Ampicilina.

Solución amortiguadora	Proporción de acetonitrilo	pH
Fosfato de sodio 0.01 M	5-13%	3,5 y 7
Borato de sodio 0.01 M	10-13%	10
Fosfato de sodio 0.01 M	13%	10
Borato de sodio 0.01 M	12-20%	10

3.1.10. Elección del método de extracción

Se probaron dos métodos de extracción y se seleccionó el que permitiera obtener un mayor recobro del fármaco y mínima presencia de impurezas procedentes del plasma.

o Método de precipitación:

Para precipitar el 99% de las proteínas presentes en un volumen de plasma, se probó un método de precipitación con Metanol en proporción 2:1 con respecto a plasma y un método de precipitación con Acetonitrilo en proporción 1.5:1 con respecto a plasma.

o Método de extracción sólido-líquido:

Tomando como base que la ampicilina presenta un comportamiento básico se probó un método de extracción sólido-líquido utilizando cartuchos OASIS HLB de 30 mg 1ml de capacidad.

En la tabla 4 se muestran las etapas del método de extracción así como las soluciones empleadas en cada una de ellas.

Tabla 4. Soluciones empleadas en el método de extracción sólido-líquido.

Etapa	Soluciones empleadas
Activación	Solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.02 M pH 12.0
Carga	1mL de muestra plasmática
Lavado	<ul style="list-style-type: none"> • Solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.02 M pH 12.0:Metanol en proporción 90:10 (v/v) • Solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.02 M pH 12.0 • Solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.02 M pH 7.0
Elución	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido acético 2% en Metanol (alícuota de 1ml) • Ácido acético 2% en Metanol (alícuota de 2ml) • Ácido acético 2% en Diclorometano (alícuota de 2ml)
Temperatura de evaporación en atmósfera de nitrógeno	<ul style="list-style-type: none"> • 25°C • 30°C • 35°C • 40°C • 50°C
Reconstitución	<ul style="list-style-type: none"> • Metanol al 5% en agua • Acetonitrilo: Agua en proporción 30:70 (v/v) • Solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.02 M pH 10.0

Una vez establecido el método de extracción se probaron 2 tipos de cartuchos más:

Bond-Elut C18 de 50 mg 1mL de capacidad.

Strata C18 de 50 mg 1mL de capacidad.

La elección del cartucho se basó en la obtención de un número mayor de extracciones, del por ciento de recobro y de la mínima cantidad de impurezas extraídas.

3.2.VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR AMPICILINA EN PLASMA

Una vez desarrollado el método y establecidas las condiciones analíticas se realizó la validación correspondiente con el propósito de contar con evidencia experimental documentada de que el procedimiento se comportaba consistente y garantizaba la obtención de resultados confiables.

3.2.1.Validación del método

Con base en lo establecido en la NOM-177-SSA1-1998, en lo referente a validación de métodos analíticos para realizar pruebas de bioequivalencia, se evaluaron los siguientes parámetros:

3.2.1.1.Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó preparando tres curvas de calibración en plasma, en un día de trabajo, en el intervalo de concentraciones de 0.4 a 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ver tabla 2). Las curvas se prepararon a partir de soluciones patrón independientes. Las muestras se procesaron de acuerdo al método establecido para ser inyectadas en el sistema cromatográfico.

De cada curva de calibración se obtuvo el área y se consideró que el método cumplía con la linealidad si al realizar el ajuste log-log lineal por mínimos cuadrados de la respuesta contra la concentración se obtenía un coeficiente de correlación (r) mayor o igual a 0.99. También se obtuvieron y se evaluaron los valores de la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) para cada curva.

3.2.1.2. Precisión

Para evaluar la precisión del método se consideraron los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad.

Se procesaron y cuantificaron muestras plasmáticas de 1, 4 y 10 $\mu\text{g/mL}$, (control bajo, medio y alto) las cuales no pertenecen a la curva pero se encuentran dentro del intervalo de concentraciones establecido. En el caso de la repetibilidad, los tres puntos fueron preparados por quintuplicado en un mismo día de trabajo a partir de 5 soluciones patrón independientes, en tanto que para evaluar reproducibilidad se analizaron por duplicado los puntos control durante tres días de trabajo. Se realizó una curva de calibración para cada día de análisis.

El coeficiente de variación de las concentraciones recuperadas para cada nivel de concentración no debió ser mayor al 15%.

3.2.1.3.Exactitud

La exactitud se evaluó calculando la desviación absoluta (Desv.abs%) de los datos de repetibilidad y reproducibilidad por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Desv.abs.\%} = 100 \times \frac{\text{Cantidad adicionada} - \text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}}$$

El criterio de aceptación fué que el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad esten dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

3.2.1.4.Límite de cuantificación y Límite de detección

Para determinar estos parámetros se prepararon por quintuplicado y a partir de soluciones patrón independientes, muestras de concentraciones 0.2 y 0.4 $\mu\text{g/mL}$.

El límite de cuantificación (LC) fué definido como la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio se encontrara dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal (cantidad adicionada) con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

El límite de detección (LD) se determinó como la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica fué tres veces mayor que el nivel de ruido.

3.2.1.5. Selectividad

La selectividad del método se evaluó analizando muestras de fármacos de uso común (ácido acetilsalicílico y paracetamol) a las concentraciones plasmáticas reportadas y muestras de plasma conteniendo heparina, evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de Ampicilina.

3.2.1.6. Tolerancia

La tolerancia, definida como la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo, se evaluó preparando por duplicado y a partir de soluciones patrón independientes, muestras plasmáticas de concentraciones 1, 4 y 10 $\mu\text{g/mL}$, las cuales fueron inyectadas a las condiciones normales del método y posteriormente se inyectaron cambiando la proporción de fase móvil a solución amortiguadora de boratos 0.01M: ACN (86:14v/v). Un segundo cambio consistió en cambiar la velocidad de flujo a 1.5ml/min. Por último se cambió la longitud de onda a 206nm.

El método se consideró tolerante a éstos cambios si la concentración recuperada no presentó una desviación absoluta con respecto a los valores iniciales, mayor al 15%.

3.2.1.7. Recobro

Para evaluar el recobro se prepararon y procesaron tres series independientes de muestras control de calidad de Ampicilina en plasma (1, 4 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y tres series de muestras de fármaco en solución a las mismas concentraciones. La respuesta cromatográfica (área de pico) obtenida se comparó con la respuesta mostrada en muestras del fármaco en solución a las mismas concentraciones, pero que no fueron sometidas al procedimiento de extracción.

3.2.1.8. Estabilidad

En la prueba de estabilidad se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la respuesta (concentración) del compuesto por analizar en la matriz biológica.

En esta prueba se evaluaron por duplicado tres niveles de concentración en plasma (1, 4 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), bajo ciclos congelación-descongelación (-70°C), congelación (-70°C), refrigeración (5°C), temperatura ambiente y estabilidad de la muestra procesada. Se prepararon 20 mL de cada muestra y se dividieron en 4 alícuotas de 4 mL en tubos con tapón de rosca de 16×150 mm, se sometieron a las diferentes condiciones:

1) *Temperatura ambiente.*

Se realizó el monitoreo de la estabilidad de Ampicilina en plasma bajo condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente, para lo cual dos series de muestras de control de calidad se analizaron a los tiempos 0, 24 y 48 horas.

2) *Refrigeración.*

El monitoreo se realizó para los tres niveles de concentraciones control bajo condiciones de refrigeración (7°C). Las muestras se analizaron a los tiempos 0, 24 y 48 horas.

3) *Ciclos de congelación-descongelación.*

Las dos series independientes de controles se sometieron a dos ciclos congelación-descongelación a -70°C y se analizaron al tiempo 0, 24 y 48 horas.

4) *Congelación.*

Para determinar la estabilidad de Ampicilina bajo condiciones de congelación, las muestras control se almacenaron a -70°C y fueron analizadas a los 15, 30 y 101 días.

5) *Estabilidad de la muestra procesada.*

La estabilidad de la muestra procesada se determinó preparando por duplicado y con soluciones patrón independientes, muestras de Ampicilina en plasma a tres niveles de concentración (alto, medio y bajo), las cuales se sometieron al procedimiento de extracción, se reconstituyeron y se inyectaron al sistema cromatográfico bajo las condiciones establecidas. La muestra se quedaron almacenada en el automuestreador y se inyectaron nuevamente a las 24 y 48 horas después de procesadas.

El compuesto de interés (Ampicilina) se consideró estable bajo cada una de las condiciones si los resultados obtenidos se encontraban dentro del $\pm 15\%$ del valor de concentración obtenido para el tiempo cero.

3.3. ETAPA CLINICA

La etapa clínica del estudio se realizó en la Unidad de Farmacología Clínica del Hospital Español.

3.3.1. Diseño del estudio

Los voluntarios se distribuyeron al azar de acuerdo a un diseño cruzado 2 x 2 (Tabla 5) y se les administró según el caso, el fármaco A (Medicamento innovador) o bien, el fármaco B (Medicamento de prueba).

Tabla 5. Aleatorización de voluntarios para el estudio preliminar de bioequivalencia de Ampicilina.

SEXO	No. DE VOLUNTARIO	PERIODO I FORMULACIÓN	P E R I O D O D E L A V A D O	PERIODO II FORMULACIÓN
MASCULINO	1	A		B
	2	B		A
	3	A		B
	4	B		A
FEMENINO	5	B		A
	6	A		B
	7	B		A
	8	A	B	

3.3.2. Selección de Voluntarios

Acorde con los lineamientos propuestos en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, todos los sujetos participaron de manera voluntaria, y contaron con información referente al fármaco

PARTE EXPERIMENTAL

administrado, los fines del estudio, los efectos secundarios del fármaco y las indicaciones a seguir durante la realización del mismo. Los voluntarios firmaron una carta de consentimiento y aceptación.

Las muestras fueron obtenidas de sujetos clínicamente sanos, comprobado mediante los siguientes exámenes de laboratorio:

- Biometría hemática completa.
- Química sanguínea: urea, creatinina, TGO(AST) y TGP(ALT) y glucosa.
- Marcadores para hepatitis B y C.
- Detección de VIH.
- Examen general de orina.
- Prueba de detección de drogas de abuso (ABUSIGN) al ingreso del estudio.
- Prueba de embarazo.

Criterios de inclusión para los voluntarios

- Se incluyeron voluntarios clínicamente sanos del género masculino y femenino con edades entre 18-40 años.
- Los voluntarios no debían ingerir ningún medicamento, por lo menos dos semanas previas al estudio y hasta completarlo, ni consumir alcohol, tabaco, café o bebidas de cola por lo menos 48 horas antes del estudio o durante el mismo.

Criterios de exclusión para los voluntarios

- Individuos que manifestaron sensibilidad o alergia a Ampicilina.

- Sujetos que presentaron alguna alteración en sus signos vitales.
- Individuos que presentaron trastornos gastrointestinales, hipertensión arterial e insuficiencia renal o hepática.
- Sujetos que mostraron antecedentes de drogadicción o de abuso de fármacos.
- Sujetos que revelaron resultados positivos a la prueba de embarazo o al estudio cualitativo de fármacos de abuso en orina.
- Individuos con un padecimiento médico actual o pasado que pudiera afectar el comportamiento farmacodinámico o farmacocinético de Ampicilina.

3.3.3.Procedimiento

A cada voluntario se le administró según el caso, 2 cápsulas de 500mg del fármaco A (Medicamento innovador) que corresponde a AMPICILINA, cápsulas de 500 mg (Pentrexyl, Bristol-Myers Squibb), lote EH 114 o bien, 2 cápsulas de 500mg del fármaco B (Medicamento de prueba), lote 203065, en condiciones de ayuno junto con 250ml de agua.

Los tiempos de muestreo fueron: 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.50, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0 horas, recibándose 208 muestras de plasma, con un volumen que oscila entre 3 y 4 mililitros por muestra, proporcionadas por la Unidad de Farmacología Clínica del Hospital Español.

Las muestras plasmáticas se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

3.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS

Las muestras de plasma se analizaron, utilizando el método por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) previamente validado de acuerdo a los parámetros establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, en lo referente a la validación de métodos analíticos para realizar pruebas de biodisponibilidad y bioequivalencia.

3.4.1. Adecuabilidad del Sistema

Para evaluar la adecuabilidad del sistema cromatográfico y monitorear la columna cromatográfica, se preparó una solución de 20 $\mu\text{g/mL}$ de Ampicilina utilizando como disolvente solución amortiguadora de fosfatos 0.02M pH 10. Esta solución se dividió en alícuotas de 3 mL y se almacenó en congelación a -70°C . Al inicio de cada día de trabajo, se descongeló una de las alícuotas y se realizaron 6 inyecciones consecutivas de 10 μL .

El sistema se consideró adecuado si cumplía con los parámetros de la tabla 6:

Tabla 6. Parámetros de adecuabilidad del sistema.

Parámetro	Criterio
Repetibilidad (área de pico)	≤ 2.0 para $N \geq 5$
Repetibilidad (tiempo de retención)	≤ 2.0 para $N \geq 5$
Factor de capacidad (k')	> 2.0
Simetría de pico (USP)	≤ 2.0
Platos teóricos (Tangente USP)	> 2000

En cada día de trabajo se monitoreo el área de pico promedio de Ampicilina y se verificó que este no disminuyera mas del 20% con respecto al valor promedio obtenido en la primera evaluación de adecuabilidad del sistema.

3.4.2. Curva de calibración

Las curvas de calibración se prepararon antes del estudio y se almacenaron a -70°C para ser descongeladas y agitadas antes del análisis.

Una vez evaluada la adecuabilidad del sistema se proceso una curva de calibración constituida al menos de 6 concentraciones diferentes en el intervalo de 0.4 a 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dicha curva fue considerada aceptable si al menos el 80% de los valores de las concentraciones estándar utilizados, se encontraban dentro del límite del $\pm 15\%$ con respecto a su valor nominal a excepción del límite de cuantificación (20%) y el valor del coeficiente de correlación "r" fuera ≥ 0.99 .

Cada día de análisis se procesaron las muestras plasmáticas provenientes de tres voluntarios.

3.4.3. Puntos control de calidad

Las muestras de control de calidad se prepararon antes del estudio y se almacenaron a -70°C para ser descongeladas y procesadas junto con las muestras de voluntarios. Cada día de trabajo se procesaron una serie de muestras control de calidad por duplicado a tres niveles (bajo, medio y alto). Las concentraciones evaluadas fueron las mismas que se utilizaron durante la validación del método analítico.

Una corrida analítica se aceptó si no mas de 2 concentraciones de 6 muestras de control de calidad se encontraban dentro del límite del $\pm 20\%$ de los valores esperados y al menos una muestra de control de calidad de cada nivel de concentración se encontró dentro del criterio del $\pm 20\%$.

3.4.4. Cuantificación de las muestras plasmáticas

Las áreas de Ampicilina fueron determinadas utilizando el integrador computacional Millennium 32 de Waters S.A.

Para cuantificar las muestras del estudio, el área de Ampicilina fue convertida a concentración interpolando en la curva correspondiente al día de análisis, en la cual el área de Ampicilina (y) y la concentración de los estándares (x) fue ajustada por medio de un análisis de regresión log-log lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $\log y = b + m \log x$, donde b es la ordenada al origen (intercepto-y) y m es la pendiente de la curva de calibración.

Las concentraciones de las muestras por debajo del límite de cuantificación, no fueron incluidas en los cálculos.

3.4.5. Repeticiones

En el caso de repeticiones por cromatografía pobre, pérdida de muestra o valores extraños, los criterios para saber que concentración utilizar en los cálculos finales, en orden de aplicación, fueron los siguientes:

1. Si el valor de la repetición se encuentra dentro del $\pm 15\%$ del valor original, el valor original es utilizado en los cálculos finales. La fórmula utilizada para calcular esto es:

$$\text{Diferencia\%} = \frac{| \text{Original} - \text{Repetición} |}{\text{Promedio}(\text{Original} + \text{Repetición})} \times 100$$

2. Si el valor de la repetición es mayor que $\pm 15\%$ del valor original, el análisis de la muestra es repetido otra vez.

3. Si los valores de las segundas repeticiones están dentro del $\pm 15\%$ del valor original, el valor original será usado para los cálculos finales.

$$Diferencia\% = \frac{|Original - Re\ petición\ 2|}{Promedio(Original + Re\ petición\ 2)} \times 100$$

4. Si los valores de las primeras y segundas repeticiones son mayores que $\pm 15\%$ del valor original, pero la diferencia % (ver formula abajo) entre las dos repeticiones no es mayor que $\pm 15\%$, entonces se utiliza el valor promedio de las repeticiones para los cálculos finales.

$$Diferencia\% = \frac{|Re\ petición\ 1 - Re\ petición\ 2|}{Promedio(Re\ petición\ 1 + Re\ petición\ 2)} \times 100$$

5. Si la diferencia % de las repeticiones señaladas en el punto anterior es mayor que $\pm 15\%$, entonces el promedio del valor original, el valor de la repetición 1 y el valor de la repetición 2, son usados para los cálculos finales.
6. El valor original es usado si no existe plasma suficiente para efectuar el re-análisis.

3.4.6. Análisis farmacocinético

Se graficaron los perfiles de concentración vs. tiempo de muestreo para cada voluntario y se obtuvieron los siguientes parámetros farmacocinéticos, los cuales fueron calculados utilizando el paquete computacional Biopak® 2.0:

- 1.- El área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración hasta el último tiempo "t" ($ABC_{0 \rightarrow t}$), fue determinada con el método trapezoidal.
- 2.- El área bajo la curva de concentración plasmática extrapolada desde el tiempo "t" a infinito ($ABC_{t \rightarrow inf}$), fue determinada dividiendo la última concentración plasmática entre la pendiente terminal (BETA)
- 3.- El área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración (tiempo cero) a infinito ($ABC_{0 \rightarrow inf}$) fue calculada sumando el $ABC_{0 \rightarrow t}$ y el $ABC_{t \rightarrow inf}$.
- 4.- La concentración plasmática máxima (C_{max}) fue determinada directamente de la curva de concentración plasmática-tiempo.
- 5.- El tiempo al cual se alcanza la concentración plasmática máxima (T_{max}) fue determinada directamente de la curva de concentración plasmática-tiempo.
- 6.- La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) fue obtenida del ajuste log-lineal por mínimos cuadrados de la porción terminal de las curvas de concentración plasmáticas contra tiempo.

3.4.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa computacional Biopak® 2.0. Para evaluar la bioequivalencia de ambos productos se estimaron los intervalos de confianza clásicos, intervalos de Westlake, prueba de Shüirmann y el valor de probabilidad de Anderson-Hauk.

3.5. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA

En un estudio de bioequivalencia es muy importante conocer el número de sujetos requeridos (tamaño muestral), de tal manera que se utilicen solo los sujetos necesarios que permitan obtener resultados confiables en un menor tiempo y con una notable disminución en el costo que estos implican.

Por lo anterior se determinó el tamaño de muestra para conocer el número de sujetos requerido para un estudio en el que se evalúe la bioequivalencia de ampicilina cápsulas.

El calculo del tamaño de muestra por hipótesis puntual en un estudio cruzado 2x2 considera la regla 80/20, con una probabilidad del 80%.

El tamaño de la muestra se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$n_c = [t(\alpha / 2, 2n - 2) + t(\beta, 2n - 2)]^2 [CV/20]^2 \dots\dots\dots 1$$

en donde

α es el símbolo convencional de la probabilidad de un error Tipo-I, convencionalmente 0.05.

PARTE EXPERIMENTAL

β es el símbolo de la probabilidad de un error Tipo-II, convencionalmente tiene el valor de 0.2

$(2n - 2)$ son los grados de libertad

CV es el coeficiente de variación que se calcula con la siguiente ecuación:

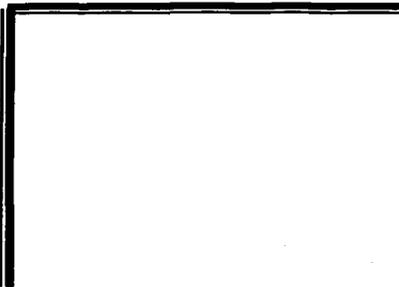
$$CV = 100 \times \frac{\sqrt{CME}}{\mu_R} \dots\dots\dots 2$$

en donde

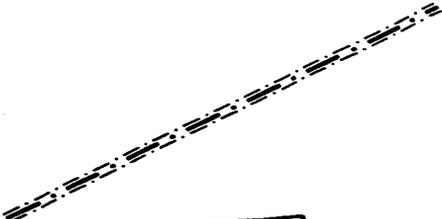
CME es el cuadrado medio del error

μ_R es el promedio de la formulación de referencia (A)

El total de sujetos requerido para un diseño cruzado 2x2 es $N=2n_c$ 3



**RESULTADOS
Y
ANÁLISIS DE RESULTADOS**



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

4.1.DESARROLLO DEL MÉTODO POR CLAR PARA CUANTIFICAR AMPICILINA EN PLASMA

λ_{max} absorción de Ampicilina en el ultravioleta:

La ampicilina disuelta en una solución amortiguadora de fosfatos 0.02M pH 10.0 presenta su máximo de absorción a 196nm en la región del ultravioleta (Figura 2).

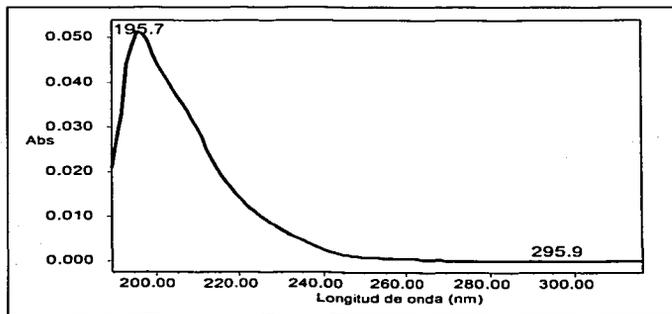


Figura 2. Espectro de absorción de Ampicilina en UV.

Por lo anterior el análisis de Ampicilina se realizó a una longitud de onda de 196 nm.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se seleccionó una columna cromatográfica X Terra RP18 $5\ \mu\text{m}$ $4.6 \times 250\text{mm}$ ya que permitió obtener parámetros de factor de capacidad > 2.0 y simetría de pico ≤ 2.0 .

La temperatura de la columna con la que se obtuvo resolución y precisión en los tiempos de retención fué de 25°C .

Se eligió como fase móvil una mezcla manual de solución amortiguadora de borato de sodio 0.01M $\text{pH } 10.0$:Acetonitrilo $87.5:12.5$ (v/v), ya que fue la que permitió obtener los parámetros cromatográficos óptimos de simetría, k' y resolución entre picos. El resto de las fases móviles probadas fueron descartadas debido a que se obtenían picos asimétricos y sin una resolución adecuada.

El método de extracción sólido-líquido permitió obtener muestras mas limpias en comparación con el método de precipitación, además con este método se obtuvo un recobro mayor debido a que cuando se activa el cartucho con solución amortiguadora de fosfatos 0.02M $\text{pH } 12.0$ se retiene más el fármaco pues el pH es mayor al pKa de Ampicilina y se encuentra menos ionizada; el lavado con solución amortiguadora de fosfatos 0.02M $\text{pH } 7.0$ permite que la Ampicilina permanezca unida al cartucho y cuando se hace el lavado con ácido acético al 2% en Metanol la Ampicilina pasa a su forma mas ionizada desprendiéndose del cartucho.

La temperatura para evaporar a sequedad fue de 25°C pues a temperaturas mayores la respuesta de Ampicilina disminuye debido a que se degrada.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para reconstituir se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 0.02M pH 10 ya que la respuesta de Ampicilina permaneció constante por lo menos 24 horas.

Los cartuchos Oasis y Bond-Elut permitieron obtener mayor recobro del fármaco sin embargo con los cartuchos Oasis es posible realizar un número mayor de extracciones.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

El método de extracción sólido-líquido desarrollado se muestra en la figura

3:

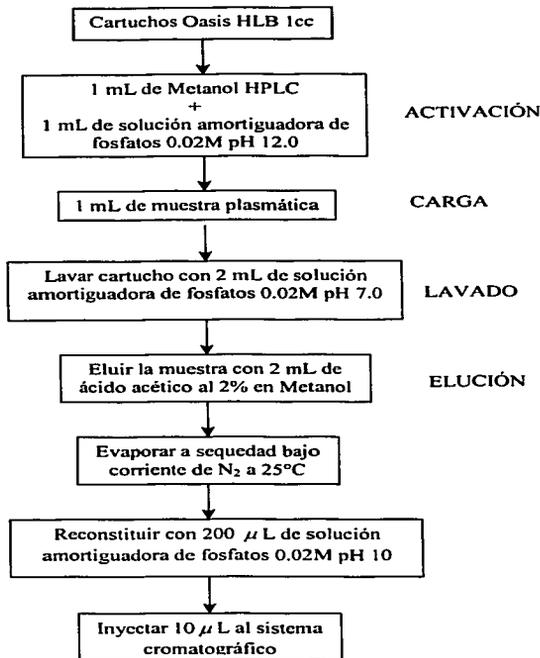


Figura 3. Método de extracción para cuantificar Ampicilina en plasma.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las condiciones cromatográficas establecidas para el análisis de las muestras plasmáticas se muestran en la tabla 7:

Tabla 7. Condiciones cromatográficas.

Bomba	Dos bombas isocráticas Waters 510 con controlador de gradiente
Integrador	Paquete computacional Millennium 32, Waters.
Automuestreador	inyector automático, modelo 717 plus de Waters.
Detector	Detector de arreglo de diodos 996 Waters
Longitud de onda	196nm
Columna	X Terra RP18 5 μ m 4.6 x 250 mm
Fase Móvil	Solución Amortiguadora de borato de sodio 10-hidrato 0.01M pH 10.0 / Acetonitrilo (87.5:12.5 v/v)
Velocidad de Flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	10 μ L
Temperatura de la columna	25°C
Tiempo de corrida	9 minutos

Los parámetros cromatográficos obtenidos con las condiciones establecidas fueron los siguientes (tabla 8):

Tabla 8. Parámetros cromatográficos evaluados.

Parámetro	Ampicilina
Tiempo de retención (minutos)	7.2
k'	4.4
Simetría	1.1

4.2.VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR AMPICILINA EN PLASMA

Se realizó la validación del método analítico con las condiciones de análisis establecidas. Los resultados obtenidos se presentan a continuación:

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.2.1. Linealidad del método

La tabla 9, muestran los resultados de la linealidad del método para la cuantificación de Ampicilina en plasma. Se presentan los valores de pendiente (m), intercepto (b) y coeficiente de correlación (r) obtenidos del ajuste de regresión log-log lineal por mínimos cuadrados realizado, mientras que la figura 3 ilustra la curva patrón promedio correspondiente.

Tabla 9. Linealidad del método.

Concentración nominal (µg/mL)	Curva 1 Concentración (µg/mL)	Curva 2 Concentración (µg/mL)	Curva 3 Concentración (µg/mL)	Promedio Concentración recuperada (µg/mL)	D.E.	C.V.%
0.4	0.35	0.43	0.41	0.40	0.042	10.50
0.6	0.69	0.6	0.6	0.63	0.052	8.25
1.5	1.54	1.46	1.39	1.46	0.075	5.13
2	2	1.84	2.05	1.96	0.110	5.59
6	5.91	5.93	6.08	5.97	0.093	1.56
8	8.17	8.06	7.85	8.03	0.163	2.03
12	11.6	12.69	12.29	12.19	0.551	4.52
m	1.0516	1.1134	1.0646			
b	4.9912	4.8899	4.9401			
r	0.9962	0.9985	0.9996			

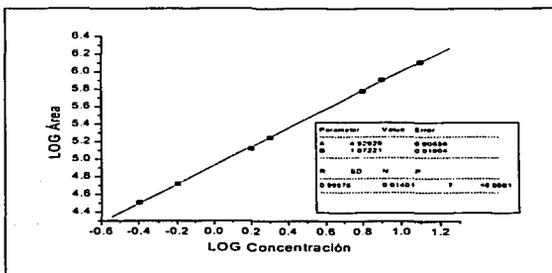


Figura 4. Linealidad del método para cuantificar Ampicilina en plasma.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

El método para cuantificar Ampicilina en plasma fué lineal en el rango de concentraciones de 0.4 a 12 $\mu\text{g/mL}$; pues todos los valores de "r" obtenidos fueron de 0.9962 o mayores. El valor promedio para la pendiente (m) fue de 1.0765 y para la ordenada al origen (b) fue de 4.9404.

4.2.2. Precisión y exactitud del método

4.2.2.1. Repetibilidad

En la tabla 10 podemos observar los resultados correspondientes a la repetibilidad y exactitud del método.

Tabla 10. Repetibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar Ampicilina en plasma.

Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)			
Muestra	Control bajo (1 $\mu\text{g/mL}$)	Control medio (4 $\mu\text{g/mL}$)	Control alto (10 $\mu\text{g/mL}$)
1	1.09	4.55	10.22
2	1.07	4.21	9.62
3	1.11	4.16	10.29
4	1.09	3.98	9.39
5	1.09	4.04	9.88
Promedio	1.09	4.19	9.88
D.E.	0.01	0.22	0.38
C.V. %	1.30	5.31	3.89
Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	1	4	10
Desv.abs %	9.00	4.75	1.20

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

La precisión fue determinada con el coeficiente de variación de las concentraciones recuperadas y exactitud fué definida como la desviación absoluta (Desv. abs.%) del valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración (tanto para los datos de repetibilidad como de reproducibilidad) con respecto al valor nominal (cantidad adicionada).

En los resultados correspondientes a la repetibilidad, se observa que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor que el 15% y la desviación absoluta (Desv.abs%) fue menor que 9.00%.

4.2.2.2.Reproducibilidad

En la tabla 11 se muestran los resultados de reproducibilidad del método.

Tabla 11. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar Ampicilina en plasma.

Día	Réplica número	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		
		Control bajo ($1\ \mu\text{g/mL}$)	Control medio ($4\ \mu\text{g/mL}$)	Control alto ($10\ \mu\text{g/mL}$)
1	1	1.09	4.55	10.22
	2	1.07	4.21	9.62
2	1	1.03	3.94	9.61
	2	1.24	4.12	9.7
3	1	0.96	4.33	9.71
	2	1.18	4.07	10.38
Promedio		1.1	4.2	9.87
D.E.		0.1	0.21	0.34
C.V.%		9.25	5.11	3.41
Cantidad adicionada ($\mu\text{g/mL}$)		1	4	10
Desv.abs %		9.5	5.08	1.27

En lo referente a la reproducibilidad se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo fue de 3.41 a 9.25%, lo cual cumple con el criterio de ser menor al 15%, mientras que la desviación absoluta % fue menor a 15 %, en los tres niveles de concentración evaluados.

De acuerdo a los resultados anteriores el método para cuantificar Ampicilina en plasma se consideró preciso y exacto ya que cumplió con el criterio especificado del $\pm 15\%$.

4.2.3.Limite de cuantificación

Para Ampicilina el limite de cuantificación fue de $0.4 \mu\text{g/mL}$. En este nivel, la precisión fue de 8.11% y la exactitud (desviación absoluta %) fue de 2.5%. Dichos valores se encuentran dentro del intervalo de $\pm 20\%$ del valor nominal. Concentraciones menores a $0.4 \mu\text{g/mL}$ presentaron mayor variación.

4.2.4.Limite de detección

El límite de detección para Ampicilina fue de $0.2 \mu\text{g/mL}$ ya que en esta concentración la señal de Ampicilina en la matriz biológica es tres veces mayor que el nivel de ruido, además en este punto la precisión y la exactitud son mayores al 20%.

4.2.5. Selectividad

La evaluación de la selectividad se presenta en la figura 5.

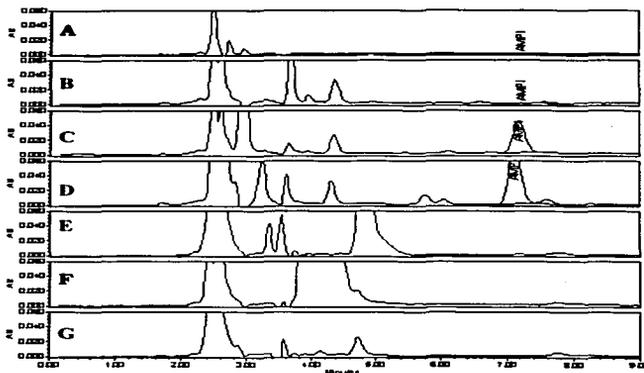


Figura 5. Selectividad del método.

(A) blanco de reactivos; (B) blanco de plasma; (C) estándar en plasma con $6 \mu\text{g/mL}$ de Ampicilina; (D) plasma de un voluntario sano 3 horas después de una administración oral de Ampicilina; (E) plasma añadido con ácido acetil salicílico; (F) plasma añadido con paracetamol; (G) plasma añadido con heparina.

Como puede observarse el ácido acetilsalicílico, paracetamol, la heparina, la matriz biológica y los reactivos no interfieren en los tiempos de retención del fármaco de interés, por lo que el método para cuantificar Ampicilina en plasma es selectivo.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.2.6. Tolerancia

Los resultados obtenidos a las condiciones originales del método se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Condiciones originales del método.

Condiciones iniciales: Solución amortiguadora de boratos 0.01M: ACN (87.5:12.5 v/v), flujo: 1 mL/min, longitud de onda: 196 nm			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	1.01	4.38	10.20
	0.96	3.97	9.76
Promedio	0.99	4.18	9.98

Los resultados obtenidos después de realizar el cambio en la proporción de fase móvil de Solución amortiguadora de boratos 0.01M : ACN (87.5:12.5 v/v) a (86:14 v/v) se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Tolerancia del método al cambiar la proporción de fase móvil.

Cambio de proporción de fase móvil de Solución amortiguadora de boratos 0.01M: ACN (87.5:12.5 v/v) a (86:14 v/v)			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	1.11	4.82	10.80
	1.02	4.11	10.36
Promedio	1.07	4.47	10.58
Desv.abs%	8.12	6.95	6.01

En la tabla 14 se observan los resultados obtenidos al cambiar el flujo, el cual se cambió de 1 mL/min a 1.5 mL/min.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 14. Tolerancia del método al cambiar la velocidad de flujo.

Cambio de flujo de 1 mL/min a 1.5 mL/min			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	0.91	4.57	10.58
	0.97	3.87	10.06
Promedio	0.94	4.22	10.32
Desv.abs%	4.57	1.08	3.41

Un tercer cambio se consideró al evaluar los resultados obtenidos a dos longitudes de onda diferentes: 196nm y 206 nm. Dichos resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Tolerancia del método al cambiar la longitud de onda.

Cambio de longitud de onda de 196 nm a 206 nm			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	1.07	4.64	10.57
	0.97	4.01	10.16
Promedio	1.02	4.33	10.37
Desv.abs%	3.55	3.59	3.86

Con base en los resultados anteriores, el método analítico fue tolerante al cambio de proporción de fase móvil, cambio de flujo y cambio de longitud de onda pues presentan una desviación absoluta con respecto a los valores iniciales menor al 15%. Lo anterior nos permitiría en determinado momento utilizar alguno de estos cambios.

4.2.7. Recobro

Los porcentajes de recobro de Ampicilina se presentan en la tabla 16.

Tabla 16. Recobro de Ampicilina de plasma humano.

Estándar	Estándar en plasma (extraído) Área de Ampicilina	Estándar en solución amortiguadora de fosfatos 0.02M pH 10.0 (no extraído) Área de Ampicilina	Recobro %
Alto 10 μ g/mL	1151434.5	1245573.0	91.74
	1099671.0	1244863.5	
	1176926.0	1246282.0	
	Promedio	1142677.2	
Medio 4 μ g/mL	477426.5	507691.0	89.29
	430644.0	506083.0	
	430489.0	485319.0	
	Promedio	446186.5	
Bajo 1 μ g/mL	102894.0	116004.5	94.40
	98091.0	112340.5	
	104201.0	94951.5	
	Promedio	101728.7	

El recobro promedio obtenido fue del 91.81% por lo que la técnica de extracción empleada para muestras plasmáticas de Ampicilina, permite obtener una buena recuperación.

4.2.8. Estabilidad

En la tabla 17 se muestran los resultados correspondientes al análisis de muestras de plasma almacenadas a temperatura ambiente.

Tabla 17. Estabilidad de Ampicilina a temperatura ambiente.

Tiempo 0			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	0.99	3.95	8.82
	1.01	3.81	9.50
Promedio	1.00	3.88	9.16
Tiempo 24 horas			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	0.85	3.65	9.34
	0.92	3.81	9.56
Promedio	0.89	3.73	9.45
Desv.abs%	11.50	3.87	3.17
Tiempo 48 horas			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	0.41	2.11	7.00
	0.52	3.54	7.08
Promedio	0.47	2.83	7.04
Desv.abs%	53.50	27.19	23.14

Como puede observarse en los resultados de la tabla 17 la desviación absoluta es menor al 15% con respecto al valor original hasta las primeras 24 horas, por lo que se considera que Ampicilina es estable bajo estas condiciones.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la tabla 18 se muestran los resultados de las muestras almacenadas bajo condiciones de refrigeración (7°C).

Tabla 18. Estabilidad de Ampicilina en refrigeración.

Tiempo 0			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	0.99	3.95	8.82
	1.01	3.81	9.50
Promedio	1.00	3.88	9.16
Tiempo 24 horas			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	1.11	4.36	10.08
	1.15	4.05	9.58
Promedio	1.13	4.21	9.83
Desv.abs%	13.00	8.38	7.31
Tiempo 48 horas			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	1.25	4.13	8.89
	1.24	4.43	8.54
Promedio	1.25	4.28	8.72
Desv.abs%	24.50	10.31	4.86

Las muestras plasmáticas con Ampicilina son estables durante las primeras 24 horas a 7°C pues como puede observarse los valores obtenidos cumplen con el límite del $\pm 15\%$.

En la tabla 19 se muestran los resultados del análisis de las muestras sometidas a 2 ciclos de congelación-descongelación. Se puede observar que los valores obtenidos, cumplen con el límite de $\pm 15\%$ del valor original, por lo que Ampicilina es estable a -70°C bajo dos ciclos de congelación-descongelación.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 19. Estabilidad de Ampicilina en ciclos de congelación-descongelación.

Día 0			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	0.99	3.95	8.82
	1.01	3.81	9.50
Promedio	1.00	3.88	9.16
1er. ciclo			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	1.15	4.14	8.40
	1.10	3.57	10.43
Promedio	1.13	3.86	9.42
Desv.abs%	12.50	0.64	2.78
2° ciclo			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	1.11	4.62	10.85
	1.18	4.52	7.73
Promedio	1.15	4.57	9.29
Desv.abs%	14.50	14.99	1.42

La tabla 20 muestra los resultados del análisis de muestras almacenadas bajo condiciones de congelación a los 15, 30 y 101 días, los cuales presentaron una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor original, por lo que las muestras conteniendo Ampicilina son estables hasta los 101 días a -70°C .

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 20. Estabilidad de la muestra de Ampicilina en congelación.

Tiempo 0			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	0.99	3.95	8.82
	1.01	3.81	9.50
Promedio	1.00	3.88	9.16
Tiempo 15 días			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	1.08	4.15	9.05
	1.06	3.61	10.05
Promedio	1.07	3.88	9.55
Desv.abs%	7.00	0.00	4.26
Tiempo 30 días			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	1.14	3.55	8.51
	0.83	4.28	9.42
Promedio	0.99	3.92	8.97
Desv.abs%	1.00	1.03	2.07
Tiempo 101 días			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	0.95	3.40	10.34
	0.84	3.89	9.99
Promedio	0.89	3.64	10.16
Desv.abs%	11.00	6.18	10.91

Los resultados de estabilidad de la muestra procesada se presentan en la tabla 21, en la cual se puede observar que Ampicilina fue estable en la solución de

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

inyección durante 48 h después de su preparación ya que su desviación absoluta no fue mayor del 15% con respecto al valor original.

Tabla 21. Estabilidad de la muestra procesada de Ampicilina.

Tiempo 0			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	0.99	3.95	8.82
	1.01	3.81	9.50
Promedio	1.00	3.88	9.16
Tiempo 24 horas			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	1.14	4.16	9.57
	1.15	4.13	10.36
Promedio	1.15	4.15	9.97
Desv.abs%	14.50	6.83	8.79
Tiempo 48 horas			
	Bajo 1 μ g/mL	Medio 4 μ g/mL	Alto 10 μ g/mL
	1.25	3.47	5.24
	1.36	4.99	11.93
Promedio	1.31	4.23	8.59
Desv.abs%	14.47	2.05	13.85

4.3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS DE VOLUNTARIOS

El análisis de las muestras de los 8 voluntarios se realizó una vez concluida la validación del método analítico.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En una corrida se analizaron todas las muestras de tres voluntarios las cuales incluyen las muestras de los dos periodos para cada voluntario. Las muestras de control de calidad se analizaron en réplicas, colocando en el carrusel una muestra control cada 14 muestras de voluntario. Se analizó una curva de calibración en cada corrida y se realizó un análisis de regresión log-log lineal por mínimos cuadrados para interpolar el área de ampicilina de las muestras de los voluntarios y de este modo obtener la concentración de ampicilina a cada tiempo de muestreo.

Las muestras del estudio fueron analizadas en tres corridas. Los resultados de las muestras de control de calidad de cada corrida están resumidos en la tabla 22.

Tabla 22. Seguimiento de las muestras de control de calidad para Ampicilina.

Corrida	Voluntarios	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
		1 μ g/mL	4 μ g/mL	10 μ g/mL
1	1, 2, 3	0.88	4.28	8.96
		1.06	3.62	8.61
		1.14	4.11	10.68
2	4, 5, 6	1.07	4.32	10.18
		0.89	4.61	8.60
		1.05	*	8.00
Promedio		1.02	4.19	9.17
D.E.(n-1)		0.11	0.36	1.03
C.V.%		10.40	8.71	11.28
Conc.nominal		1	4	10
Desv.abs(%)		1.50	4.70	8.28

Nota: (*)valores que excedieron el límite de $\pm 20\%$ del valor nominal

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

No se rechazó ninguna corrida pues como se observa cumplió con el criterio de que no más de 2 concentraciones de 6 muestras control de calidad debían encontrarse dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal.

En la tabla 23 se presenta el seguimiento de las curvas de calibración para cuantificar ampicilina en plasma.

Tabla 23. Seguimiento de curvas de calibración para Ampicilina.

Corrida	Voluntarios	Ampicilina en Plasma ($\mu\text{g/mL}$)							Intercepto (b)	Pendiente (m)	Coefficiente de correlación (r)
1	1, 2, 3	0.39	0.59	1.53	2.12	5.77	7.63	12.47	5.0185	0.9385	0.9995
2	4, 5, 6	0.40	0.68	1.38	1.75	6.21	8.14	12.44	4.9948	1.005	0.9979
3	7, 8	0.39	0.68	1.33	1.93	6.28	7.97	12.14	4.9937	1.0013	0.9983
Promedio		0.39	0.65	1.41	1.93	6.09	7.91	12.35	5.0023	0.9816	0.9986
D.E.(n-1)		0.01	0.05	0.10	0.19	0.28	0.26	0.18	0.0140	0.0374	0.0008
C.V. %		1.47	7.99	7.36	9.57	4.54	3.28	1.48	0.28	3.81	0.08
Conc. nominal		0.4	0.6	1.5	2	6	8	12			
Desv. abs. %		1.67	8.33	5.78	3.33	1.44	1.08	2.92			

Como se puede observarse las concentraciones estándar utilizadas, se encontraron dentro del límite del $\pm 15\%$ con respecto a su valor nominal y el valor del coeficiente de correlación "r" fue ≥ 0.99 por lo tanto dichas curvas se aceptaron.

4.4. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

En la tabla 24, se presentan los valores promedio de las concentraciones plasmáticas de ampicilina a cada tiempo de muestreo, después de la administración de ambas formulaciones (ver figura 6).

Tabla 24. Concentración plasmática promedio de Ampicilina ($\mu\text{g/mL}$) \pm D.E., después de la administración de ambos productos.

Tiempo (h)	Fórmula de referencia (A)	Fórmula de prueba (B)
0	0 \pm 0	0 \pm 0
0.25	ND	1.35*
0.5	1.35 \pm 0.50	1.49 \pm 1.06
0.75	2.31 \pm 1.69	3.01 \pm 1.34
1.0	2.45 \pm 2.32	3.80 \pm 1.64
1.5	4.52 \pm 2.32	5.91 \pm 1.29
2.0	6.29 \pm 3.57	6.85 \pm 2.59
2.5	7.22 \pm 4.77	7.59 \pm 5.12
3.0	5.63 \pm 2.53	5.74 \pm 3.18
4.0	4.17 \pm 1.17	3.87 \pm 2.57
5.0	2.19 \pm 1.10	2.10 \pm 1.33
6.0	1.13 \pm 0.75	1.24 \pm 0.80
7.0	0.66 \pm 0.29	0.91 \pm 0.49
8.0	0.66 \pm 0.06	0.57 \pm 0.24

*n=1

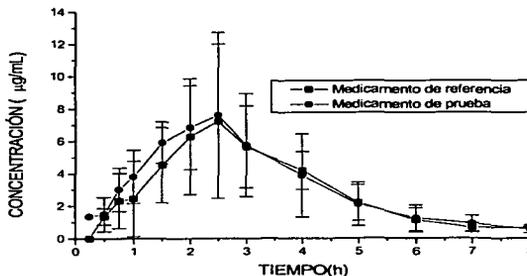


Figura 6. Gráfica de la concentración plasmática promedio de Ampicilina (\pm D.E) versus tiempo, después de la administración de las dos formulaciones de Ampicilina.

En el Apéndice I se presentan los datos de concentración plasmática para cada voluntario, así como las gráficas de concentración plasmática vs tiempo.

Los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos de 8 voluntarios para el medicamento de referencia y el medicamento de prueba, se presentan en la tabla 25; dichos parámetros son: Área bajo la curva ($ABC_{0 \rightarrow t}$, $ABC_{t \rightarrow \infty}$), Concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo al cual se alcanza la concentración plasmática máxima (T_{max}) y el tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$). En el apéndice II se muestran los parámetros farmacocinéticos correspondientes para cada voluntario.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 25. Parámetros farmacocinéticos promedio correspondientes a Ampicilina para ambas formulaciones.

Parámetro farmacocinético (promedio ± D.E.)	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	21.61 ± 8.85	23.52 ± 11.49
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	24.67 ± 7.57	25.36 ± 11.25
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	8.03 ± 4.28	8.26 ± 4.73
Tmax (h)	2.69 ± 0.88	2.13 ± 0.44
$t_{1/2}$ (h)	1.26 ± 0.51	1.21 ± 0.34

Los parámetros farmacocinéticos observados en la formulación de prueba y en la formulación de referencia presentan valores equivalentes.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En la tabla 26 y 27 se muestran los resultados del análisis estadístico obtenidos con el programa computacional Biopak®: los intervalos de confianza clásicos, intervalos de Westlake, prueba de Shüirmann y el valor de probabilidad de Anderson-Hauck.

En el apéndice III se presentan los resultados del análisis estadístico obtenidos en el programa Biopak® para los parámetros farmacocinéticos de ABC $0 \rightarrow t$, ABC $0 \rightarrow \text{inf}$, Cmax y Tmax para cada uno de los fármacos.

Tabla 26. Resultados del análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos de Ampicilina (datos sin transformar).

Parámetro farmacocinético	Intervalo clásico	Intervalo de Westlake	Prueba de Shuirmann	Prueba de Anderson-Hauck	Poder
ABC $0 \rightarrow t$	86.47-131.16	73.68-120.32	0.2072	0.1611	0.2557
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$	81.53-124.08	78.24-121.76	0.1248	0.0424	0.2816
Cmax	81.19-124.48	77.87-122.13	0.1301	0.0440	0.2722
Tmax	59.72-98.42	64.68-135.32	0.5388	0.5326	0.3402
$t_{1/2}$	63.22-128.93	66.53-133.47	0.2926	0.0858	0.1320

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 27. Resultados del análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos de Ampicilina (transformación logarítmica).

Parámetro farmacocinético	Intervalo clásico	Intervalo de Westlake	Prueba de Shuirmann	Prueba de Anderson-Hauk	Poder
log ABC _{0-∞}	84.67-113.32	73.22-126.78	0.1943	0.1431	0.3078
log ABC _{0-∞-inf}	79.53-122.78	78.55-121.45	0.1201	0.0126	0.3364
log C _{max}	79.74-128.16	75.84-124.16	0.1567	0.0531	0.2818
log T _{max}	67.42-97.60	70.67-129.33	0.4475	0.4412	0.4625
log t _{1/2}	75.31-129.59	73.23-126.77	0.1973	0.0157	0.2175

En las tablas 26 y 27 se observa que los intervalos obtenidos para los parámetros ABC_{0-t}, ABC_{0-inf} y C_{max} no se encuentran dentro de los límites de confianza establecidos (80-120 con datos crudos y de 80-125 con datos transformados). El T_{max} se encuentra fuera de los límites establecidos sin embargo por su variabilidad no se considera un parámetro determinante de la bioequivalencia. Como se puede observar los productos evaluados conteniendo Ampicilina como principio activo no cumplen con los criterios establecidos.

4.6.DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA

Para obtener el número de sujetos requerido en un estudio de cruzado 2x2 se consideraron los resultados de análisis de varianza obtenidos con el programa de computo BIOPAK[®] para 8 voluntarios (ver apéndice III), se obtuvo el cuadrado medio del error (CME) y (μ_r) promedio de la formulación de referencia (A) para cada parámetro farmacocinético.

A continuación se muestran los cálculos para el parámetro farmacocinético ABC_{0-∞}.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

El CME ABC $0 \rightarrow 1$ = 24.6957 ;

el μ_r = 21.6133

Aplicando la ecuación 2 descrita en la parte experimental se obtiene el coeficiente de variación:

$$CV = 100 \times \frac{\sqrt{24.6957}}{21.6133} = 22.9927$$

Se supone un $n_c = 9$, esto da como grados de libertad:

$$2n - 2 = 2(9) - 2 = 18 - 2 = 16$$

Siendo 16 los grados de libertad $\alpha = 0.05$ y $\beta = 0.2$ se busca en la tabla de la distribución t (ver apéndice IV) $t(\alpha/2, 2n - 2)$ y $t(\beta, 2n - 2)$.

$$t(0.025, 16) = 2.120$$

$$t(0.2, 16) = 0.865$$

Sustituyendo los resultados anteriores en la ecuación 1 se obtiene un n_c preliminar.

$$n_c = [t(2.120) + t(0.865)]^2 [22.9927 / 20]^2$$

$$n_c = 11.77 \cong 12$$

Se empieza con $n_c = 12$ y se repiten los mismos cálculos lo cual da como grados de libertad $24 - 2 = 22$

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

$$t(0.025, 22) = 2.074$$

$$t(0.2, 22) = 0.858$$

aplicando la ecuación 1

$$n_c = [t(2.074) + t(0.858)]^2 [22.9927 / 20]^2$$

$n_c = 11.36 \cong 11$; resultado que es muy cercano a lo obtenido previamente.

Por lo tanto aplicando la ecuación 3 se requiere un total de $N=2(12)=22$ sujetos.

Se realizaron los mismos cálculos para los parámetros $ABC_{0 \rightarrow \text{inf}}$, C_{max} , T_{max} y $t_{1/2}$

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 28.

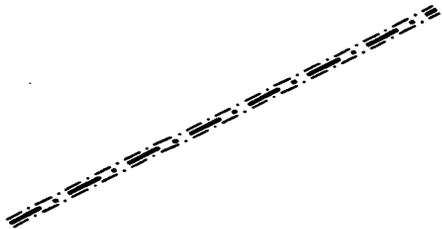
Tabla 28. Tamaño de muestra a partir de los resultados de análisis de varianza de 8 voluntarios.

Parámetro	CME	μ_R	CV	n_c preliminar	2n-2	t(0.025,2n-2)	t(0.2,2n-2)	n_c	N
ABC _{0-t}	24.6957	21.6133	22.993	12	22	2.074	0.858	11	22
ABC _{0-inf}	29.1644	24.6706	21.890	11	20	2.086	0.86	10	20
C _{max}	3.1981	8.03	22.270	11	20	2.086	0.86	11	22
T _{max}	0.2865	2.6875	19.915	9	16	2.12	0.865	9	18
t _{1/2}	0.1827	1.26413	33.809	25	48	2.021	0.851	24	48

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 28 se requieren por lo menos de 22 voluntarios para realizar un estudio de bioequivalencia de ampicilina cápsulas.



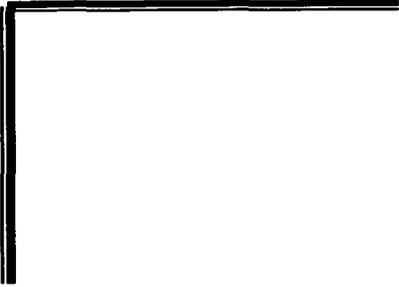
CONCLUSIONES



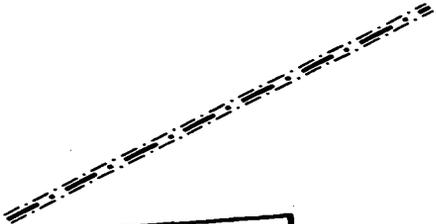
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5. CONCLUSIONES

- El método analítico para cuantificar Ampicilina en plasma, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, fue lineal, exacto, preciso, selectivo, tolerante y estable bajo las condiciones experimentales en el rango de concentraciones de 0.4 a 12.0 μ g/mL.
- En función de este estudio para caracterizar de manera adecuada el perfil farmacocinético se recomiendan los siguientes tiempos de muestreo 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.50, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0 horas.
- El método analítico desarrollado puede ser empleado de manera rutinaria en el análisis de Ampicilina en muestras plasmáticas.
- Para tener la significancia estadística adecuada se recomienda hacer un estudio de bioequivalencia de Ampicilina cápsulas haciendo uso de por lo menos 22 sujetos.



BIBLIOGRAFÍA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

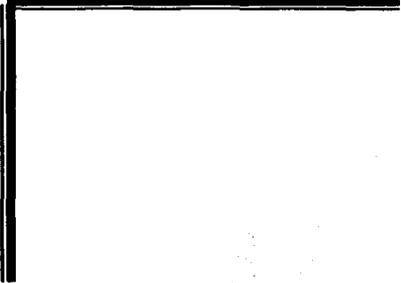
6. BIBLIOGRAFÍA

1. Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica, 9a. edición, Volumen II, Mc. Graw-Hill. Interamericana, México, 1996. pp.1145-1147, 1153-1158.
2. Muñoz A. y Obach R., Estudios de bioequivalencia, División de Investigación y Desarrollo, S.A. Lasa Laboratorios. Barcelona, 2002. pp. 1-2
3. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que debe sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Diario Oficial de la Federación, Primera Sección, viernes 7 de mayo de 1999.
4. Chow SC, Liu JP, Design and Análisis of Bioavailability and Bioequivalence Studies, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992. pp.63-69, 154-161.
5. Estévez C. Estudios de bioequivalencia: enfoque metodológico y aplicaciones prácticas en la evaluación de medicamentos genéricos. Revista Médica de Uruguay. 16 (2000) pp.133-143.
6. Palma-Aguirre, Medicamentos genéricos, biodisponibilidad y bioequivalencia. Gaceta Médica Mexicana, 1998, 134(4). pp.491-494.

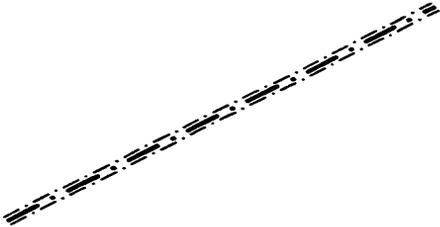
BIBLIOGRAFÍA

7. Arancibia A., Biodisponibilidad de Medicamentos, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 1ª edición, Chile, 1992. pp. 268, 270.
8. Jones B., Kenward M., Design and analysis of cross-over trials, Chapman and Hall, Londres, 1988.
9. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, Thirtieth edition, Pharmaceutical Press, London, 1993. pp. 116-118.
10. Elks J., Ganellin C., Dictionary of Drugs, Chemical Data, Structures and Bibliographies, Chapman and Hall, New York, 1990. pp. 84.
11. The Merck Index, Twelfth edition, Merck & Co., Inc. , Whitehouse Station, N.Y., 1996. pp. 628.
12. Clarke, Insolation and Identification of Drugs, Volume 1, The pharmaceutical Press, London, 1990. pp. 351.
13. Erah P.O., Barrett D.A., Shaw P.N. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay methods for the analysis of a range of penicillins in in vitro permeation studies. Journal of Chromatography B. 705 (1998) pp.65.
14. Mc Van BF, Índice de Medicamentos, Manual Moderno, México, D.F., 1993. pp. 98-99.
15. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas ,Ediciones PLM 2000, edición 46, México, 2000. pp.85,1503-1604.

16. Ishida M. Simple high-performance liquid chromatography determination of ampicillin in human serum using solid-phase extraction disk cartridges. Journal of Chromatography B. 727 (1999) pp. 245-248.
17. Marzo A. High-performance liquid chromatographic assay of ampicillin and its prodrug lenampicillin. Journal of Chromatography B. 507 (1990) pp.235-239.
18. Lee H. Simultaneous determination of ampicillin and matampicillin in biological fluids using high-performance liquid chromatography with column switching. Journal of Chromatography B. 664 (1995) pp.335-340.
19. Lanbeck-Vallén K. Determination of ampicillin in biological fluids by coupled-column liquid chromatography and post-column derivatization. Journal of Chromatography Biomedical Applications. 567 (1991) pp.121-128.
20. Yamane T. Statistics; An Introductory Análisis. A Harper International Edition, New York, 1979. pp.878.



APÉNDICE I

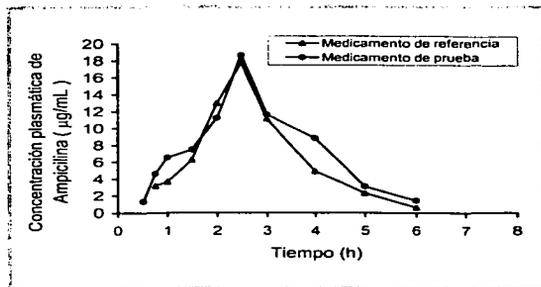


7. APÉNDICE I

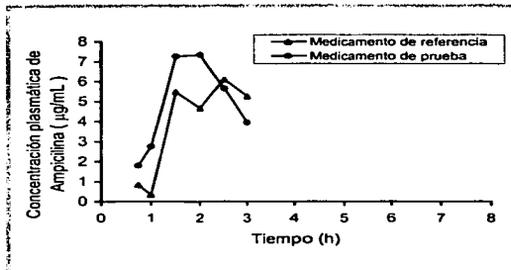
DATOS Y GRAFICAS DE CONCENTRACION PLASMÁTICA DE AMPICILINA VS. TIEMPO PARA CADA VOLUNTARIO.

VOLUNTARIO 1		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (h)	Periodo 1 Formulación de referencia (A)	Periodo 2 Formulación de prueba (B)
0	0.00	0.00
0.25	ND	ND
0.5	ND	1.24
0.75	3.15	4.57
1.0	3.64	6.53
1.50	6.26	7.45
2.0	12.95	11.21
2.5	17.79	18.63
3.0	11.11	11.61
4.0	4.91	8.83
5.0	2.31	3.08
6.0	0.63	1.43
7.0	ND	ND
8.0	ND	ND

ND= No detectable.

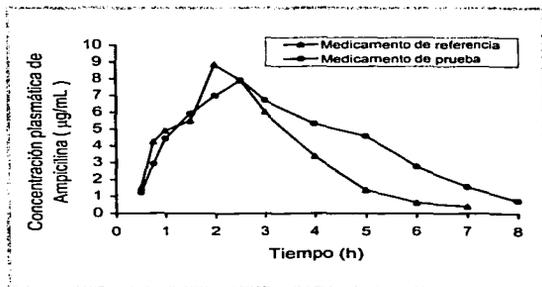


VOLUNTARIO 2		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (h)	Periodo 2 Formulación de referencia (A)	Periodo 1 Formulación de prueba (B)
0	0.00	0.00
0.25	ND	ND
0.5	ND	ND
0.75	0.83	1.79
1.0	0.32	2.74
1.50	5.47	7.25
2.0	4.65	7.33
2.5	6.07	5.63
3.0	5.25	3.94
4.0	ND	ND
5.0	ND	ND
6.0	ND	ND
7.0	ND	ND
8.0	ND	ND

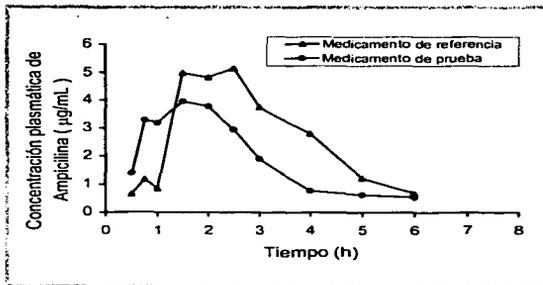


VOLUNTARIO 3		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (h)	Periodo 1 Formulación de referencia (A)	Periodo 2 Formulación de prueba (B)
0	0.00	0.00
0.25	ND	ND
0.5	1.50	1.22
0.75	4.23	2.92
1.0	4.89	4.42
1.50	5.49	5.91
2.0	8.85	7.00
2.5	7.92	7.91
3.0	6.02	6.72
4.0	3.37	5.31
5.0	1.38	4.58
6.0	0.63	2.76
7.0	0.40	1.56
8.0	NC	0.74

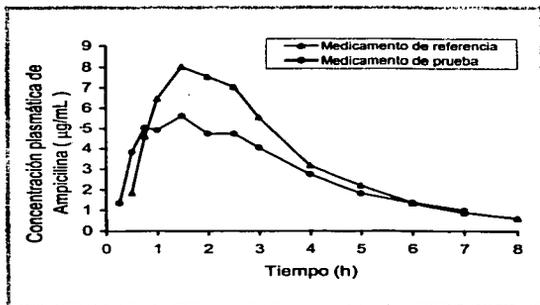
NC= No cuantificable.



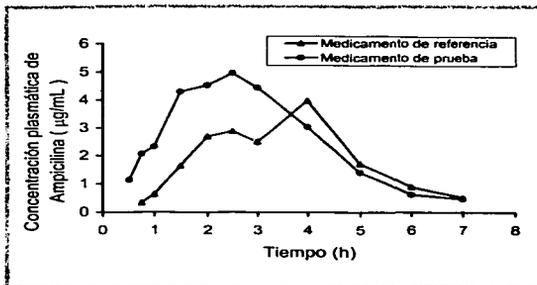
VOLUNTARIO 4		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (h)	Periodo 2 Formulación de referencia (A)	Periodo 1 Formulación de prueba (B)
0	0.00	0.00
0.25	ND	ND
0.5	0.65	1.39
0.75	1.17	3.28
1.0	0.85	3.18
1.50	4.98	3.96
2.0	4.81	3.78
2.5	5.14	2.94
3.0	3.75	1.90
4.0	2.80	0.77
5.0	1.22	0.63
6.0	0.68	0.54
7.0	ND	ND
8.0	ND	ND



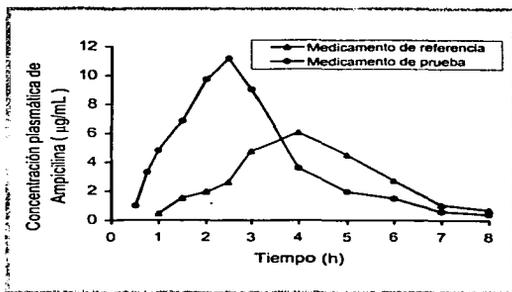
Tiempo (h)	VOLUNTARIO 5	
	Concentración (µg/mL)	
	Periodo 2 Formulación de referencia (A)	Periodo 1 Formulación de prueba (B)
0	0.00	0.00
0.25	NC	1.35
0.5	1.84	3.82
0.75	4.59	5.02
1.0	6.45	4.91
1.50	8.02	5.61
2.0	7.54	4.74
2.5	7.03	4.74
3.0	5.54	4.05
4.0	3.16	2.73
5.0	2.20	1.81
6.0	1.34	1.36
7.0	0.89	0.99
8.0	0.61	NC



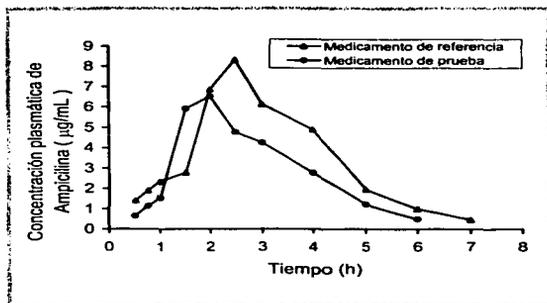
VOLUNTARIO 6		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (h)	Periodo 1 Formulación de referencia (A)	Periodo 2 Formulación de prueba (B)
0	0.00	0.00
0.25	ND	NC
0.5	ND	1.13
0.75	0.33	2.06
1.0	0.63	2.32
1.50	1.64	4.29
2.0	2.69	4.52
2.5	2.88	4.95
3.0	2.5	4.44
4.0	3.98	3.03
5.0	1.71	1.40
6.0	0.89	0.62
7.0	0.51	0.47
8.0	ND	NC



VOLUNTARIO 7		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (h)	Periodo 2 Formulación de referencia (A)	Periodo 1 Formulación de prueba (B)
0	0.00	0.00
0.25	ND	ND
0.5	ND	0.99
0.75	NC	3.30
1.0	0.44	4.80
1.50	1.53	6.86
2.0	1.95	9.71
2.5	2.61	11.15
3.0	4.76	9.03
4.0	6.06	3.61
5.0	4.52	1.96
6.0	2.72	1.48
7.0	1.04	0.6
8.0	0.70	0.4

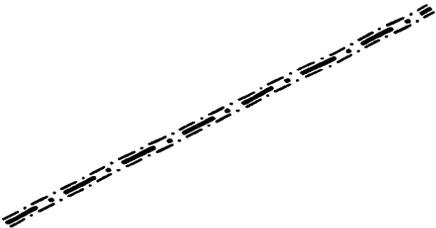


Tiempo (h)	VOLUNTARIO 8	
	Concentración (µg/mL)	
	Período 1 Formulación de referencia (A)	Período 2 Formulación de prueba (B)
0	0.00	0.00
0.25	ND	ND
0.5	1.40	0.63
0.75	1.89	1.12
1.0	2.34	1.53
1.50	2.78	5.91
2.0	6.85	6.52
2.5	8.33	4.77
3.0	6.13	4.25
4.0	4.90	2.78
5.0	1.96	1.21
6.0	0.99	0.49
7.0	0.46	NC
8.0	NC	ND





APÉNDICE II

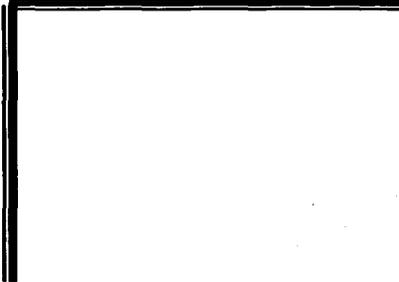


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

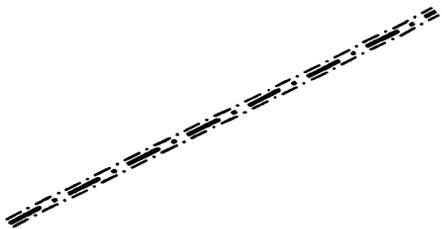
8. APÉNDICE II

PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE AMPICILINA
PARA CADA VOLUNTARIO

Sujeto	Formulación	Periodo	Secuencia	ABC _{0-4h}	ABC _{0-12h}	Cmax	Tmax	t _{1/2}
1	A	1	AB	37.31	37.99	17.79	2.5	0.75
1	B	2	AB	44.03	46.02	18.63	2.5	0.96
2	B	1	BA	13.01	18.53	7.33	2.0	0.97
2	A	2	BA	9.94	28.03	6.07	2.5	2.39
3	A	1	AB	24.68	25.32	8.85	2.0	1.12
3	B	2	AB	32.87	34.1	7.91	2.5	1.15
4	B	1	BA	10.97	12.08	3.96	1.5	1.42
4	A	2	BA	15.49	16.67	5.14	2.5	1.2
5	B	1	BA	21.37	24.16	5.61	1.5	1.96
5	A	2	BA	27.60	28.97	8.02	1.5	1.55
6	A	1	AB	12.71	13.46	3.98	4.0	1.02
6	B	2	AB	17.30	18.04	4.95	2.5	1.08
7	B	1	BA	31.48	32.18	11.15	2.5	1.22
7	A	2	BA	21.64	22.70	6.06	4.0	1.06
8	A	1	AB	23.53	24.21	8.33	2.5	1.02
8	B	2	AB	17.11	17.78	6.52	2.0	0.95



APÉNDICE III



9. APÉNDICE III

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE
AMPICILINA PARA 8 VOLUNTARIOS EMPLEANDO EL PROGRAMA BIOPAK
(DATOS SIN TRANSFORMAR)

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: AUC_LAST

Total Observations:	16	Observations Used:	16
Model Sum of Squares:	1338.3745152	df	9
Error Sum of Squares:	148.1741656	df	6
Mean Square Error:	24.6956943		

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	210.7033691	1	8.5320	0.0266
SUJETO(SECUENCIA)	1105.6721305	6	7.4620	0.0137
PERIODO	7.4733891	1	0.3026	0.6021
FORMULA	14.5256266	1	0.5882	0.4722

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	210.7033691	1	8.5320	0.0266
SUJETO(SECUENCIA)	1105.6721305	6	7.4620	0.0137
PERIODO	7.4733891	1	0.3026	0.6021
FORMULA	14.5256266	1	0.5882	0.4722

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast				
A vs B	14.5256266	1	0.5882	0.4722
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test				
SECUENCIA	210.7033691	1	1.1434	0.3261
Using SUJETO(SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: AUC_LAST

FORMULA	Value	Std. Error
A	21.6133	1.75698
B	23.5189	1.75698

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: AUC_LAST

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.200
Transformation = NONE Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 21.613281, s.e. 1.756975

Test : B Least squares mean 23.518906, s.e. 1.756975

Difference = 1.9056, s.e.d. 2.4847, df 6
Ratio = 108.8169

Classical

Westlake

C.L. 80% = (92.2625 , 125.3714) (79.6784 , 120.3216)
C.L. 90% = (86.4717 , 131.1622) (73.6359 , 126.3641)
C.L. 95% = (80.6791 , 136.9548) (67.8005 , 132.1995)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0231 Prob(> 120%)=0.1841 Max=0.1841 Total=0.2072

A.H. p-value = 0.1611
Power = 0.2557

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: AUC_INF

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 1113.5607429 df 9
 Error Sum of Squares: 174.9866836 df 6
 Mean Square Error: 29.1644473

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	70.5816106	1	2.4201	0.1708
SUJETO(SECUENCIA)	1003.9691387	6	5.7374	0.0259
PERIODO	37.0968500	1	1.2720	0.3025
FORMULA	1.9131436	1	0.0656	0.8064

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	70.5816106	1	2.4201	0.1708
SUJETO(SECUENCIA)	1003.9691387	6	5.7374	0.0259
PERIODO	37.0968500	1	1.2720	0.3025
FORMULA	1.9131436	1	0.0656	0.8064

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast A vs B	1.9131436	1	0.0656	0.8064
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test SECUENCIA	70.5816106	1	0.4218	0.5401
Using SUJETO(SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: AUC_INF

FORMULA	Value	Std. Error
A	24.6706	1.90933
B	25.3622	1.90933

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: AUC_INF

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.200
 Transformation = NONE Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 24.670627, s.e. 1.909334

Test : B Least squares mean 25.362209, s.e. 1.909334

Difference = 0.6916, s.e.d. 2.7002, df 6
 Ratio = 102.8033

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (87.0427 , 118.5638)	(83.7994 , 116.2006)
C.L. 90%	= (81.5296 , 124.0769)	(78.2421 , 121.7579)
C.L. 95%	= (76.0148 , 129.5917)	(72.7170 , 127.2830)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0412 Prob(> 120%)=0.0836 Max=0.0836 Total=0.1248

A.H. p-value = 0.0424
 Power = 0.2816

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: Cmax_ALL

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 265.8882250 df 9

Error Sum of Squares: 19.1885500 df 6

Mean Square Error: 3.1980917

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	34.8690250	1	10.9031	0.0164
SUJETO (SECUENCIA)	229.9565500	6	11.9841	0.0041
PERIODO	0.8556250	1	0.2675	0.6235
FORMULA	0.2070250	1	0.0647	0.8077

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	34.8690250	1	10.9031	0.0164
SUJETO (SECUENCIA)	229.9565500	6	11.9841	0.0041
PERIODO	0.8556250	1	0.2675	0.6235
FORMULA	0.2070250	1	0.0647	0.8077

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast

A vs B 0.2070250 1 0.0647 0.8077

Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test

SECUENCIA 34.8690250 1 0.9098 0.3770

Using SUJETO (SECUENCIA) as error term

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: Cmax_ALL

FORMULA	Value	Std. Error
A	8.03	0.632267
B	8.2575	0.632267

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Cmax_ALL

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.200
 Transformation = NONE Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 8.030000, s.e. 0.632267

Test : B Least squares mean 8.257500, s.e. 0.632267

Difference = 0.2275, s.e.d. 0.8942, df 6
 Ratio = 102.8331

	Classical	Westlake
C.L. 80%	(86.7986 , 118.8676)	(83.5237 , 116.4763)
C.L. 90%	(81.1897 , 124.4765)	(77.8704 , 122.1296)
C.L. 95%	(75.5791 , 130.0872)	(72.2494 , 127.7506)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0431 Prob(> 120%)=0.0870 Max=0.0870 Total=0.1301

A.H. p-value = 0.0440

Power = 0.2722

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: Tmax_ALL

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 6.3906250 df 9

Error Sum of Squares: 1.7187500 df 6

Mean Square Error: 0.2864583

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	0.3906250	1	1.3636	0.2872
SUJETO (SECUENCIA)	4.5937500	6	2.6727	0.1284
PERIODO	0.1406250	1	0.4909	0.5098
FORMULA	1.2656250	1	4.4182	0.0803

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	0.3906250	1	1.3636	0.2872
SUJETO (SECUENCIA)	4.5937500	6	2.6727	0.1284
PERIODO	0.1406250	1	0.4909	0.5098
FORMULA	1.2656250	1	4.4182	0.0803

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast A vs B	1.2656250	1	4.4182	0.0803
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test SECUENCIA	0.3906250	1	0.5102	0.5019
Using SUJETO(SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: Tmax_ALL

FORMULA	Value	Std. Error
A	2.6875	0.189228
B	2.125	0.189228

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Tmax_ALL

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.200
 Transformation = NONE Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 2.687500, s.e. 0.189228

Test : B Least squares mean 2.125000, s.e. 0.189228

Difference = -0.5625, s.e.d. 0.2676, df 6
 Ratio = 79.0698

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (64.7311 , 93.4084)	(70.0065 , 129.9935)
C.L. 90%	= (59.7155 , 98.4241)	(64.6846 , 135.3154)
C.L. 95%	= (54.6982 , 103.4413)	(59.6595 , 140.3405)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.5357 Prob(> 120%)=0.0031 Max=0.5357 Total=0.5388

A.H. p-value = 0.5326
 Power = 0.3402

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: HALF_ALL

Total Observations: 16 Observations Used: 16
 Model Sum of Squares: 1.5204942 df 9
 Error Sum of Squares: 1.0959982 df 6
 Mean Square Error: 0.1826664

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	0.8657688	1	4.7396	0.0724
SUJETO(SECUENCIA)	0.5994031	6	0.5469	0.7593
PERIODO	0.0454701	1	0.2489	0.6356
FORMULA	0.0098522	1	0.0539	0.8241

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	0.8657688	1	4.7396	0.0724
SUJETO(SECUENCIA)	0.5994031	6	0.5469	0.7593
PERIODO	0.0454701	1	0.2489	0.6356
FORMULA	0.0098522	1	0.0539	0.8241

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast A vs B	0.0098522	1	0.0539	0.8241
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test SECUENCIA	0.8657688	1	8.6663	0.0258
Using SUJETO(SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: HALF_ALL

FORMULA	Value	Std. Error
A	1.26413	0.151107
B	1.2145	0.151107

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: HALF_ALL

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.200
 Transformation = NONE Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 1.264129, s.e. 0.151107

Test : B Least squares mean 1.214500, s.e. 0.151107

Difference = -0.0496, s.e.d. 0.2137, df 6
 Ratio = 96.0741

Classical

Westlake

C.L. 80% = (71.7317 , 120.4164) (75.0982 , 124.9018)
 C.L. 90% = (63.2167 , 128.9315) (66.5271 , 133.4729)
 C.L. 95% = (54.6990 , 137.4491) (57.9963 , 142.0037)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.1892 Prob(> 120%)=0.1034 Max=0.1892 Total=0.2926

A.H. p-value = 0.0858
 Power = 0.1320

(TRANSFORMACIÓN LOGARÍTMICA)

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: Log10 AUC_LAST

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 0.5013441 df 9
 Error Sum of Squares: 0.0617352 df 6
 Mean Square Error: 0.0102892

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	0.0792824	1	7.7054	0.0322
SUJETO(SECUENCIA)	0.4174126	6	6.7613	0.0175
PERIODO	0.0018792	1	0.1826	0.6840
FORMULA	0.0027699	1	0.2692	0.6224

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	0.0792824	1	7.7054	0.0322
SUJETO(SECUENCIA)	0.4174126	6	6.7613	0.0175
PERIODO	0.0018792	1	0.1826	0.6840
FORMULA	0.0027699	1	0.2692	0.6224

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast				
A vs B	0.0027699	1	0.2692	0.6224
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test				
SECUENCIA	0.0792824	1	1.1396	0.3268
Using SUJETO(SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: Log10 AUC_LAST

FORMULA	Value	Std. Error
A	1.30048	0.0358629
B	1.3268	0.0358629

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Log10 AUC_LAST

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.200
 Transformation = LOG10 Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 1.300481, s.e. 0.035863

Test : B Least squares mean 1.326796, s.e. 0.035863

Difference = 0.0263, s.e.d. 0.0507, df 6
 Ratio = 106.2466

Classical

Westlake

C.L. 80% = (89.8013 , 125.7035) (80.2962 , 119.7038)
 C.L. 90% = (84.6712 , 133.3197) (73.2236 , 126.7764)
 C.L. 95% = (79.8327 , 141.3999) (65.9355 , 134.0645)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0256 Prob(> 120%)=0.1687 Max=0.1687 Total=0.1943

A.H. p-value = 0.1431
 Power = 0.3078

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: Log10 AUC_INF

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares:	0.3355246	df	9
Error Sum of Squares:	0.0564947	df	6
Mean Square Error:	0.0094158		

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	0.0138085	1	1.4665	0.2714
SUJETO (SECUENCIA)	0.3088218	6	5.4664	0.0289
PERIODO	0.0127869	1	1.3580	0.2881
FORMULA	0.0001074	1	0.0114	0.9184

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	0.0138085	1	1.4665	0.2714
SUJETO (SECUENCIA)	0.3088218	6	5.4664	0.0289
PERIODO	0.0127869	1	1.3580	0.2881
FORMULA	0.0001074	1	0.0114	0.9184

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast A vs B	0.0001074	1	0.0114	0.9184
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test SECUENCIA	0.0138085	1	0.2683	0.6230
Using SUJETO (SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: Log10 AUC_INF

FORMULA	Value	Std. Error
A	1.373	0.034307
B	1.36782	0.034307

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Log10 AUC_INF

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.200
 Transformation = LOG10 Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 1.373004, s.e. 0.034307

Test : B Least squares mean 1.367823, s.e. 0.034307

Difference = -0.0052, s.e.d. 0.0485, df 6
 Ratio = 98.8140

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (84.1307 , 116.0600)	(84.0525 , 115.9475)
C.L. 90%	= (79.5272 , 122.7782)	(78.5463 , 121.4537)
C.L. 95%	= (75.1744 , 129.8875)	(72.9279 , 127.0721)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0538 Prob(> 120%)=0.0664 Max=0.0664 Total=0.1201

A.H. p-value = 0.0126
 Power = 0.3364

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: Log10 Cmax_ALL

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares:	0.5148294	df	9
Error Sum of Squares:	0.0674423	df	6
Mean Square Error:	0.0112404		

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	0.0570080	1	5.0717	0.0653
SUJETO(SECUENCIA)	0.4568522	6	6.7740	0.0174
PERIODO	0.0008798	1	0.0783	0.7891
FORMULA	0.0000895	1	0.0080	0.9318

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	0.0570080	1	5.0717	0.0653
SUJETO(SECUENCIA)	0.4568522	6	6.7740	0.0174
PERIODO	0.0008798	1	0.0783	0.7891
FORMULA	0.0000895	1	0.0080	0.9318

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast				
A vs B	0.0000895	1	0.0080	0.9318
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test				
SECUENCIA	0.0570080	1	0.7487	0.4201
Using SUJETO(SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: Log10 Cmax_ALL

FORMULA	Value	Std. Error
A	0.862306	0.037484
B	0.867035	0.037484

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Log10 Cmax_ALL

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.200
 Transformation = LOG10 Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 0.862306, s.e. 0.037484

Test : B Least squares mean 0.867035, s.e. 0.037484

Difference = 0.0047, s.e.d. 0.0530, df 6
 Ratio = 101.0949

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (84.7999 , 120.5210)	(82.2498 , 117.7502)
C.L. 90%	= (79.7432 , 128.1635)	(75.8442 , 124.1558)
C.L. 95%	= (74.9866 , 136.2932)	(69.1714 , 130.8286)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0518 Prob(> 120%)=0.1049 Max=0.1049 Total=0.1567

A.H. p-value = 0.0531
 Power = 0.2818

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: Log10 Tmax_ALL

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 0.1994064 df 9
 Error Sum of Squares: 0.0409773 df 6
 Mean Square Error: 0.0068296

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	0.0202092	1	2.9591	0.1362
SUJETO (SECUENCIA)	0.1398138	6	3.4120	0.0804
PERIODO	0.0063504	1	0.9298	0.3721
FORMULA	0.0330329	1	4.8368	0.0702

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	0.0202092	1	2.9591	0.1362
SUJETO (SECUENCIA)	0.1398138	6	3.4120	0.0804
PERIODO	0.0063504	1	0.9298	0.3721
FORMULA	0.0330329	1	4.8368	0.0702

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast A vs B	0.0330329	1	4.8368	0.0702
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test SECUENCIA	0.0202092	1	0.8673	0.3877
Using SUJETO (SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: Log10 Tmax_ALL

FORMULA	Value	Std. Error
A	0.409125	0.0292181
B	0.31825	0.0292181

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Log10 Tmax_ALL

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.200
 Transformation = LOG10 Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 0.409125, s.e. 0.029218

Test : B Least squares mean 0.318250, s.e. 0.029218

Difference = -0.0909, s.e.d. 0.0413, df 6
 Ratio = 81.1195

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (70.7334 , 93.0306)	(74.3682 , 125.6318)
C.L. 90%	= (67.4235 , 97.5976)	(70.6673 , 129.3327)
C.L. 95%	= (64.2675 , 102.3904)	(67.3298 , 132.6702)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.4443 Prob(> 120%)=0.0031 Max=0.4443 Total=0.4475

A.H. p-value = 0.4412
 Power = 0.4625

BIOPAK ANOVA

Dependent Variable: Log10 HALF_ALL

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 0.1492203 df 9
 Error Sum of Squares: 0.0882433 df 6
 Mean Square Error: 0.0147072

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	0.0892686	1	6.0697	0.0489
SUJETO (SECUENCIA)	0.0554592	6	0.6285	0.7066
PERIODO	0.0043804	1	0.2978	0.6049
FORMULA	0.0001120	1	0.0076	0.9333

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	0.0892686	1	6.0697	0.0489
SUJETO (SECUENCIA)	0.0554592	6	0.6285	0.7066
PERIODO	0.0043804	1	0.2978	0.6049
FORMULA	0.0001120	1	0.0076	0.9333

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast A vs B	0.0001120	1	0.0076	0.9333
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test SECUENCIA	0.0892686	1	9.6577	0.0209
Using SUJETO (SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: Log10 HALF_ALL

FORMULA	Value	Std. Error
A	0.0770674	0.0428766
B	0.0717753	0.0428766

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Log10 HALF_ALL

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.200
 Transformation = LOG10 Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 0.077067, s.e. 0.042877

Test : B Least squares mean 0.071775, s.e. 0.042877

Difference = -0.0053, s.e.d. 0.0606, df 6
 Ratio = 98.7888

Classical

Westlake

C.L. 80% = (80.7965 , 120.7878) (80.1374 , 119.8626)
 C.L. 90% = (75.3094 , 129.5885) (73.2293 , 126.7707)
 C.L. 95% = (70.1935 , 139.0333) (66.0586 , 133.9414)

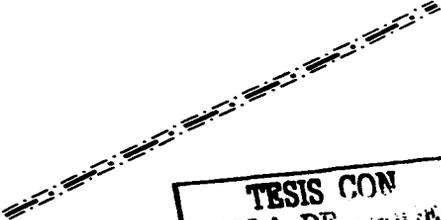
Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0908 Prob(> 120%)=0.1065 Max=0.1065 Total=0.1973

A.H. p-value = 0.0157
 Power = 0.2175



APÉNDICE IV



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10. APÉNDICE IV

DISTRIBUCIÓN t

$\frac{1}{n}$.25	.20	.15	.10	.05	.025	.01	.005	.0005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	636.619
2	.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.598
3	.765	.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.941
4	.741	.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610
5	.727	.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.859
6	.718	.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7	.711	.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.405
8	.706	.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9	.703	.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10	.700	.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11	.697	.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437
12	.695	.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13	.694	.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14	.692	.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140
15	.691	.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16	.690	.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.585	2.921	4.015
17	.689	.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18	.688	.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19	.688	.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883
20	.687	.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850
21	.686	.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819
22	.686	.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23	.685	.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.767
24	.685	.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745
25	.684	.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26	.684	.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707
27	.684	.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690
28	.683	.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674
29	.683	.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659
30	.683	.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646
40	.681	.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.551
60	.679	.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.460
100	.677	.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	3.373
120	.674	.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.291

Sources: This table is abridged from Table III of Fisher & Yates: *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research* published by Oliver & Boyd Ltd., Edinburgh, and by permission of the authors and publishers.