

00524
53

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO PRELIMINAR PARA EVALUAR LA
BIOEQUIVALENCIA DE DOS FORMULACIONES ORALES
DE AMOXICILINA

Se a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

TITULO: Elvia Sosa

Zavala

FECHA: 30/06/03

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N :
ELSA FLORES MARROQUIN
ELVIA SOSA ZAVALA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F., 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Alfredo Garzón Serra
Vocal: Prof. Inés Fuentes Noriega
Secretario: Prof. Luis Jesús García Aguirre
1er suplente: Prof. José Manuel Morales Hernández
2do suplente: Prof. Liz Jannet Medina Reyes

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Farmacocinética, Facultad de Medicina, UNAM.

Asesor del tema:

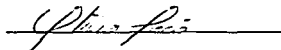
M. en F. Luis Jesús García Aguirre



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Luis Jesús García Aguirre', written over a horizontal line.

Supervisor técnico:

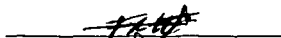
Q.F.B. Olivia C. León Cardoso



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Olivia C. León Cardoso', written over a horizontal line.

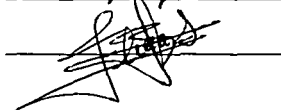
Sustentantes:

Elsa Flores Marroquín



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Elsa Flores Marroquín', written over a horizontal line.

Elvia Sosa Zavala



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Elvia Sosa Zavala', written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Farmacocinética de la Facultad de Medicina de la UNAM, por brindarnos la oportunidad de desarrollar este proyecto; en especial a nuestro asesor M. en F. Luis Jesús García Aguirre y aquéllos que de alguna manera contribuyeron a la finalización de este trabajo.

A nuestro jurado por haber contribuido, con especial empeño, a la mejora general de esta tesis.

A Pedro, Irene y Male por enseñarnos y ayudarnos en nuestro crecimiento como seres humanos; así como por darnos la oportunidad de demostrar nuestras capacidades profesionales dentro de la UNAM.

A nuestro Dios por acompañarnos y fortalecernos siempre.

DEDICATORIAS

A mis padres, faltarían palabras para describir todo el agradecimiento y cariño que les tengo, solamente les puedo decir que gracias a ustedes he llegado donde estoy. A mis hermanos, la primera generación, por ser mi mejor ejemplo a seguir. Para la segunda generación, por confiar en mí y compartir momentos de alegría y tristeza juntos. Gracias y los quiero mucho.

ELSA

A mi madre por ser el mayor apoyo que Dios me ha brindado... ya que ha sido padre y madre para sus hijos. Esli y Emilio, no hubiese tenido mejores hermanos. A mis grandes amigos por acompañarme siempre que los necesite y a Elsa por ser la hermana que no tuve.

ELVIA

C

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	i
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE GRÁFICAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii

Numeral	Contenido	Página
1.0	Resumen	1
2.0	Introducción y objetivos	2
3.0	Generalidades	4
3.1	Aspectos generales sobre estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia	4
3.1.1	Biodisponibilidad y estudios de biodisponibilidad	8
3.1.2	Bioequivalencia y estudios de bioequivalencia	10
3.1.3	Medicamentos que deben someterse a estudios de bioequivalencia según la Secretaría de Salud	13
3.2	Enfermedades infecciosas causadas por microorganismos	15
3.2.1	Enfermedades infecciosas del sistema respiratorio	18
3.2.2	Enfermedades infecciosas del aparato digestivo	19
3.2.3	Enfermedades infecciosas del aparato urinario	20
3.3	Amoxicilina	20
3.3.1	Propiedades fisicoquímicas	20
3.3.2	Indicaciones terapéuticas	21
3.3.3	Farmacodinamia	21
3.3.4	Farmacocinética	22

Numeral	Contenido	Página
	3.3.5 Contraindicaciones	23
	3.3.6 Reacciones adversas	23
	3.3.7 Interacciones medicamentosas	23
	3.3.8 Sobredosificación	24
	3.3.9 Dosis	24
	3.3.10 Formas farmacéuticas	24
	3.4 Métodos analíticos para cuantificar amoxicilina en fluidos biológicos	24
4.0	Parte experimental	26
	4.1 Condiciones previas al estudio de bioequivalencia	26
	4.2 Optimización del método analítico	28
	4.2.1 Selección del detector	28
	4.2.2 Selección de la columna	29
	4.2.3 Optimización de la fase móvil	29
	4.2.4 Selección del método de extracción	29
	4.3 Validación del método analítico para cuantificar amoxicilina en plasma	30
	4.3.1 Linealidad del método	30
	4.3.2 Precisión	30
	4.3.3 Exactitud	31
	4.3.4 Límite de cuantificación	31
	4.3.5 Límite de detección	31
	4.3.6 Estabilidad	32
	4.3.6.1 Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente	32
	4.3.6.2 Estabilidad de la muestra en refrigeración	32

Numeral	Contenido	Página
	4.3.6.3 Estabilidad de la muestra en congelación	32
	4.3.6.4 Ciclos de congelación-descongelación	33
	4.3.6.5 Estabilidad de la muestra procesada	33
	4.3.7 Selectividad	33
	4.3.8 Recobro	34
4.4	Estudio preliminar de bioequivalencia de amoxicilina (protocolo clínico)	34
	4.4.1 Objetivo del estudio	34
	4.4.2 Tipo y diseño del estudio	34
	4.4.3 Selección de voluntarios	35
	4.4.4 Procedimiento de recolección de muestras	36
4.5	Análisis de las muestras plasmáticas	36
	4.5.1 Puntos de control de calidad	37
	4.5.2 Cuantificación de las muestras plasmáticas	37
	4.5.3 Análisis farmacocinético	37
	4.5.4 Análisis estadístico	38
4.6	Determinación del tamaño de la muestra	38
5.0	Resultados y análisis de resultados	40
5.1	Optimización del método por HPLC para cuantificar amoxicilina en plasma	40
5.2	Validación del método analítico para cuantificar amoxicilina en plasma	42
	5.2.1 Linealidad del método	42
	5.2.2 Precisión y exactitud del método	43
	5.2.2.1 Repetibilidad	43
	5.2.2.2 Reproducibilidad	44
	5.2.3 Límite de cuantificación	45
	5.2.4 Límite de detección	46

Numeral	Contenido	Página
	5.2.5 Estabilidad	46
	5.2.5.1 Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente	46
	5.2.5.2 Estabilidad de la muestra en refrigeración	47
	5.2.5.3 Estabilidad de la muestra en congelación	48
	5.2.5.4 Ciclos de congelación-descongelación	49
	5.2.5.5 Estabilidad de la muestra procesada	50
	5.2.6 Selectividad	51
	5.2.7 Recobro	52
5.3	Estudio de bioequivalencia de amoxicilina	52
5.4	Concentraciones promedio de amoxicilina y análisis farmacocinético	55
5.5	Análisis estadístico de los resultados	58
5.6	Análisis estadístico para determinar el tamaño de la muestra	60
6.0	Conclusiones	64
7.0	Bibliografía	65
	APÉNDICE I	67
	APÉNDICE II	80
	APÉNDICE III	87
	APÉNDICE IV	103

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Título	Página
1	Datos estadísticos de mortalidad en México, 1999, SSA.	16
2	Espectro de acción de la amoxicilina.	17
3	Datos farmacocinéticos de amoxicilina.	22
4	Curva de calibración de amoxicilina.	28
5	Asignación de voluntarios en un diseño cruzado.	35
6	Condiciones cromatográficas utilizadas.	40
7	Resultados del método para cuantificar amoxicilina en plasma.	42
8	Repetibilidad y exactitud del método para cuantificar amoxicilina en plasma.	44
9	Reproducibilidad y exactitud del método para cuantificar amoxicilina en plasma.	45
10	Límite de cuantificación para la determinación de amoxicilina en plasma.	45
11	Estabilidad de amoxicilina a temperatura ambiente.	46
12	Estabilidad de amoxicilina en refrigeración.	47
13	Estabilidad de amoxicilina en congelación.	48
14	Estabilidad de amoxicilina en ciclos de congelación-descongelación.	49
15	Estabilidad de la muestra procesada de amoxicilina.	50
16	Recobro de amoxicilina en plasma humano.	52
17	Control de calidad de las formulaciones.	53
18	Seguimiento de las curvas de calibración de amoxicilina.	54
19	Seguimiento de los puntos de control de calidad para amoxicilina.	55
20	Concentración plasmática promedio de amoxicilina \pm D.E. después de la administración de ambos productos a los doce voluntarios.	56
21	Parámetros farmacocinéticos (promedio de los 12 voluntarios) para las dos formulaciones.	58

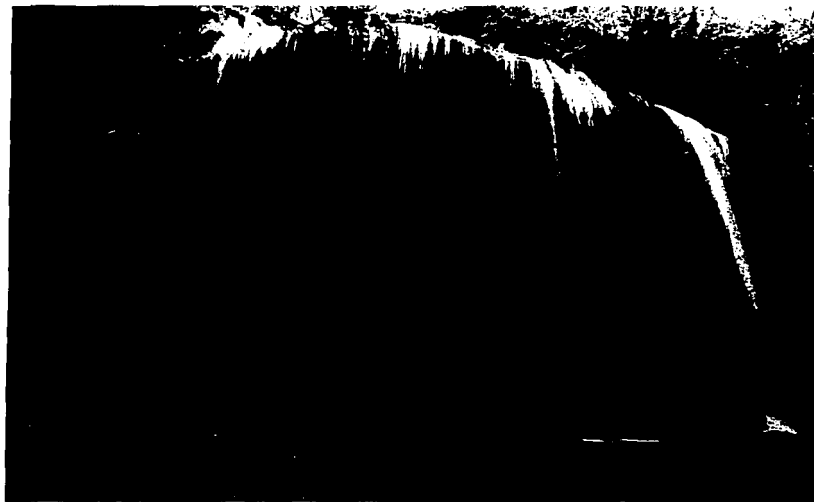
Número	Título	Página
22	Análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos (escala aritmética).	59
23	Análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos (transformación logarítmica).	59
24	Parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de los datos de concentración de amoxicilina en plasma.	61
25	Resultados de la determinación del tamaño de muestra.	63

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Número	Título	Página
1	Lincalidad promedio del método para cuantificar amoxicilina en plasma.	43
2	Concentración plasmática (promedio de 12 voluntarios) de amoxicilina contra tiempo, después de la administración de una dosis única de 500 mg por vía oral.	57
3	Logaritmo de la concentración plasmática (promedio de 12 voluntarios) de amoxicilina contra tiempo, después de la administración de una dosis única de 500 mg por vía oral.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Diferentes fases por las que puede pasar un fármaco desde el lugar de su aplicación a su sitio de acción.	5
2	Etapas de absorción para un fármaco administrado por vía oral.	6
3	Estructura química de la amoxicilina.	21
4	Método para extraer amoxicilina de plasma.	41
5	Cromatogramas de amoxicilina en plasma, después de su extracción.	51



1.0 RESUMEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1A

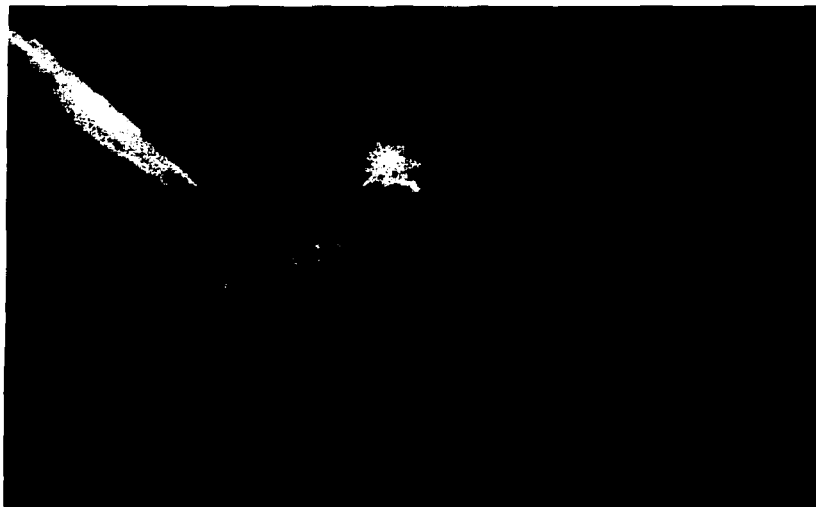
1.0 RESUMEN

El presente trabajo expone el caso de un estudio preliminar para evaluar la bioequivalencia de dos formulaciones orales de amoxicilina, utilizando a 12 voluntarios y teniendo como objetivo el determinar el tamaño de muestra y los tiempos de muestreo.

A los voluntarios participantes en el estudio se les administró una dosis única por vía oral de 500 mg de amoxicilina, con un periodo de lavado entre cada uno de los tratamientos, por medio de un diseño cruzado 2 x 2. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas a los siguientes periodos de tiempo después de su administración: tiempo 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3, 4, 5 y 6 horas.

Para tal fin se utilizó un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con extracción líquido/líquido para la cuantificación de la amoxicilina en las muestras biológicas, el cual se optimizó y validó bajo los parámetros de: selectividad, linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, límite de cuantificación, límite de detección, estabilidad y recobro.

En la determinación del tamaño de muestra se utilizó la prueba estadística de igualdad de hipótesis, encontrándose que el número mínimo de voluntarios para evaluar la bioequivalencia entre los medicamentos en estudio es de 16.



2.0 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.0 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En México, los datos estadísticos de mortalidad proporcionados por la Secretaría de Salud (SSA) teniendo como fuente el INEGI en el año de 1999 ⁽¹⁾, nos permiten observar que enfermedades como la influenza y la neumonía ocupan el octavo lugar, las enfermedades pulmonares el décimo lugar, la bronquitis crónica, enfisema y asma el trigésimo lugar y las enfermedades infecciosas intestinales ocupan el quinceavo lugar. Para el tratamiento de estas enfermedades existen una gran variedad de medicamentos, aunque el tratamiento de elección siguen siendo las penicilinas.

En este estudio se utiliza como principio activo a la amoxicilina, penicilina semisintética con un amplio espectro de acción, que se emplea para organismos Gram positivos y Gram negativos del tipo patógeno. Se utiliza en el tratamiento de infecciones bacterianas como: infecciones agudas y crónicas de vías respiratorias superiores e inferiores, infecciones gastrointestinales, infecciones genitourinarias, infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones de vías biliares, gonorrea, meningitis, infecciones dentales y en la erradicación de *Helicobacter pylori*. ⁽²⁾

Debido a su uso recurrente, la amoxicilina se encuentra incluida en forma farmacéutica de suspensión oral y cápsula en el Catálogo de Medicamentos Genéricos, que emitió en 1997 la Secretaría de Salud. En donde se determinan además, las pruebas de intercambiabilidad que deberán aplicársele. ⁽³⁾

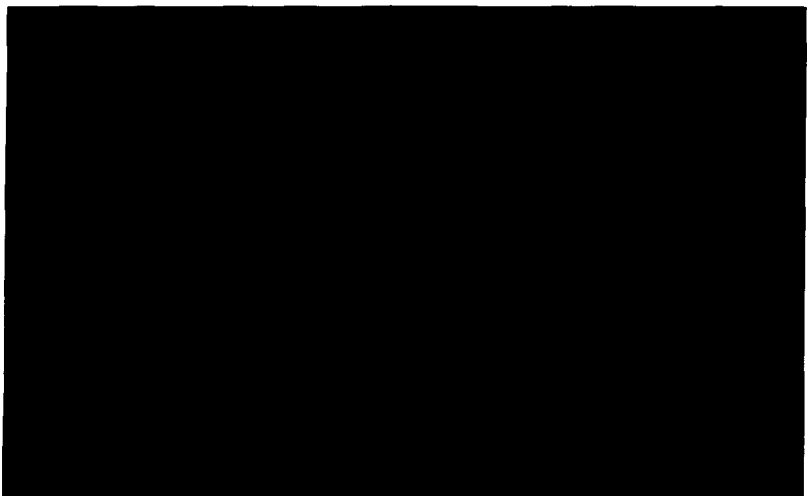
Dada la situación económica, social y política de nuestro país, los medicamentos genéricos son considerados como una alternativa importante en el tratamiento de enfermedades. Para la aceptación de genéricos los estudios de bioequivalencia son especialmente importantes.

La determinación del tamaño de muestra, es comúnmente requerida en los diferentes diseños experimentales que se aplican en las pruebas para demostrar que un medicamento es intercambiable, dada su importancia como elemento de influencia en:

- a) Costos del estudio
- b) Tiempos
- c) Cantidad de reactivos
- d) Espacios de infraestructura requeridos

Con base en lo anterior, se establecieron los siguientes objetivos del estudio:

- Optimizar y validar un método analítico por CLAR para la cuantificación de amoxicilina en plasma.
- Determinar los tiempos de muestreo para un estudio de bioequivalencia de dos formulaciones orales de amoxicilina cápsulas de 500 mg.
- Determinar el tamaño de muestra mínimo necesario para realizar un estudio de bioequivalencia, utilizando como prueba estadística la igualdad de hipótesis.



3.0 GENERALIDADES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.0 GENERALIDADES

3.1 ASPECTOS GENERALES SOBRE ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD Y BIOEQUIVALENCIA

A lo largo de la historia de la humanidad la fabricación, prescripción y dispensación de un medicamento tienen la finalidad de lograr una eficacia terapéutica y segura del mismo, al ser administrado en un paciente (4).

Algunas de las variables que están ligadas al medicamento son la vía de administración, las características físicas del principio activo y la tecnología farmacéutica empleada en su fabricación y estas dependen de la especialidad y de su origen industrial. En la actualidad podemos encontrar una gran variedad de medicamentos con el mismo principio activo procedentes de diversos fabricantes en el mercado de los productos genéricos, sin embargo se han presentado históricamente incidentes como ineficacia, toxicidad y hasta resultados terapéuticos distintos entre este tipo de especialidades, por lo cual se ha considerado muy importante estudiar los parámetros que influyen en la actividad terapéutica de la formulación al ser administrada a un paciente.

Las investigaciones farmacocinéticas sobre la acción terapéutica del medicamento han encontrado una relación de equilibrio entre la concentración del principio activo en la biofase y la concentración plasmática. De esta manera la actividad terapéutica es el resultado de una serie de etapas consecutivas a la administración de un medicamento, las cuales dependen de las características del principio activo y del individuo al que se le administra. Esta trayectoria que debe recorrer un medicamento desde el lugar en que se aplica o administra hasta el sitio de acción, se muestra en la figura 1. (5)

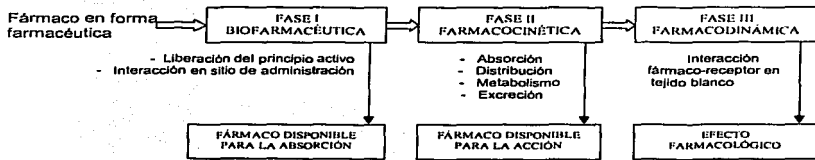


Figura 1. Diferentes fases por las que puede pasar un fármaco desde el lugar de su aplicación a su sitio de acción (1).

Las diferentes fases que sigue un medicamento desde el momento de ser administrado hasta el sitio de acción se mencionan a continuación:

Fase I Biofarmacéutica: Comienza en el momento de la administración del medicamento y depende de los siguientes factores: la dosis administrada, la vía de administración, la forma farmacéutica y las variaciones fisiopatológicas del sitio de administración. Esta primera etapa se le conoce como LDA porque se divide a su vez en una fase de liberación, disolución y absorción. La finalidad de está es de llegar a una dispersión molecular del fármaco. (4)

Fase II Farmacocinética: La farmacocinética pertenece a la farmacología y en términos generales es el estudio de lo que el organismo le hace al fármaco. Esta etapa se divide en absorción, distribución, biotransformación y excreción de los fármacos. Estas etapas, junto con la dosis, determinan la concentración del fármaco en los sitios de acción y, en consecuencia, la intensidad de sus efectos en función del tiempo. (6)

Primera etapa: Absorción

Esta etapa consiste en el paso de las moléculas del principio activo desde el lugar de administración hasta la circulación sanguínea y está limitada por los siguientes factores: la velocidad de disolución y la de difusión del principio activo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las propiedades fisicoquímicas del fármaco como solubilidad, naturaleza química, pka, grado de ionización y coeficiente de partición son consideradas como condiciones que afectan el proceso de disolución del fármaco y por lo tanto la absorción. La mayoría de los fármacos son ácidos o bases débiles presentes en solución como especies ionizadas y no ionizadas. Las moléculas no ionizadas usualmente son liposolubles y difunden a través de la membrana celular. (4,5)

Los mecanismos de paso del fármaco a través de membranas biológicas suelen ser por difusión pasiva, transporte activo o la pinocitosis. Pero el más importante es el primero y depende de la hidrosolubilidad, liposolubilidad, de la fracción ionizada del principio activo y del flujo sanguíneo en el sitio de absorción. (4,6)

De manera general los fármacos que son administrados en solución acuosa son absorbidos más rápidamente, mientras que si son administrados en forma sólida tardan más en absorberse y su velocidad dependerá de lo anteriormente citado. (6) En la figura 2 se puede ver la absorción de un principio activo administrado en una forma farmacéutica sólida por vía oral (8)

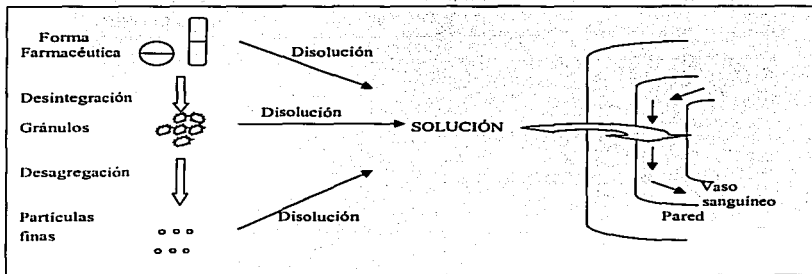


Figura 2. Etapa de absorción para un fármaco administrado por vía oral.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Segunda etapa: Distribución

Estando el fármaco en la circulación general, independientemente de la vía de administración, es distribuido en los líquidos intersticiales y celulares. La difusión en el compartimiento intersticial se produce rápidamente debido a la naturaleza permeable de las membranas del endotelio capilar.

Sin embargo, la distribución del principio activo está en función de sus propiedades fisicoquímicas, su afinidad o fijación a las proteínas plasmáticas, de la irrigación en los órganos y su afinidad a los tejidos. (5)

Sólo la forma libre del fármaco se considera activa y es la que puede difundir a los tejidos, mientras que la forma unida se considera como reservorio del fármaco en el plasma. (5)

Tercera etapa: Metabolismo o biotransformación

Durante su estancia en el organismo el principio activo sufre una biotransformación enzimática, cambiando su estructura química a otra más polar que facilita su eliminación. El principal órgano encargado de la biotransformación de muchos fármacos es el hígado. (6)

Las reacciones químicas de la biotransformación enzimática se clasifican en dos tipos: reacciones de fase I o II. Las reacciones de fase I involucran la oxidación, reducción o hidrólisis del principio activo; mientras que las de fase II son de conjugación o de síntesis en las que se adiciona un sustrato endógeno más polar a la molécula del principio activo. (6)

Cuarta etapa: Excreción

La eliminación de los fármacos del organismo puede ser como compuestos no alterados o como metabolitos. El principal órgano responsable de ésta etapa es el riñón y en menor cantidad la bilis, los pulmones, la piel y las glándulas mamarias.

El riñón elimina los fármacos y sus metabolitos a través de tres mecanismos: (5,6)

1) Filtración glomerular en ella los fármacos de bajo peso molecular y sus fracciones libres pasan a través del glomerulo para ser eliminados en la orina.

2) Secreción tubular activa permite el paso de los compuestos ionizados e hidrosolubles, mediante un proceso de transporte activo, desde el interior celular hasta la luz del túbulo proximal.

3) Reabsorción tubular pasiva permite a las sustancias no ionizadas y liposolubles abandonar la orina para volver al interior celular mediante un proceso de difusión pasiva en los túbulos distal y proximal.

Fase III Farmacodinámica: Es la última fase de la trayectoria del fármaco y comprende los procesos de la interacción fármaco-receptor en el sitio de acción y lo que finalmente causa el efecto en el organismo.

3.1.1 BIODISPONIBILIDAD Y ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD

La FDA define la biodisponibilidad como "la velocidad y el grado en que se absorbe el ingrediente activo o la fracción activa de un fármaco y se hace disponible en el sitio de acción". En términos más sencillos es la medida de la velocidad y de la cantidad de fármaco administrado en una forma farmacéutica que llega a la circulación general. (9)

La evaluación de la biodisponibilidad por métodos farmacocinéticos se basa en la relación que guardan los parámetros de $C_{m\acute{a}x}$, $T_{m\acute{a}x}$ y ABC con la eficacia clínica de un principio activo determinado después de su administración.

Los estudios de biodisponibilidad permiten la elección de las condiciones óptimas de dosificación que aseguren un eficaz efecto terapéutico, teniendo en cuenta la farmacocinética del principio activo, además permite comparar uno o varios equivalentes químicos procedentes de distintos fabricantes para aceptar o rechazar una equivalencia terapéutica. (4,7)

Las situaciones en las que suele determinarse la biodisponibilidad, son las siguientes:

- En estudios de bioequivalencia de productos farmacéuticos.
- Estudio y desarrollo de nuevas formulaciones.
- Estudios en cambios de dosis de la forma farmacéutica.
- Estudio del efecto de la vía de administración.
- Estudio de nuevos regímenes de dosificación.
- Efecto en las modificaciones de una formulación.
- Evaluación del efecto de los factores fisiológicos.
- Correlación con eficacia clínica y toxicidad. (8)

3.1.2 BIOEQUIVALENCIA Y ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA

La FDA define a la bioequivalencia como "la ausencia de una diferencia significativa en la velocidad y el grado en que el ingrediente activo o la fracción activa de equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas se hace disponible en el sitio de acción farmacológico, cuando se administra en una misma dosis molar bajo condiciones similares en un estudio diseñado apropiadamente". (9)

Los estudios de bioequivalencia comparan la biodisponibilidad de dos o más medicamentos que contienen el mismo principio activo, pero que son diferentes en formulación, forma farmacéutica, preparación, lote, técnica de fabricación o fabricante. Son especialmente importantes para la aceptación de los medicamentos genéricos. En general, la bioequivalencia se evalúa mediante la construcción de intervalos de confianza al 90% para el cociente entre los promedios de ABC y $C_{máx}$ de los productos de prueba y de referencia. En este sentido, un intervalo de 80 a 120% es suficiente como criterio de equivalencia, cuando los datos se analizan en la escala original. Cuando los datos se transforman a su logaritmo, se usa un intervalo de 80 a 125% para determinar la equivalencia. (3)

La NOM-177-SSA1-1998 establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable (GI). (3)

En esta norma se estipula que dichos estudios deben realizarse con base en lo dispuesto en la Ley General de Salud, en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, las Buenas Prácticas Clínicas y demás disposiciones aplicables.

En cuanto a la selección de voluntarios, estas personas deben ser clínicamente sanas y que no presenten sensibilidad al fármaco bajo estudio, con edad entre 18 y 55 años de edad, con un peso $\pm 10\%$ del ideal, con pruebas de laboratorio y gabinete incluidas examen general de orina, química sanguínea, biometría hemática, transaminasas hepáticas, prueba de la hepatitis B, VIH, radiografía de tórax y electrocardiograma. No deben tener antecedentes

de drogadicción o de abuso de alcohol, café, tabaco, bebidas de cola, ni estar bajo la administración de medicamentos concominantes. La dieta de los voluntarios durante el estudio deberá ser homogénea. (3)

En cuanto al diseño experimental, el diseño básico debe responder a la pregunta de si existe bioequivalencia entre dos medicamentos. El estudio debe realizarse mediante un diseño cruzado u otros que se justifiquen en el protocolo. Una de las ventajas más importantes en un diseño cruzado 2x2 es que cada sujeto es su propio control, aislando así la variabilidad biológica, de tal manera que los cambios en los niveles plasmáticos del fármaco evaluado son un reflejo de la formulación misma. Este tipo de diseño permite utilizar un número relativamente pequeño de voluntarios para tener significancia estadística. (10) La asignación de voluntarios se hará de acuerdo a una tabla de aleatorización. En un estudio de dosis única la administración de los medicamentos debe estar separada por periodos de lavado lo suficientemente largos para eliminar la dosis anterior, antes de la administración de la siguiente, por lo menos de siete vidas medias del compuesto bajo estudio. (3)

El tamaño de la muestra debe basarse en consideraciones estadísticas y debe proveer un indicador confiable de los parámetros farmacocinéticos relevantes ($C_{m\acute{a}x}$, ABC, $ABC_{Co-\infty}$), debe satisfacer los requerimientos con respecto al error tipo I (alfa), error tipo II (beta) y una diferencia mínima a detectar, con relación a la biodisponibilidad promedio entre el medicamento de prueba y el de referencia (gama). Debe calcularse por métodos estadísticamente adecuados. (3)

Los medicamentos deben administrarse por vía oral con 250 ml de agua, con formas farmacéuticas de liberación rápida los voluntarios deberán encontrarse en ayunas por lo menos 10 horas antes de la administración del medicamento y dos horas como mínimo después de la administración. (3)

La toma de muestras, su sistema de recolección y las precauciones que deben tomarse durante el proceso deben estar de acuerdo a un PNO establecido previamente. El muestreo

debe cubrir por lo menos el 80% del área bajo la curva de la concentración plasmática (como mínimo 4 vidas medias en el caso de sangre y 7 en orina). El horario de obtención de muestras debe diseñarse de tal manera que se pueda caracterizar el ABC y la $C_{m\acute{a}x}$. Se deben obtener muestras de sangre por lo menos de 11 diferentes tiempos de muestreo, incluidos tiempo 0, 3-4 puntos antes del $C_{m\acute{a}x}$, 3-5 puntos alrededor de $C_{m\acute{a}x}$ y 4-6 puntos en la fase de eliminación.

Los parámetros a determinarse son: biodisponibilidad que se calcula a partir de concentraciones plasmáticas ABC_{Co-t} , $ABC_{Co-\infty}$ y $C_{m\acute{a}x}$ o a partir de cantidades eliminadas de orina, debe especificarse el método de cálculo de los parámetros farmacocinéticos, para ABC_{Co-t} se utiliza la regla de los trapezoides. El análisis de los datos y la estadística es a través de una ANOVA con los parámetros farmacocinéticos ABC y $C_{m\acute{a}x}$, además se probarán las hipótesis con un intervalo de confianza del 90%, entre el cociente entre los promedios de prueba y de referencia.

Para poder analizar las muestras biológicas se debe contar con un método analítico validado, en donde se establecerán previamente los criterios de aceptación o rechazo. La validación debe incluir como mínimo los siguientes parámetros: (3)

- **Rango:** Se establece el intervalo en función de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar.
- **Recuperación absoluta:** Eficiencia del método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar.
- **Linealidad:** Capacidad del método analítico, en un intervalo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.
- **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 del método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.
- **Reproducibilidad:** Precisión del método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis.
- **Exactitud:** Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el de referencia.
- **Estabilidad:** Propiedad del compuesto a analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.
- **Límite de cuantificación:** Concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.
- **Límite de detección:** Concentración mínima de un compuesto en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidos.
- **Selectividad:** Capacidad del método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

3.1.3 MEDICAMENTOS QUE DEBEN SOMETERSE A ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA SEGÚN LA SECRETARÍA DE SALUD

La Secretaría de Salud emitió un acuerdo por el que se relacionan las especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al catálogo de medicamentos genéricos intercambiables y se determinan las pruebas que deberán aplicárseles. (11)

Así se tiene que los medicamentos que no requieren someterse a pruebas de disolución o bioequivalencia, son:

- a) Las soluciones acuosas para uso parenteral, en las que se mantengan las condiciones del medicamento innovador;

- b) Las soluciones orales exentas de excipientes conocidos que modifiquen los parámetros farmacocinéticos;
- c) Los gases;
- d) Los medicamentos tópicos de uso no-sistémico, cuya absorción no implique riesgo;
- e) Los medicamentos para inhalación en solución acuosa, y
- f) Los medicamentos para inhalación en suspensión, que demuestren que el tamaño de partícula es equivalente al del innovador. (11)

Los medicamentos que deberán someterse a pruebas de bioequivalencia, son:

- a) Los medicamentos sólidos orales, con fármacos que requieran para su efecto terapéutico de una concentración estable y precisa, por tener un margen terapéutico estrecho;
- b) Los medicamentos empleados para enfermedades graves;
- c) Los medicamentos de los cuáles se tenga conocimiento, por reportes previos, que tienen problemas de biodisponibilidad, como es el caso cuando se presentan una pobre absorción; un efecto de primer paso acentuado, metabolismo hepático mayor del 70%; eliminación presistémica; ventana de absorción y cinética no lineal;
- d) Los medicamentos que presenten propiedades fisicoquímicas adversas, como baja solubilidad, inestabilidad y otras similares;
- e) Los medicamentos que tengan una forma farmacéutica de liberación modificada;
- f) Los medicamentos que presenten una proporción elevada de excipientes respecto del principio activo;
- g) Los medicamentos que sean de administración tópica para efecto sistémico, como supositorios, parches transdérmicos, geles de aplicación en mucosas y otros similares;
- h) Las combinaciones fijas de principios activos para acción sistémica.
- i) Los medicamentos que sean de administración tópica de efecto no sistémico, cuya absorción sea riesgosa, los cuáles deberán demostrar mediante un estudio de biodisponibilidad;
- j) Los antibióticos en presentación sólida con vía de administración oral, que además de la prueba de bioequivalencia deberán realizar, como parte de las pruebas de control de calidad, un estudio de concentración mínima inhibitoria. (11)

Dentro de este catálogo se ha incluido a la amoxicilina en forma farmacéutica de suspensión oral y cápsula.

3.2 ENFERMEDADES INFECCIOSAS CAUSADAS POR MICROORGANISMOS

Las enfermedades infecciosas han causado la muerte de millones de seres humanos a lo largo de la historia de la humanidad. Con el descubrimiento de la penicilina en el año de 1928 se da inicio a la llamada era antibiótica en la medicina y a una serie de investigaciones, en búsqueda de nuevos y mejores sustancias que tuvieran efecto sobre enfermedades infecciosas o sobre bacterias que presentaran resistencia a algunos antibióticos. Muchos de ellos con ventajas específicas que los hacen ser los fármacos más indicados durante la terapia (12).

En México los datos estadísticos de mortalidad proporcionados por la Secretaría de Salud (ver tabla 1), muestran que las enfermedades respiratorias (influenza y neumonía), y las infecciosas intestinales se encuentran dentro de los primeros 15 lugares. El tratamiento de elección para controlar estas enfermedades siguen siendo las penicilinas, y dentro de este grupo de fármacos se encuentra la amoxicilina, la cual es objeto de estudio en esta tesis; con un amplio espectro de acción (ver tabla 2) y que suele ser el primer medicamento de prescripción.

GENERALIDADES

Tabla 1. Datos estadísticos de mortalidad en México, 1999, SSA (1)

No. de Orden	Causa	Defunciones	Tasa / 100 000 habitantes
1	Enfermedades del corazón	69 278	70.6
2	Tumores malignos	53 662	54.7
3	Diabetes mellitus	45 632	46.5
4	Accidentes	35 690	36.4
5	Enfermedades del hígado	27 040	27.6
6	Enfermedades cerebro vasculares	25 836	26.3
7	Afecciones originadas en el período perinatal	19 268	19.6
8	Influenza y neumonía	14 068	14.3
9	Agresiones (homicidio)	12 249	12.5
10	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	11 319	11.5
11	Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	9 776	10
12	Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	9 714	9.9
13	Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma	7 840	8.0
14	Insuficiencia renal	7 807	8.0
15	Enfermedades infecciosas intestinales	5 622	5.7
16	Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA)	4 204	4.3
17	Anemias	3 581	3.7

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. Espectro de acción de la amoxicilina. (12)

Organismo	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Bacterias Gram-positivas	
<i>Staphylococcus aureus</i> (no penicilinas)	0.03
<i>Streptococcus pyogenes</i> (Grupo A)	≤ 0.01
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.015
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (relativamente resistentes)	0.1-1.0
<i>Streptococci</i> , Grupo B	0.06
<i>Streptococci</i> , Grupo C	0.015-0.1
<i>Streptococci</i> , Grupo G	0.02-0.5
<i>Streptococcus viridans</i>	0.01
<i>Enterococcus faecalis</i>	2.0
<i>Enterococcus faecium</i>	2.0-9.0
<i>Streptococcus bovis</i> (Grupo D)	0.024
<i>Bacillus anthracis</i>	0.015
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.062
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.1
<i>Clostridium tetani</i>	0.06
<i>Clostridium perfringens</i>	0.06-0.25
<i>Actinomyces israelii</i>	0.05
Bacterias Gram-negativas	
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.03
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> :	
a) cepas sensibles	0.007
b) cepas relativamente resistentes	0.125-2.0
c) cepas productoras de penicilinas	2.0 \geq 250
<i>Haemophilus influenzae</i>	1.0
<i>Bordetella pertussis</i>	0.5
<i>Brucella abortus</i>	6.0
<i>Salmonella typhi</i> 4.0	16.0
<i>Shigella</i> spp.	64.0
<i>Escherichia coli</i>	32.0
<i>Proteus mirabilis</i>	≥ 32.0
<i>Bacteroides fragilis</i>	0.1-0.5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2.1 ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL SISTEMA RESPIRATORIO

El sistema respiratorio para su estudio se divide en dos partes: el sistema respiratorio superior (nariz, garganta, oído medio y las trompas de Eustaquio) y el sistema respiratorio inferior (laringe, traquea, bronquios y alvéolos) (12). El sistema respiratorio superior es el que se ve más afectado a las infecciones por ser la primera vía de acceso expuesta a los patógenos presentes en el aire contaminado.

Las principales bacterias y virus que atacan el sistema respiratorio superior son las siguientes: *Streptococcus pyogenes* (faringitis), *H.influenzae* (laringitis), *S.pneumoniae* (sinusitis, otitis), rinovirus (influenza), *Branhamella catarrhalis* (otitis media) y *S.aureus* (otitis media). El tratamiento de elección acostumbrado es una penicilina de amplio espectro como la amoxicilina y en otros casos las cefalosporinas. (13).

El sistema respiratorio inferior puede ser infectado por las mismas bacterias y virus que afectan el tracto superior. Cuando son afectados los bronquios se produce la bronquitis y su causante principal es el *Mycoplasma pneumoniae*, ciertos virus y factores ambientales como el humo del cigarro. La irritación aguda provocada por la bronquitis es debida a *H.influenzae* por lo que el antibiótico recomendado puede ser trimetropim, ampicilina o amoxicilina y tetraciclina. (13).

La neumonía es una de las enfermedades de alto nivel de mortalidad en México, como lo vimos anteriormente y es provocada fundamentalmente por los patógenos *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophilla* y *Micoplasma pneumoniae*. De acuerdo al microorganismo causal está en función la elección del antibiótico, las penicilinas son los medicamentos más usados y sobre todo aquellas que tienen un amplio espectro como son la amoxicilina y la ampicilina. (12, 13)

3.2.2 ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL APARATO DIGESTIVO

El aparato digestivo para su estudio se puede dividir en dos grupos principales de órganos: el tracto gastrointestinal (boca, faringe, garganta, esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso) y el grupo de órganos anexos que consta de dientes, lengua, glándulas salivales, hígado, vesícula biliar y páncreas. Con excepción de los dientes y la lengua, los órganos anexos se sitúan fuera del tracto gastrointestinal y producen secreciones.

Las enfermedades infecciosas del aparato digestivo son el resultado de la ingestión de alimentos o agua que contienen microorganismos o sus toxinas. (12, 14)

Las enfermedades infecciosas de la cavidad oral son provocadas por bacterias aerobias y anaerobias, como los siguientes géneros: *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Actinobacillus*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus* y *Capnocytophaga*; que llegan a producir caries, pulpitis, absceso periapical, gingivitis, periodontitis, osteitis e infección de los espacios aponeuróticos. Las más frecuentes llegan a ser la gingivitis crónica y la periodontitis del adulto. Entre los múltiples fármacos indicados en la periodontitis y otras infecciones mixtas de la cavidad oral destacan: penicilina, metronidazol, clindamicina, minociclina, clartromicina, doxiciclina, amoxicilina y amoxicilina-ácido clavulánico. (15)

En el caso de infección del estómago, *Salmonella typhi* es la causante principal de la diarrea bacteriana y se puede presentar en 3 formas: 1) fiebre entérica (fiebre tifoidea y paratifoidea); 2) gastroenteritis aguda y 3) infecciones focales extraintestinales. Otra de las enfermedades de este sistema es causada por la bacteria *Shigella*. Los fármacos de elección para el tratamiento suelen ser ampicilina, amoxicilina y el trimetoprim-sulfametoxazol. (12,

3.2.3 ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL APARATO URINARIO

El aparato urinario consta de dos riñones, dos uréteres, una vejiga y una uretra. La mayor parte de las enfermedades son del tipo oportunista y suelen ser causa de inflamación del tejido afectado (cistitis es de la vejiga urinaria; pielonefritis de uno a ambos riñones, glomerulonefritis de los glomérulos renales). Los microorganismos causantes son la bacteria *Escherichia coli* que ocupa un 80% de la invasión junto con otras bacterias gramnegativas (*Klebsiella pneumoniae* y especies de *Proteus*), así como cocos gram positivos (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus epidermidis*). (12, 14)

3.3 AMOXICILINA

3.3.1 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS

La amoxicilina (ver figura 3) es una penicilina semisintética con propiedades bactericidas de amplio espectro principalmente para organismos Gram positivo y Gram negativo del tipo patógeno. Su nombre químico es: ácido [[2S-[2 α , 5 α , 6 β (S*)]]-6-[[amino (4-hidroxifenil)acetil] amino]-3,3 -dimetil-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0]heptano-2-carboxílico]. Es un polvo completamente blanco.

Es soluble en (mg/mL): agua 4.0, metanol 7.5, etanol absoluto 3.4. Insoluble en hexano, benceno, acetato de etilo y acetonitrilo.

Sus máximos de absorbancia en UV son: 230 y 274 nm (ϵ 10850, 1400) en etanol, 229 y 272 nm (ϵ 9500, 1080) en HCl 0.1 N, 248 y 291 (ϵ 2200, 3000) en KOH 0.1 N. (16)

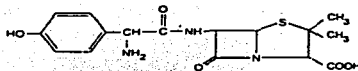


Figura 3. Estructura química de la amoxicilina

3.3.2 INDICACIONES TERAPÉUTICAS

Esta indicada en el tratamiento de infecciones bacterianas como: Infecciones agudas y crónicas de vías respiratorias superiores e inferiores (otitis media, sinusitis, faringoamigdalitis, exacerbaciones agudas de bronquitis crónica y neumonía), infecciones gastrointestinales (fiebre tifoidea y paratifoidea), infecciones genitourinarias (cistitis, uretritis, pielonefritis), infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones de vías biliares, gonorrea, meningitis, infecciones dentales, tratamiento de erradicación de *H. pylori*.⁽²⁾

3.3.3 FARMACODINÁMIA

El grupo farmacofórico de las penicilinas es el ácido 6-aminopenicilánico, constituido por un anillo β -lactámico-tiazolidínica, la cual se une a una cadena lateral variable. Es susceptible a la acción de beta-lactamasas. Su efecto antibacteriano se produce por que impide la síntesis de la pared celular al inhibir la transpeptidasa, enzima de la membrana bacteriana. Esta acción impide el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglucano, las cuales dan fuerza y rigidez a la pared celular. También bloquea la división y el crecimiento celular, y con frecuencia se produce alargamiento y lisis en las bacterias susceptibles. En la tabla 2 se encuentra el espectro de acción de la amoxicilina. (17, 2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.3.4 FARMACOCINÉTICA

Absorción: La amoxicilina es estable en el jugo gástrico, y entre el 75% y 90% de la dosis oral se absorbe por el tracto gastrointestinal. La presencia de alimentos no disminuye la absorción en forma significativa, por lo que se prefiere su uso por la vía oral. Las concentraciones plasmáticas máximas de amoxicilina se presentan aproximadamente a las 2 horas y son 2 veces y media superiores a las de ampicilina después de la administración oral de la misma dosis; su valor promedio es de 4 $\mu\text{g/mL}$ en dosis de 250 mg y para la dosis de 500 mg es de 8.3 $\mu\text{g/mL}$. (6)

Distribución: Aproximadamente el 20% de la amoxicilina se une a proteínas plasmáticas, se distribuye en primer término en el líquido extracelular, sin llegar al cerebro ni al líquido cefalorraquídeo a menos que se encuentren inflamadas las meninges.

Eliminación: Se elimina principalmente por el túbulo renal, aproximadamente entre el 50% y 80% de la dosis se recupera en orina sin cambio durante las 6 primeras horas de la administración, mientras que un 10% es metabolizado como ácido peniciloico inactivo. También se excreta en pequeñas cantidades por heces. Su tiempo de vida media es aproximadamente de 1 hora, mientras que en pacientes con daño renal llega a ser hasta 8 a 16 horas por lo que es necesario un ajuste de dosis (ver tabla 3). (2)

Tabla 3. Datos farmacocinéticos de la amoxicilina (6, 26)

Disponibilidad (oral) %	Excreción urinaria (%)	Unión a proteínas (%)	Depuración ($\text{mL}/\text{min} \cdot \text{kg}$)	Volumen de distribución (L/kg)
93 \pm 10	86 \pm 8	20	3-5	0.2-0.4

3.3.5 CONTRAINDICACIONES

Hipersensibilidad a la penicilina, cefalosporinas y demás betalactámicos. (2)

3.3.6 REACCIONES ADVERSAS

Gastrointestinales: náusea, vómito y diarrea. En raras ocasiones se han reportado candidiasis intestinal y colitis asociada al antibiótico.

Hematológicos: rara vez se ha reportado leucopenia reversible, trombocitopenia reversible y anemia hemolítica. También se ha reportado ocasionalmente prolongación del tiempo de protrombina.

Hepáticas: aumentos moderados de AST y/o ALT, muy raramente se ha informado de algún caso de hepatitis e ictericia colestática.

Sistema nervioso central: Rara vez se han observado efectos como hipercinesia, mareos y convulsiones, estas últimas llegan a presentarse en pacientes con insuficiencia renal o en aquellos pacientes tratados con dosis altas. (2)

3.3.7 INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS

El probenecid prolonga la permanencia de la amoxicilina en el organismo por competencia en el proceso de secreción tubular activa a nivel renal, dando como resultado niveles más altos en sangre. La amoxicilina disminuye la eficacia de los anticonceptivos orales. Su uso junto con alopurinol puede incrementar la probabilidad de reacciones alérgicas cutáneas. En el uso concomitante con anticoagulantes se debe realizar un seguimiento apropiado de la prolongación del tiempo de protrombina. (2,6)

3.3.8 SOBREDOSIFICACIÓN

En caso de sobredosis la amoxicilina se elimina por la circulación con una hemodiálisis, para controlar las reacciones gastrointestinales se debe tratar sintomáticamente prestando atención al equilibrio hídrico y electrolítico. (2)

3.3.9 DOSIS

Adultos y niños de más de 40 kg:

500 mg 3 veces al día ó 1 g, 2 ó 3 veces al día. La dosis oral máxima recomendada es de 6 g/día en dosis equivalentes, 3 veces al día.

Niños de menos de 40 kg:

25-50 mg/kg día en dosis equivalentes, la dosis máxima recomendada es de 150 mg/kg/día en dosis equivalente. (2)

3.3.10 FORMAS FARMACÉUTICAS

Esta disponible en cápsulas y tabletas de 250 y 500 mg, en suspensión de 125 y 250 mg/ 5 mL. (2)

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CUANTIFICAR AMOXICILINA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

Se ha visto que la determinación de este principio activo en formas farmacéuticas es principalmente por CLAR, ayudando a separar la amoxicilina de otras sustancias encontradas en los fluidos biológicos y así poder cuantificar con especificidad y sensibilidad. Para cuantificar la amoxicilina una vez separada, los métodos usados son fluorometría, espectrofotometría o espectrofotometría derivativa principalmente.

W.J.J. Krauwinkel, N.J. Volkers-Kamermans y J. Van Zijteveld (1993) realizaron la determinación de amoxicilina en plasma utilizando CLAR con las siguientes condiciones analíticas: columna de 5 μm Chromspher C_{18} de 250x4.6mm I.D.; precolumna $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ de 4mm x 6 mm I.D.; fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos: metanol (80: 20) a pH 7.6; flujo de 1 mL/min; temperatura de 30°C; detector de UV a 234 nm. Se usó una extracción sólido-líquido para las muestras de plasma con ayuda de cartuchos C_8 AASP. El método resultó ser lineal entre 0.35 y 21 $\mu\text{g/mL}$, con un coeficiente de correlación de 0.99 (18).

J. Van Zijteveld, E.J. Van Hoogdalem (1999) determinaron amoxicilina en muestras de plasma mediante un estudio de CLAR bajo las siguientes condiciones: se utilizó una técnica de intercambio de columnas, en donde la columna usada para el principio activo fue de 5 μm Chromspher C_{18} 250x4.6 mm I.D. mientras que se utilizaron para separar el principio activo de las sustancias del plasma (se inyectaban 10 μL): una pre-columna con tamaño de partícula 5 μm 10x3 mm y una columna con tamaño de partícula 5 μm 250x4.6 mm; una válvula de intercambio; la fase móvil estaba formada por solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M:acetonitrilo (85.5:14.5) a pH 7.5; temperatura de 35°C; el detector usado es de UV a 234 nm. (19)

Claude Martín, Marie Noelle Mallet, entre otros autores determinaron amoxicilina y ácido clavulánico en tejidos y plasma, administrados en combinación. Las condiciones de CLAR que siguieron para cuantificar la amoxicilina en plasma fueron: una precolumna 5 μm Lichrospher RP_{18} de 25x 4mm D.I.; columna 5 μm Lichrospher RP_{18} de 125x 4mm D.I.; fase móvil solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M:acetonitrilo (97:3) a pH 6.8; flujo de 1.0 mL/min; detector de UV a 225 nm. Se realizó una extracción líquido-líquido (acetonitrilo y diclorometano); se inyectó 50 μL de la fase acuosa. (20)



4.0 PARTE EXPERIMENTAL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.0 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 CONDICIONES PREVIAS AL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA

El estudio consistió de dos fases:

- I. Optimización y validación del método analítico
- II. Estudio de biodisponibilidad comparativa

Los productos utilizados en el estudio fueron:

- Medicamento de referencia
Amoxil cápsulas 500 mg Smith Kline Beecham
Lote 003HB330
- Medicamento de prueba
Amoxicilina cápsulas 500 mg
Lote 106038

Los reactivos utilizados fueron:

Diclorometano HPLC, Prolabo.

Ácido o-fosfórico, Merck.

Fosfato dibásico de sodio anhidro, J. T. Baker.

Acetonitrilo HPLC, J.T. Baker.

Metanol HPLC, J. T. Baker.

Amoxicilina USP (estándar de referencia) lote I.

Agua HPLC obtenida con equipo Milli Q-Waters.

Equipo:

Agitador vórtex thermolyne Maxi Mix II.

Balanza analítica Ohaus Standard Analytical.

Sonificador Cole-Palmer 8890.

Sistema de filtración Millipore.

Membranas para filtración Millipore HLB universales de nylon de 0.45 μ .

Potenciómetro OAKTON pH 1000 series.

Centrífuga Maratón 23 KM.

Centrífuga Sigma 3K30.

Equipo cromatográfico:

Bomba. Cuaternaria con desgasificador modelo 600 Controlled, Waters.

Integrador. Paquete computacional Millennium 32, Waters.

Detector. UV modelo 2487, Waters.

Automuestreador. Inyector automático modelo 717 plus, Waters.

Preparación de soluciones:

Solución amortiguadora 0.02M de fosfato de sodio pH 7. Pesar 2.83 g de fosfato dibásico de sodio, transferirlos a un matraz volumétrico de 2 L, disolver y llevar a volumen con agua desionizada, ajustar el pH a 7.0 con ácido fosfórico concentrado.

Soluciones estándar:

Solución A. Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg de amoxicilina USP, transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y llevar a volumen con solución agua:metanol, 80:20 Esta solución contiene 200 μ g/mL de amoxicilina.

Solución B. Transferir cuantitativamente 10 mL de la solución A de amoxicilina (200 μ g/mL) a un matraz volumétrico de 100 mL. Llevar a volumen con solución agua:metanol, 80:20. Esta solución contiene 20 μ g/mL de amoxicilina

Para preparar la curva de calibración y los puntos de control de calidad de amoxicilina, se ocuparon las soluciones A y B de amoxicilina, añadiendo las siguientes alícuotas a 0.5 mL de plasma a fin de obtener las concentraciones deseadas (ver tabla 4).

Tabla 4. Curva de calibración de amoxicilina.

Matraz	μL de amoxicilina (solución B)	μL de amoxicilina (solución A)	Concentración amoxicilina (μg/mL)
1	5	-	0.2
2	10	-	0.4
3	15	-	0.6
4	25	-	1
5	40	-	1.6*
6	50	-	2
7	-	10	4
8	-	20	8*
9	-	25	10
10	-	35	14
11	-	45	18*
12	-	50	20

Agitación en vórtex.

*Puntos Control

4.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

El método para cuantificar amoxicilina en plasma se basó en el trabajo de Claude Martín y colaboradores (20).

4.2.1 SELECCIÓN DEL DETECTOR

Con la finalidad de evaluar el tipo de detector más adecuado para el análisis, se utilizó una fase móvil constituida por una solución amortiguadora de fosfatos 2 mM a pH 7.0 con acetonitrilo (93:7 v/v) y un flujo de 1 mL/min.

Las condiciones de detección fueron las siguientes:

1. Para el detector electroquímico se utilizó un potencial de +0.66 V.
2. Detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 255 nm y una longitud de onda de emisión de 400 nm (21).
3. Detector de UV a una longitud de onda de 230 nm (20).

4.2.2 SELECCIÓN DE LA COLUMNA

Se probaron 3 columnas cromatográficas de características semejantes a la empleada por Claude Martín. Las columnas se mencionan a continuación:

- Hypersil ODS 150 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5µm, 10% carga de carbono.
- Nucleosil 1203 C₁₈ 150 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5µm, 25% carga de carbono.
- Symetry shield RP₁₈ 150 x 3.9 mm, tamaño de partícula 5µm, 17% carga de carbono.

4.2.3 OPTIMIZACIÓN DE LA FASE MÓVIL

Se evaluó una fase móvil a base de solución amortiguadora de fosfatos y pH 7.0 con acetonitrilo; modificando la proporción de los componentes y la concentración de la solución amortiguadora, de tal manera que nos permitiese lograr una mejor respuesta y resolución con respecto a cualquier posible interferencia.

4.2.4 SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Se probaron 2 métodos de extracción: uno sólido-líquido y el otro líquido-líquido.

En el método de extracción sólido-líquido se usaron cartuchos Bond elut y Oasis, la solución de lavado fue metanol:agua (85:15), la evaporación se llevo a cabo a 55-60 °C con N₂, finalmente se reconstituye con solución amortiguadora 0.02 M y pH 7.0 de fosfatos.

En la extracción líquido-líquido se usaron acetonitrilo y diclorometano, una vez separado el compuesto en la fase acuosa, está se inyecta directamente al cromatógrafo (18).

4.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR AMOXICILINA EN PLASMA

Con el propósito de comprobar que el método analítico cumple con el propósito para el que fue diseñado, se valida según la NOM-177-SSA1-1998 en el capítulo 9 de "Criterios y requisitos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia" (3). Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

4.3.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Se realizaron en un día 3 curvas patrón independientes en plasma, con un intervalo de concentraciones de 0.4-20.0 µg/mL. Las muestras se procesaron conforme al método de extracción y se inyectaron directamente en el cromatógrafo.

De los cromatogramas correspondientes a cada punto de la curva patrón, se obtienen las alturas de los picos de amoxicilina. Esta respuesta se grafica contra su concentración y con ayuda de un ajuste por mínimos cuadrados se calcula el dato de linealidad, en donde el coeficiente de correlación fue $(r) \geq 0.99$, además de obtener los valores de la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) para cada curva.

4.3.2 PRECISIÓN

La precisión del método se determinó por medio de los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad. Se usaron 3 concentraciones diferentes a las de la curva patrón pero dentro del rango establecido: 1.6, 8.0 y 18.0 µg/ml conocidos como control bajo, medio y alto respectivamente.

La repetibilidad se llevó a cabo en un mismo día, analizando por quintuplicado las 3 concentraciones anteriores, mientras que para la reproducibilidad se analizaron los 3 controles por duplicado por un período de 3 días. Para las dos evaluaciones el coeficiente

de variación de las concentraciones recuperadas para cada nivel de concentración no debe ser mayor del 15%.

4.3.3 EXACTITUD

Se evaluó como la desviación absoluta (% de desviación absoluta) 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), utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Desviación absoluta} = \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración promedio recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \times 100$$

El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración debe estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

4.3.4 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

La sensibilidad del método se determinó como la concentración mínima cuantificable. El límite de cuantificación fue la concentración más baja del intervalo de trabajo cuyo valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal (cantidad adicionada) con un coeficiente de variación no mayor al 20%. Se preparó por quintuplicado la concentración más baja del intervalo de trabajo.

4.3.5 LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección fue determinado como la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica es tres veces mayor que el nivel de ruido.

4.3.6 ESTABILIDAD

El estudio de estabilidad tiene como función determinar 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 o concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica.

4.3.6.1 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A TEMPERATURA AMBIENTE

Se prepararon por duplicado muestras en plasma de amoxicilina de concentración conocida (1.6, 8 y 18 $\mu\text{g/mL}$), se analizaron y almacenaron a la temperatura ambiente del laboratorio durante 4 y 8 horas. Para la cuantificación del fármaco en los diferentes tiempos se procesaron las muestras como lo indica el método validado, desde su extracción hasta la inyección en el cromatógrafo. El valor de la desviación absoluta para cada concentración a los diferentes tiempos no debe ser mayor al 15% con respecto al valor original.

4.3.6.2 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN REFRIGERACIÓN

Se prepararon por duplicado muestras en plasma de amoxicilina de concentración conocida (1.6, 8 y 18 $\mu\text{g/mL}$), se analizaron y almacenaron a 5°C durante 16 y 24 horas, en cada tiempo las muestras se procesaron y se inyectaron en el cromatógrafo. El valor de la desviación absoluta para cada concentración a los diferentes tiempos, no debe ser mayor al 15% con respecto al valor original.

4.3.6.3 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN CONGELACIÓN

Se prepararon por triplicado muestras en plasma de amoxicilina de concentración conocida (1.6, 8 y 18 $\mu\text{g/mL}$), se analizaron y almacenaron a una temperatura de -70°C durante 18 y 42 días.

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y cuantificaron una vez transcurrido el tiempo establecido. El valor de la desviación absoluta para cada concentración a los diferentes tiempos no debe ser mayor al 15% con respecto al valor original.

4.3.6.4 CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

La estabilidad de la amoxicilina en plasma bajo ciclos de congelación-descongelación se realizó preparando y analizando por duplicado una serie de concentraciones de amoxicilina de 1.6, 8 y 18 $\mu\text{g/mL}$ lo cual corresponde al tiempo cero. Estas muestras se almacenaron a -70°C por 24 horas y posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente para ser procesadas y cuantificadas, esto corresponde a un ciclo de congelación-descongelación. Las mismas muestras se sometieron a un segundo ciclo de congelación-descongelación. El valor de la desviación absoluta para cada concentración en los diferentes ciclos no debe ser mayor al 15% con respecto al valor original.

4.3.6.5 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA

Para determinar la estabilidad de la muestra procesada se prepararon por duplicado muestras de amoxicilina a niveles de concentración bajo, medio y alto (1.6, 8.0 y 18 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente), estas se someten al procedimiento de extracción establecido, bajo las mismas condiciones en que se analizarán las muestras de los voluntarios y se inyectaron en el cromatógrafo en periodos de tiempo de 0, 13 y 19 horas después de su preparación. El valor de la desviación absoluta para cada concentración a los diferentes tiempos no debe ser mayor al 15% con respecto al valor original.

4.3.7 SELECTIVIDAD

La selectividad del método fue determinada analizando muestras blanco de la matriz biológica (plasma) proveniente de cada voluntario y muestras de plasma que contenían

fármacos de uso común (heparina, ácido acetil salicílico y paracetamol). El método se evalúa contra posibles interferencias en los tiempos de retención de la amoxicilina.

4.3.8 RECOBRO

Se obtuvo como un porcentaje de amoxicilina recuperada después de la extracción de las muestras de la matriz biológica, se comparó la altura del pico de la amoxicilina adicionada al plasma, contra la de un estándar no extraído (estándar en fase móvil).

4.4. ESTUDIO PRELIMINAR DE BIOEQUIVALENCIA DE AMOXICILINA (PROTOCOLO CLÍNICO)

Previo al inicio de la fase clínica, el laboratorio patrocinador evaluó la calidad farmacéutica de los productos en estudio, vigilando sobre todo las pruebas de uniformidad de contenido y valoración de acuerdo a lo que establece la NOM-177-SSA1-1998 en su sección 6.0 de Criterios y Requisitos generales para las pruebas.

La fase clínica del estudio fue realizada en la Unidad de Farmacología Clínica del Hospital Español de México.

4.4.1 OBJETIVO DEL ESTUDIO

Comparar a través de un estudio de bioequivalencia, dos formulaciones orales con amoxicilina como principio activo.

4.4.2 TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO

Se seleccionaron 12 voluntarios clínicamente sanos, 6 hombres y 6 mujeres, los cuáles se asignaron al azar de cuerdo a un diseño cruzado 2 x 2. A los mismos, se les administro una dosis única de 500 mg de amoxicilina por vía oral y en condiciones de ayuno.

En un primer periodo se administro a los sujetos de un grupo el medicamento de referencia (A) y a los sujetos del otro grupo se les administro simultáneamente el medicamento de prueba (B). Transcurrió un periodo de lavado de siete días y en un segundo periodo se administro a los sujetos del primer grupo el medicamento de prueba (B) y a los del segundo grupo el medicamento innovador (A), también simultáneamente. En la tabla 5 se describe la asignación de voluntarios.

Tabla 5. Asignación de voluntarios en un diseño cruzado.

SEXO	No. VOLUNTARIO	MEDICAMENTO ADMINISTRADO EN PERIODO I	PERIODO DE LAVADO	MEDICAMENTO ADMINISTRADO EN PERIODO II	SECUENCIA		
MASCULINO	1	A		PERIODO DE LAVADO	B	AB	
	2	B			A	BA	
	3	A			B	AB	
	4	B			A	BA	
	5	A			B	AB	
	6	B			A	BA	
FEMENINO	7	A			PERIODO DE LAVADO	B	AB
	8	B				A	BA
	9	A				B	AB
	10	B				A	BA
	11	A				B	AB
	12	B	A			BA	

4.4.3 SELECCIÓN DE VOLUNTARIOS

Cumpliendo con los lineamientos que establece el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, todos los sujetos participaron de manera voluntaria en el estudio, conociendo los fines y naturaleza del fármaco, así mismo firmaron una carta de aceptación y consentimiento.

El estado de salud de los voluntarios se determinó mediante un historial clínico, pruebas de gabinete, pruebas de laboratorio y detección de drogas de abuso, así como pruebas de embarazo. Los exámenes de laboratorio fueron los siguientes:

- Biometría hemática completa: hemoglobina, hematocrito, cuenta total de glóbulos blancos con diferencial y cuenta de plaquetas.
- Química sanguínea: urea, creatinina, fosfatasa alcalina, TGO (ASAT) y TGP (ALAT), glucosa, colesterol total, triglicéridos, ácido úrico, proteínas totales, albúmina, globulina, deshidrogenasa láctica, bilirrubinas totales, directa e indirecta.
- Marcadores para hepatitis A, B y C.
- Detección de VIH.
- Examen general de orina: densidad, pH, proteínas, cetonas, glucosa y examen microscópico del sedimento.
- Prueba de detección de drogas de abuso (ABUSIGN) al ingreso del estudio.
- Prueba de embarazo.

4.4.4 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Después de un ayuno de 12 horas y en ambos periodos de administración a cada voluntario se le administro una cápsula de 500 mg de amoxicilina junto con 250 mL de agua. Se recolectaron de 8 a 10 mL de sangre venosa antes de cada administración y a las 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.50, 1.75, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 horas después de la dosis. El plasma se separó por centrifugación y se almacenó a -70°C hasta su análisis.

4.5 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS

Las muestras plasmáticas se analizaron utilizando el método analítico optimizado y validado de cromatografía de líquidos de alta resolución.

En un día se analizaban las muestras de tres voluntarios, simultáneamente se analizó una curva patrón, la cual debía cumplir con los criterios establecidos en la validación (con un coeficiente de variación menor del $\pm 15\%$ y un $r \geq 0.99$) y los puntos de control de calidad por duplicado.

4.5.1 PUNTOS DE CONTROL DE CALIDAD

Se prepararon y procesaron puntos de control de calidad a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) por duplicado en el mismo día en que se analizaron las muestras de los voluntarios. Un control era colocado cada trece muestras problema.

Estos controles son los mismos que se usaron durante la evaluación de los parámetros de precisión y exactitud en la validación del método analítico. El criterio para aceptar la corrida era que no más de 2 de cada 6 muestras control de diferente concentración se encontraran fuera del límite $\pm 20\%$ de su concentración nominal respectiva..

4.5.2 CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS

La concentración de amoxicilina en las muestras plasmáticas, se determinó sustituyendo el valor de altura del pico (analizado en el cromatograma) en la ecuación de la recta de la curva de calibración (ajustada por mínimos cuadrados) correspondiente al día de su análisis.

La confiabilidad de cada corrida por día, se evaluó por los resultados de la curva patrón y por los puntos de control de calidad.

Las muestras con concentraciones por debajo del límite de cuantificación no fueron incluidas en los cálculos finales, mientras que aquellas concentraciones por encima del intervalo se diluyeron con plasma y se volvieron a analizar considerando el factor de dilución.

4.5.3 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Se graficaron los perfiles de concentración de amoxicilina contra tiempo para cada voluntario y producto.

De estas gráficas se obtuvieron los siguientes parámetros farmacocinéticos:

- El área bajo la curva de concentración plasmática de tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo (ABC_{0-t}) por el método del trapecioide.
- El área bajo la curva de concentración plasmática de tiempo cero hasta el tiempo infinito ($ABC_{0-\infty}$) se determina sumando el ABC_{0-t} con el cociente del último dato de concentración plasmática medido y la pendiente terminal beta.
- La concentración plasmática máxima ($C_{máx}$) y el tiempo en el cual se alcanza ($t_{máx}$) se obtienen directamente de la gráfica de concentración plasmática contra tiempo.
- El tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$) se obtiene a partir de la pendiente de la porción lineal terminal de la gráfica en escala semilogarítmica, de la concentración plasmática con respecto al tiempo.

4.5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para demostrar la bioequivalencia entre los productos evaluados, se compararon los parámetros farmacocinéticos en escala aritmética y transformados logarítmicamente, calculando el intervalo de confianza clásico, el intervalo de Westlake, la prueba de Shuimann y Anderson-Hauck, así como la potencia estadística, para eso se hizo uso del paquete computacional Biopak ® 2.0.

4.6 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se consultaron diversas bibliografías para determinar el tamaño de la muestra (22-25) encontrándose que para estudios de bioequivalencia el tamaño de la muestra por medio de la hipótesis de igualdad dentro de un diseño cruzado 2×2 se calcula con el uso de las siguientes fórmulas:

- $$CV = 100 \times \frac{(2 \sigma^2)^{1/2}}{\mu_R}$$

como $2 \sigma^2 = \text{MSE}$

se tiene que: $\text{CV} = 100 \times (\text{MSE})^{1/2}$

μ_R

y $\mu_R = \mu + F_R$

Conociendo CV se puede calcular η_c

- $\eta_c = [t_{(\alpha/2, 2n-1)} + t_{(\beta, 2n-2)}]^2 \times (\text{CV}/\Delta)^2$

Con η_c se calcula N

- $N = 2 \times \eta_c$

donde:

$\sigma^2 =$ Corresponde a la varianza, que para un diseño cruzado 2×2 en donde el número de voluntarios en ambos periodos es el mismo, $2 \sigma^2 = \text{MSE}$.

MSE = Suma de cuadrados del error en un análisis de ANOVA.

$\mu =$ Promedio general de los datos.

$\mu_R =$ Es la suma del promedio general y el F_R .

$F_R =$ Es la diferencia de promedios de los dos periodos para el medicamento.

CV = Corresponde al coeficiente de variación.

$\alpha =$ Error tipo I = 5% = 0.05.

$\beta =$ Error tipo II = 20% = 0.20.

n = Corresponde al número de voluntarios a los que se les administra un medicamento por periodo de prueba, de acuerdo a un diseño cruzado 2×2 $n = 6$.

$\Delta =$ En un diseño cruzado 2×2 , corresponde a la mínima magnitud del poder del intervalo de 20-80% o significancia estadística $\Delta=20\% = 20$.

N = Tamaño de la muestra de voluntarios requeridos para el estudio de bioequivalencia.



5.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO POR HPLC PARA CUANTIFICAR AMOXICILINA EN PLASMA

El detector seleccionado fue el de UV-Visible Waters 2487 a una longitud de onda de 230 nm, el cual nos permitió observar una menor interferencia entre el pico de amoxicilina con otros picos del plasma y una mejor respuesta.

En la elección de la columna de trabajo, se consideraron los parámetros cromatográficos de tiempo de retención (tr), factor de simetría, resolución y factor de capacidad (k'), con el propósito de obtener una separación y cuantificación adecuados.

Para la elección de la fase móvil, se considero aquella que permitiera mejores tiempos de retención, factor de simetría ≤ 1.5 y resolución ≥ 1.5 . Estos parámetros indican una buena separación, integración y cuantificación de la amoxicilina en las muestras de plasma.

En la tabla 6 se muestran las condiciones cromatográficas finales con las cuales se realizó la validación del método.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas utilizadas.

Detector	UV-Visible Waters 2487
Longitud de onda	230 nm
Columna	Symetry Shield RP18 15 cm x 3.9 mm, tamaño de partícula 5µm
Fase móvil	Solución amortiguadora 2 mM de fosfato de sodio pH 7.0:acetonitrilo (95.5:4.5 v/v)
Velocidad de flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de corrida	7.0 min

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para la selección del método de extracción se considero aquel que ofreciera una mayor recuperación de amoxicilina, menor presencia de otras sustancias y que presentara mayor precisión en los resultados. El método de extracción elegido se describe en la figura 4.

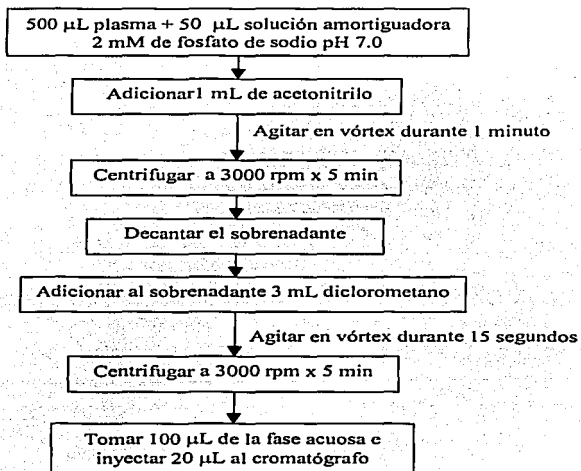


Figura 4. Método para extraer amoxicilina de plasma.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR AMOXICILINA EN PLASMA

5.2.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para cuantificar la concentración de amoxicilina se utilizó la relación de alturas de los picos, porque con ellas se obtuvo un mejor coeficiente de correlación y un menor coeficiente de variación en los resultados. En la tabla 7 se presentan los valores de concentración de amoxicilina para las tres curvas patrón, los valores obtenidos del ajuste por mínimos cuadrados para la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación para cada curva dentro del intervalo de 0.4-20 $\mu\text{g/mL}$. La curva patrón se obtuvo al graficar la concentración contra el promedio de las alturas de cada nivel (gráfica 1). El valor promedio para la pendiente (m) fue de 1560.25 y para la ordenada al origen (b) fue de -33.10.

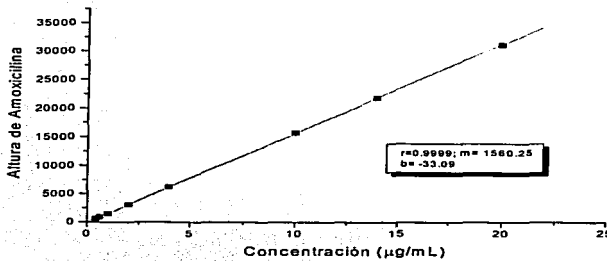
Tabla 7 Resultados del método para cuantificar amoxicilina en plasma.

Curva	Concentraciones de amoxicilina recuperada ($\mu\text{g/mL}$)								Valores de Regresión Lineal		
	0.4	0.6	1	2	4	10	14	20	m	b	r
1	0.42	0.62	1.02	1.95	4.00	9.76	14.38	19.86	1587.99	-71.22	0.9997
2	0.37	0.59	0.94	1.98	4.09	10.35	13.56	20.12	1590.71	-5.75	0.9995
3	0.37	0.58	0.98	1.89	4.05	10.25	14.01	19.87	1502.06	-22.32	0.9999
Prom.	0.39	0.60	0.98	1.94	4.05	10.12	13.98	19.95			
D.E.	0.03	0.02	0.04	0.05	0.05	0.32	0.41	0.15			
C.V.%	7.47	3.49	4.08	1.11	1.11	3.12	2.94	0.74			

El método analítico utilizado, fue lineal en el rango de concentraciones de 0.4 a 20 $\mu\text{g/mL}$ considerando los valores de "r" obtenidos (0.999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



Gráfica 1. Linealidad promedio del método para cuantificar amoxicilina en plasma.

5.2.2 PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO

5.2.2.1 REPETIBILIDAD

Los resultados correspondientes al parámetro de repetibilidad se encuentran en la tabla 8. Para cada punto control (1.6, 8.0 y 18 µg/mL) el coeficiente de variación fue menor que 5.69% y el % de desviación absoluta en los niveles de concentración estudiados fue menor al 4.75%, estos valores están dentro del límite permitido (C.V. < 15%).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 8 Repetibilidad y exactitud del método para cuantificar amoxicilina en plasma.

Muestra	Cantidad recuperada de amoxicilina ($\mu\text{g/mL}$)		
1	1.60	8.07	18.47
2	1.61	8.16	18.03
3	1.50	7.67	17.96
4	1.50	7.55	17.82
5	1.41	7.07	16.05
Promedio	1.52	7.70	17.67
D.E.	0.08	0.44	0.94
% C.V.	5.42	5.69	5.30
Cantidad adicionada	1.60	8.00	18.00
% Desviación absoluta	4.75	3.70	1.86

5.2.2.2 REPRODUCIBILIDAD

La tabla 9 contiene los resultados del parámetro de reproducibilidad, en donde se observa que el coeficiente de variación en los diferentes días de trabajo fue de 4.11 a 6.58%, mientras que el % de desviación absoluta fue menor al 3.75% en las diferentes concentraciones evaluadas, estando dentro del límite permitido (C.V. < 15%).

De esta manera por los resultados del coeficiente de variación para repetibilidad, reproducibilidad y el valor de la desviación absoluta se consideró al método como preciso y exacto.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 9 Reproducibilidad y exactitud del método para cuantificar amoxicilina en plasma.

Día	Réplica número	Cantidad recuperada de amoxicilina ($\mu\text{g/mL}$)		
		1	1	1.50
	2	1.41	7.07	16.05
2	1	1.56	8.40	18.10
	2	1.53	8.27	17.32
3	1	1.60	7.84	17.63
	2	1.64	7.43	17.43
Promedio		1.54	7.76	17.39
D.E.		0.08	0.51	0.71
% C.V.		5.24	6.58	4.11
Cantidad adicionada		1.60	8.00	18.00
% Desviación absoluta		3.75	3.00	3.38

5.2.3 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación encontrado para el método fue de $0.4 \mu\text{g/mL}$. En este nivel de concentración se evaluaron los parámetros de precisión interdía y de exactitud, el primero tuvo un coeficiente de variación de 4.94% y el valor de la desviación absoluta % fue de 20. Este último valor se encuentra en el límite permitido para considerar al método como exacto con un coeficiente de variación no mayor que 20%. Los resultados se encuentran en la tabla 10.

Tabla 10. Límite de cuantificación para la determinación de amoxicilina en plasma.

Concentración Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Cantidad recuperada de Amoxicilina ($\mu\text{g/mL}$)					Promedio	D.E.	% C.V.	% Desv. Abs.
	0.33	0.34	0.31	0.32	0.3				
0.4	0.33	0.34	0.31	0.32	0.3	0.32	0.01	4.94	20

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.4 LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección para el método fue la concentración de 0.2 µg/mL, la cual dio una señal 3 veces mayor a la altura de las señales del ruido.

5.2.5 ESTABILIDAD

5.2.5.1 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A TEMPERATURA AMBIENTE

Los resultados del análisis de las muestras de amoxicilina en plasma almacenadas a temperatura ambiente durante 8 horas (ver tabla 11), presentaron una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor promedio del tiempo cero, por lo que se considera estable el principio activo bajo estas condiciones.

Tabla 11 Estabilidad de amoxicilina a temperatura ambiente.

Replicas	Tiempo 0 horas		
	Control bajo 1.60 (µg/mL)	Control medio 8.00 (µg/mL)	Control alto 18.00 (µg/mL)
1	1.70	8.21	17.99
2	1.70	8.04	18.18
Promedio	1.70	8.13	18.09
Replicas	Tiempo 4 horas		
	Control bajo 1.60 (µg/mL)	Control medio 8.00 (µg/mL)	Control alto 18.00 (µg/mL)
1	1.61	7.92	18.46
2	1.56	7.82	17.49
Promedio	1.59	7.87	17.98
% Desviación absoluta	6.76	3.14	0.61
Replicas	Tiempo 8 horas		
	Control bajo 1.60 (µg/mL)	Control medio 8.00 (µg/mL)	Control alto 18.00 (µg/mL)
1	1.53	7.86	17.18
2	1.47	7.98	16.80
Promedio	1.50	7.92	16.99
% Desviación absoluta	11.76	2.52	6.05

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.5.2 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN REFRIGERACIÓN

En la tabla 12 se observan los resultados para la estabilidad de amoxicilina en plasma bajo condiciones de refrigeración 5°C por 24 horas, en donde los valores encontrados cumplen con el límite del $\pm 15\%$ del valor promedio del tiempo cero, con excepción del control bajo al tiempo de 24 horas, por lo que es recomendable no almacenar las muestras en refrigeración por un día.

Tabla 12 Estabilidad de amoxicilina en refrigeración.

Replicas	Tiempo 0 horas		
	Control bajo 1.60 ($\mu\text{g/mL}$)	Control medio 8.00 ($\mu\text{g/mL}$)	Control alto 18.00 ($\mu\text{g/mL}$)
1	1.70	8.21	17.99
2	1.70	8.04	18.18
Promedio	1.70	8.13	18.09
Tiempo 16 horas			
Replicas	Control bajo 1.60 ($\mu\text{g/mL}$)	Control medio 8.00 ($\mu\text{g/mL}$)	Control alto 18.00 ($\mu\text{g/mL}$)
1	1.64	8.21	18.65
2	1.60	8.06	18.45
Promedio	1.62	8.14	18.55
% Desviación absoluta	4.71	0.12	2.57
Tiempo 24 horas			
Replicas	Control bajo 1.60 ($\mu\text{g/mL}$)	Control medio 8.00 ($\mu\text{g/mL}$)	Control alto 18.00 ($\mu\text{g/mL}$)
1	1.43	7.44	17.43
2	1.42	6.45	17.04
Promedio	1.43	6.95	17.24
% Desviación absoluta	16.18	14.52	4.70

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.5.3 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN CONGELACIÓN

La tabla 13 contiene los resultados para las muestras en condiciones de congelación – 70°C por un tiempo de 42 días, en donde los valores de cada concentración tienen una desviación absoluta menor del 15% y por lo tanto las muestras de amoxicilina bajo estas condiciones son estables.

Tabla 13 Estabilidad de amoxicilina en congelación.

Replicas	Tiempo 0 días		
	Control bajo 1.60 (µg/mL)	Control medio 8.00 (µg/mL)	Control alto 18.00 (µg/mL)
1	1.48	6.97	16.28
2	1.45	7.45	16.99
Promedio	1.47	7.21	16.64
Tiempo 18 días			
Replicas	Control bajo 1.60 (µg/mL)	Control medio 8.00 (µg/mL)	Control alto 18.00 (µg/mL)
1	1.31	7.27	16.85
2	1.33	7.19	17.45
Promedio	1.32	7.23	17.15
% Desviación absoluta	9.90	0.28	3.10
Tiempo 42 días			
Replicas	Control bajo 1.60 (µg/mL)	Control medio 8.00 (µg/mL)	Control alto 18.00 (µg/mL)
1	1.46	7.27	17.47
2	1.53	8.11	16.96
Promedio	1.50	7.69	17.22
% Desviación absoluta	2.05	6.66	3.49

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.5.4 CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

En la tabla 14 se muestran los resultados del análisis de las muestras sometidas a 2 ciclos de congelación-descongelación. Los valores obtenidos entran dentro del límite de $\pm 15\%$ del valor promedio al día cero, por lo que la amoxicilina es estable a -70°C bajo dos ciclos de congelación-descongelación.

Tabla 14 Estabilidad de amoxicilina en ciclos de congelación-descongelación.

Día 0			
Replicas	Control bajo 1.60 ($\mu\text{g/mL}$)	Control medio 8.00 ($\mu\text{g/mL}$)	Control alto 18.00 ($\mu\text{g/mL}$)
1	1.70	8.21	17.99
2	1.70	8.04	18.18
Promedio	1.70	8.13	18.09
1er Ciclo			
Replicas	Control bajo 1.60 ($\mu\text{g/mL}$)	Control medio 8.00 ($\mu\text{g/mL}$)	Control alto 18.00 ($\mu\text{g/mL}$)
1	1.78	8.51	18.62
2	1.53	8.41	18.74
Promedio	1.66	8.46	18.68
% Desviación absoluta	2.65	4.12	3.29
2do Ciclo			
Replicas	Control bajo 1.60 ($\mu\text{g/mL}$)	Control medio 8.00 ($\mu\text{g/mL}$)	Control alto 18.00 ($\mu\text{g/mL}$)
1	1.57	8.01	18.05
2	1.53	8.11	17.66
Promedio	1.55	8.06	17.86
% Desviación absoluta	8.82	0.80	1.27

De acuerdo con los resultados anteriores las muestras plasmáticas de amoxicilina pueden mantenerse estables a temperatura ambiente durante 8 horas y pueden almacenarse por un tiempo no mayor de 24 horas en refrigeración (5°C).

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En congelación (-70°C) pueden almacenarse durante 42 días y son estables durante dos ciclos de congelación-descongelación.

5.2.5.5 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA

Los resultados para la estabilidad de la muestra procesada tienen una desviación absoluta menor del 15% con respecto al valor promedio del tiempo cero (ver tabla 15), por lo que la amoxicilina se mantiene estable en la solución de inyección durante 19 h después de su preparación.

Tabla 15 Estabilidad de la muestra procesada de amoxicilina.

Tiempo 0 horas			
Replicas	Control bajo 1.60 (µg/mL)	Control medio 8.00 (µg/mL)	Control alto 18.00 (µg/mL)
1	1.50	7.78	17.47
2	1.52	7.64	17.55
Promedio	1.51	7.71	17.51
Tiempo 13 horas			
Replicas	Control bajo 1.60 (µg/mL)	Control medio 8.00 (µg/mL)	Control alto 18.00 (µg/mL)
1	1.50	7.78	17.46
2	1.52	7.61	17.26
Promedio	1.51	7.70	17.36
% Desviación absoluta	0.00	0.19	0.86
Tiempo 19 horas			
Replicas	Control bajo 1.60 (µg/mL)	Control medio 8.00 (µg/mL)	Control alto 18.00 (µg/mL)
1	1.35	7.75	17.08
2	1.47	7.42	16.78
Promedio	1.41	7.59	16.93
% Desviación absoluta	6.62	1.62	3.31

5.2.6 SELECTIVIDAD

En la figura 5 se muestran los diferentes cromatogramas obtenidos de muestras de plasma para poder determinar la selectividad del método analítico y cuantificar amoxicilina. De esta manera se demuestra que la presencia de otros fármacos comunes como el ácido acético salicílico, paracetamol y la heparina no causan interferencias en la señal del principio activo en estudio.

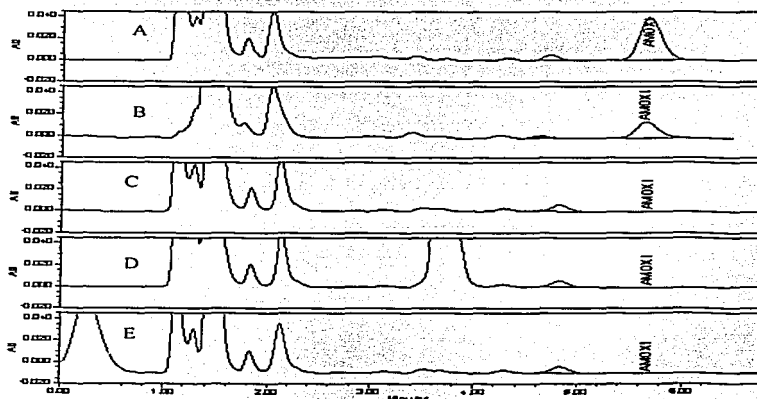


Figura 5. Cromatogramas de amoxicilina en plasma, después de su extracción. (A). Estándar en plasma con 20 $\mu\text{g/mL}$ de amoxicilina. (B). Plasma de un voluntario sano 1.75 horas después de una administración oral de 500 mg de amoxicilina. (C). Plasma añadido con heparina. (D). Plasma añadido con ácido acético salicílico. (E). Plasma añadido con paracetamol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.7 RECOBRO

Durante la validación, el recobro de amoxicilina fue del 95.27 % en promedio, determinado por las concentraciones de 1.6 µg/mL (nivel bajo), 8.0 µg/mL (nivel medio) y 18 µg/mL (nivel alto). Los resultados se presentan en la tabla 16.

Tabla 16 Recobro de amoxicilina en plasma humano.

Concentración de amoxicilina (µg/mL)	Muestras de plasma (Altura del pico de amoxicilina)	Solución estándar (Altura del pico de amoxicilina)	% Recobro
18	25847.32	25743.11	100.05
	25467.69	24718.84	
	25661.98	26476.74	
Promedio	25659.00	25646.23	
8.0	11523.33	11042.68	98.29
	10955.80	10940.96	
	11520.30	12606.91	
Promedio	11333.14	11530.18	
1.6	1941.81	2296.96	87.48
	2026.09	2130.13	
	1892.62	2272.46	
Promedio	1953.51	2233.18	
		Promedio	95.27

5.3 ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE AMOXICILINA

Los resultados correspondientes al control de calidad de las dos formulaciones en estudio se encuentran dentro del intervalo de especificaciones, ver tabla 17.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 17 Control de calidad de las formulaciones.

Nombre de la prueba	Medicamento prueba	Medicamento referencia	Especificación
Identificación	Conforme al estándar	Conforme al estándar	Conforme al estándar
Uniformidad de contenido	100.93% CV 2.10%	100.49% CV 1.95%	85 - 115 % CV ≤ 6.0%
Agua	12.523%	11.931%	No más de 14.5%
Peso promedio	772.89 mg/cap 2.04%	755.10 mg/cap 1.70%	CV ≤ 6.0%
Valoración química	101.15% 505.75 mg/cap	100.60% 503.00 mg/cap	90 - 120 %
Valoración microbiológica	99.95% 499.75 mg/cap	99.68% 498.40 mg/cap	90 - 120 %
Disolución	89.13 %	90.51 %	No menos del 80% (Q)

Con los datos anteriores y una vez validado el método analítico se realizó el estudio de bioequivalencia con 12 voluntarios, de los cuales fueron 6 hombres y 6 mujeres.

En cada corrida se analizaron las muestras correspondientes a tres voluntarios (ambos periodos), una curva de calibración y puntos control de calidad para evaluar la validez de la misma.

Contando al final del estudio con 4 corridas analíticas. En la tabla 18 se presentan los resultados de las curvas de calibración para cada día de análisis.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 18 Seguimiento de las curvas de calibración de amoxicilina.

Concentración nominal (µg/mL)	Concentración Recuperada (µg/mL)				Promedio	D.E.	% C.V.	% Desv. Abs.
	1ra	2da	3ra	4ta				
0.4	0.4	0.42	0.41	0.42	0.41	0.0096	2.32	3.12
0.6	0.66	0.67	0.63	0.61	0.64	0.0275	4.29	7.08
1	1.06	1.08	0.98	1.01	1.03	0.0457	4.43	3.25
2	1.93	2.09	1.95	2.05	2.005	0.0772	3.85	0.25
4	4.03	3.79	3.91	3.9	3.91	0.0981	2.51	2.31
10	9.8	9.87	9.83	9.74	9.81	0.0548	0.56	1.9
14	14.06	13.98	14.61	14.46	14.28	0.3053	2.14	1.98
20	20.06	20.11	19.68	19.83	19.92	0.2012	1.01	0.4
m	1.0003	1.0001	0.9999	1.0001	1.0001			
b	-0.002	0.0008	0.0003	0.0019	0.00025			
r	0.9999	0.9999	0.9993	0.9997	0.9997			

Se puede observar que las 4 curvas de calibración tienen poca variación entre cada una de las concentraciones y que los valores para el % C.V. y el % Desv. Abs. se encuentran dentro de los límites establecidos.

En la tabla 19 se muestran los resultados para los puntos control, los cuales determinan el criterio de aceptación o rechazo de una corrida analítica; observando que la variabilidad entre cada punto se encuentra dentro de los límites permitidos (el $\pm 20\%$ de la concentración nominal respectiva).

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 19 Seguimiento de los puntos de control de calidad para amoxicilina.

Corrida	Control Bajo 1.6 (µg/mL)	Control Medio 8 (µg/mL)	Control Alto 18 (µg/mL)
1	1.54	7.82	16.71
	1.41	7.11	14.50
2	1.52	7.01	15.01
	1.31	*	18.63
3	1.53	8.01	18.68
	1.69	8.03	*
4	1.61	8.18	18.52
	1.48	8.20	17.72
Promedio	1.51	7.77	17.11
D.E.	0.12	0.50	1.76
% C.V.	7.70	6.42	10.27
% Desv. Abs.	5.55	2.93	4.94

* Datos que exceden el 20% del valor nominal

5.4 CONCENTRACIONES PROMEDIO DE AMOXICILINA Y ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Los siguientes resultados corresponden a la cuantificación de los niveles de amoxicilina en plasma, para ambas formulaciones. Los valores promedio de la concentración plasmática de amoxicilina se encuentran en la tabla 20 y se ilustran en la gráfica 2, la gráfica 3 los representa en función logarítmica.

Dentro del Apéndice 1 se encuentran las graficas individuales de cada uno de los 12 voluntarios. En las mismas, se puede apreciar la variabilidad intra e inter individual debida al efecto de factores como la formulación, forma de administración y a los factores biológicos propios de cada individuo.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

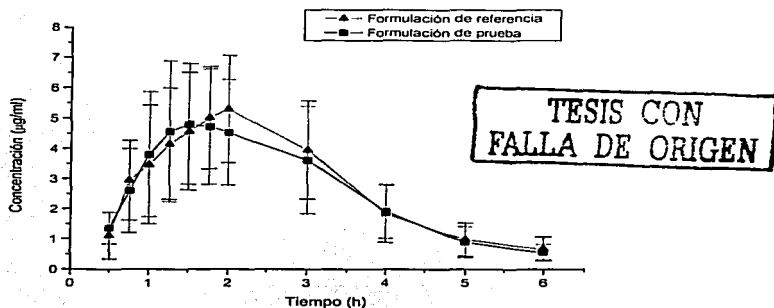
Tabla 20. Concentración plasmática promedio de amoxicilina \pm D.E. después de la administración de ambos productos a los doce voluntarios.

Tiempo (h)	Formulación de referencia (A)	Formulación de prueba (B)
0	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.00
0.25	0.43 \pm 0.0*	N.D.
0.5	1.11 \pm 0.77	1.36 \pm 0.52
0.75	2.01 \pm 1.32	2.60 \pm 1.40
1.0	3.46 \pm 1.97	3.80 \pm 2.07
1.25	4.15 \pm 1.84	4.57 \pm 2.32
1.50	4.57 \pm 1.94	4.81 \pm 1.99
1.75	5.01 \pm 1.68	4.72 \pm 1.90
2.0	5.30 \pm 1.77	4.53 \pm 1.74
3.0	3.95 \pm 1.62	3.61 \pm 1.78
4.0	1.84 \pm 0.95	1.91 \pm 0.89
5.0	0.98 \pm 0.55	0.89 \pm 0.51
6.0	0.68 \pm 0.40	0.56 \pm 0.25

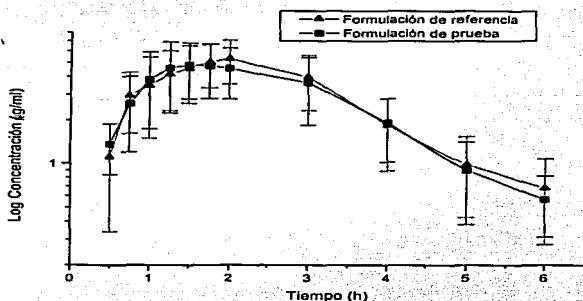
* n = 1

N.D.= no detectable

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



Gráfica 2. Concentración plasmática (promedio de 12 voluntarios) de amoxicilina contra tiempo, después de la administración de una dosis única de 500 mg por vía oral.



Gráfica 3. Logaritmo de la concentración plasmática (promedio de 12 voluntarios) de amoxicilina contra tiempo, después de la administración de una dosis única de 500 mg por vía oral.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los promedios aritméticos de los parámetros farmacocinéticos evaluados para los 12 voluntarios con el medicamento de referencia y el medicamento de prueba se muestran en la tabla 21, observándose que no existe diferencia significativa con los reportados en la literatura. Los resultados individuales se encuentran en el Apéndice II.

Tabla 21 Parámetros farmacocinéticos (promedio de los 12 voluntarios) para las dos formulaciones.

Parámetro farmacocinético (promedio \pm D.E.)	Formulación de referencia (A)	Formulación de prueba (B)
ABC $0 \rightarrow 6$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	15.35 \pm 4.62	14.60 \pm 5.55
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	16.32 \pm 4.97	15.39 \pm 5.80
C _{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5.96 \pm 1.35	5.53 \pm 1.85
T _{max} (h)	2.00 \pm 0.53	1.77 \pm 0.67
t $\frac{1}{2}$ (h)	0.98 \pm 0.16	0.94 \pm 0.13

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Se utilizó el paquete computacional Biopak® 2.0 para llevar a cabo el análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos de las dos formulaciones, los datos estadísticos en escala aritmética y con transformación logarítmica se presentan a continuación en la tabla 22 y tabla 23.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 22. Análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos (escala aritmética).

Parámetro Farmacocinético	Intervalo Clásico	Intervalo Westlake	Prueba Shuirmann	Prueba AndersonHauck	Poder
ABC $0 \rightarrow 6$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	84.60-105.65	86.93-113.06	0.0131	0.0123	0.8742
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	84.30-104.23	86.61-113.39	0.0134	0.0129	0.9057
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	80.74-105.00	83.56-116.44	0.0417	0.0405	0.7679
Tmax (h)	68.47-108.62	73.12-126.88	0.2292	0.2204	0.3420

Tabla 23. Análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos (transformación logarítmica).

Parámetro Farmacocinético	Intervalo Clásico	Intervalo Westlake	Prueba Shuirmann	Prueba AndersonHauck	Poder
Log ABC $0 \rightarrow 6$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	78.72-107.31	81.42-118.58	0.0677	0.0622	0.6455
Log ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	78.75-106.02	81.43-118.57	0.0680	0.0642	0.6837
Log Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	77.72-104.69	80.44-119.56	0.0874	0.0844	0.6819
Log Tmax (h)	68.95-107.16	72.48-127.52	0.2839	0.2735	0.3521

Como se puede observar en la tabla 22, los resultados del análisis estadístico muestran que ambas formulaciones son bioequivalentes al evaluar los parámetros de área bajo la curva y Cmax. Sin embargo, a nivel internacional la decisión sobre la bioequivalencia debe hacerse utilizando los datos transformados logarítmicamente. En la tabla 23 se aprecia que la aplicación de esta transformación da como resultado que ninguno de los medicamentos evaluados cumpla con el intervalo clásico.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

La tendencia en estos datos y el bajo poder de las pruebas (< 0.8), indican poca confiabilidad en los resultados y sugieren que se debe incrementar el número de voluntarios, a fin de concluir con mayor confianza respecto a la bioequivalencia de amoxicilina cápsulas de 500 mg.

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA DETERMINAR EL TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Para la determinación del tamaño de la muestra se utilizan parámetros farmacocinéticos como el área bajo la curva de 0 a 6 y de 0 a infinito, y la concentración plasmática máxima; ya que estos parámetros farmacocinéticos están directamente relacionados con la cantidad de fármaco que se absorbe y con la velocidad a la que lo hace.

En la tabla 24 se observan los valores promedio para cada uno de los periodos del estudio, de los parámetros farmacocinéticos descritos anteriormente.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 24 Parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de los datos de concentración de amoxicilina en plasma.

		C _{máx}		ABC _{0-t}		ABC _{0-inf}	
SECUENCIA	SUJETO	PERIODO I	PERIODO II	PERIODO I	PERIODO II	PERIODO I	PERIODO II
AB	1	8.19	8.24	25.1337	27.40	27.8822	29.1813
AB	3	5.94	4.24	13.2025	11.0225	13.9511	11.5986
AB	5	4.81	4.01	10.7212	12.9187	12.1137	13.6620
AB	7	6.99	7.02	18.4950	17.815	19.3019	18.5613
AB	9	7.72	6.47	22.3837	18.885	23.1007	19.4571
AB	11	4.88	4.56	14.0187	12.9712	14.5966	13.6576
Promedio parcial		6.4217	5.7567	17.3258	16.8354	18.4910	17.6863
BA	2	4.91	3.99	11.8950	10.7487	12.5472	11.3531
BA	4	3.83	6.57	10.3025	15.2287	10.9220	15.8247
BA	6	2.73	4.96	5.0200	11.4525	5.6144	12.5071
BA	8	6.49	5.56	14.8475	14.0112	15.3765	14.8560
BA	10	5.20	4.71	14.3987	11.9937	15.6753	12.6119
BA	12	8.72	7.2	17.7737	16.8375	18.4052	17.7967
Promedio parcial		5.3133	5.9450	12.3729	13.3787	13.0901	14.1582
Promedio del parámetro farmacocinético (μ)		5.7467		14.9782		15.8564	
Residual obtenido en el análisis de varianza (MSE)		0.9540950		4.7661868		4.8295715	

A continuación se muestra un ejemplo de los cálculos a realizar a fin de obtener el tamaño de muestra (N). Se utilizan para ello los valores de concentración plasmática máxima (C_{máx}).

1) Cálculo de CV

$$CV = 100 \times \frac{(2\sigma^2)^{1/2}}{\mu_R}$$

$$\text{como } 2\sigma^2 = \text{MSE}$$

$$CV = 100 \times \frac{(\text{MSE})^{1/2}}{\mu_R}$$

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

$$\text{donde: } \mu_R = \mu + F_R$$

$$F_R = Y_T - Y_R$$

$$Y_T = 1/2 (Y_{2x1} + Y_{1x2})$$

$$Y_{2x1} = 5.7567$$

$$Y_{1x2} = 5.3133$$

$$Y_T = 5.5350$$

$$Y_R = 1/2 (Y_{1x1} + Y_{2x2})$$

$$Y_{1x1} = 6.4217$$

$$Y_{2x2} = 5.4950$$

$$Y_R = 5.9583$$

$$F_R = Y_T - Y_R = -0.4233$$

$$\mu_R = \mu + F_R$$

$$\mu = 5.7467$$

$$\mu_R = 5.7467 + (-0.4233) = 5.3234$$

$$\text{de: } CV = 100 \times \frac{(MSE)^{1/2}}{\mu_R}$$

Se substituye:

$$MSE = 0.954095 \quad \mu_R = 5.3234$$

$$CV = 100 \times \frac{(0.954095)^{1/2}}{5.3234}$$

$$CV = 18.3487$$

2) Cálculo de η_c

$$\eta_c = [t_{(\alpha/2, 2n-1)} + t_{(\beta, 2n-2)}]^2 \times (CV/\Delta)^2$$

$$\alpha = 5\% = 0.05$$

$$\beta = 20\% = 0.20$$

$$\Delta = 20$$

$$n = 6$$

$$CV = 18.3487$$

Las t de tablas se obtienen de la distribución de t la cuál se encuentra en el apéndice IV.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

$$\eta c = [2.2281 + 0.8790]^2 \times (18.3487/ 20)^2$$

$$\eta c = 8.1257$$

3) Cálculo de N

$$N = 2 \times \eta c$$

$$N = 2 \times (8.1257)$$

$$N = 16.2514 \sim 16.0000$$

El número teórico de voluntarios calculado para realizar un estudio de bioequivalencia a partir de los parámetros farmacocinéticos, se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 25 Resultados de la determinación del tamaño de muestra.

PARÁMETRO FARMACOCINÉTICO	NÚMERO TEÓRICO DE VOLUNTARIOS
ABC σ_s	11
ABC σ_{inf}	10
Cmax	16

La concentración plasmática máxima es la que nos proporciona el mayor número de voluntarios debido a la variabilidad mostrada.

Por tal motivo, el número mínimo de voluntarios a utilizar en un estudio de bioequivalencia para las formulaciones evaluadas, es de 16.



6.0 CONCLUSIONES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

63A

6.0 CONCLUSIONES

El método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para la cuantificación de la amoxicilina en las muestras biológicas, fue optimizado y validado. Fue lineal, preciso, exacto y selectivo en el intervalo de concentraciones de 0.4 a 20.0 µg/mL. Las muestras plasmáticas de amoxicilina son estables durante 8 horas a temperatura ambiente, por 16 horas en refrigeración, por 42 días en congelación y durante dos ciclos de congelación-descongelación. La muestra procesada es estable por 19 horas. El método de extracción tiene en promedio un 95.27% de recuperación absoluta del principio activo.

Los tiempos de muestreo propuestos para un estudio de bioequivalencia de amoxicilina cápsulas 500 mg son: 0, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 4, 5 y 6 horas.

De acuerdo a que los valores transformados de las pruebas estadísticas se salen de los límites permitidos y la poca confiabilidad de los resultados se sugiere incrementar el número de voluntarios para establecer la bioequivalencia entre los productos.

Utilizando la prueba de igualdad de hipótesis para determinar el tamaño de muestra, se encontró que el número mínimo de voluntarios necesario para realizar un estudio de bioequivalencia, para estas formulaciones en particular es de 16.



7.0 BIBLIOGRAFÍA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

64A

7.0 BIBLIOGRAFÍA

- (1) INEGI, 1999. SSA.
- (2) Rodríguez Carranza, Rodolfo. Vademécum Académico de Medicamentos, Editorial Mc Graw-Hill, 3ra edición. México. 1999. pp. 57-58.
- (3) Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
- (4) J.M. Aiache, Ote. Biofarmacia. Editorial El Manual Moderno. México. 1983. Cap. 1, 2, 3 y 4.
- (5) Pierre Labaune, Jean. Manual de Farmacocinética. Editorial Masson. España. 1991. pp. 13-49.
- (6) Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Editorial Mc Graw Hill-Interamericana, Vol. 2, 8va edición. México. 1996. pp. 21-48, 1141-1147, 1827.
- (7) Investigación clínica y bioética. Boletín de la Sociedad Española de Farmacología Clínica. Enero-Marzo, no. 29, 1999.
- (8) Arancibia Pessoa, Aquiles. Biodisponibilidad de medicamentos. Editorial Universitaria. Chile. 1992. pp. 25-39
- (9) Food and Drug Administration. Guía para la industria. Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para productos farmacéuticos administrados oralmente-consideraciones generales. Octubre 2000.
- (10) Welling G., Peter. Pharmaceutical bioequivalence. Edit. Marcel Dekker Inc.; New York, USA. 1991. pp.1-21.
- (11) Acuerdo por el que se relacionan las especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables y se determinan las pruebas que deberán aplicárseles. Emitido por la Secretaría de Salud. 1997.
- (12) Tortora. Microbiología. Editorial Iberoamericana, México, 1993. Capítulo 24, 25.

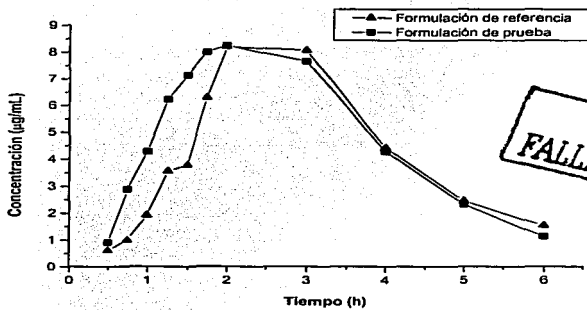
BIBLIOGRAFÍA

- (13) Girdwood, Ronald. *Terapéutica médica*. Edit. El Manual Moderno, México, 1992. pp. 87-93
- (14) T. Shulman y John P. Phair. *Infectología Clínica*. Editorial Interamericana-Mc Graw Hill. México. 1994. Capítulo 17 y 19.
- (15) Ramón Maestre, Juan. Infecciones bacterianas mixtas de la cavidad oral. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2002. 20 (2); 98-101.
- (16) *The Index Merck*. Edit. Merck Co. Inc. USA. 1996. pp. 619.
- (17) F.J. de Juan Moreno. *Uso actual de las penicilinas clásicas*. *Medicina General*. pp. 264-269.
- (18) W.J.J. Krauwinkel, N.J. Volkers-Kamermans y J. Van Zijteveld. *Journal of Chromatography*, 617. 1993. pp. 334-338.
- (19) J. Van Zijteveld y E.J. Van Hoogdaem. *Journal of Chromatography B*, 726. 1999. pp. 169-174.
- (20) Claude Martín, Marie Noelle Mallet, *Otc. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan. 1995. Vol. 39. No. 1. pp. 94-98.
- (21) Mascher H. y C. Kikuta. *Journal of Chromatography*, 506. 1990. pp. 417-421.
- (22) Dieter Hauschke, Meinhard Kieser, *Otc. Statistics in Medicine*. 18, 1999. pp. 93-105
- (23) S.L. Beal. *Biometrics*. 45, Sep. 1989. pp. 969-977.
- (24) Kung-Jon Lui y William G. Cumberland. *Controlled Clinical Trials*. 22, 2001. pp. 373-389.
- (25) Sheng-Chung Chow y Jen Pei-Liu. *Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies*. New York: M. Dekker. 1992. pp. 59-161.
- (26) Moffat, A.C. *Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceutical body fluids, and postmortem material*. Edit. E.G. Clarke, 2da edición, 1986. pp-305

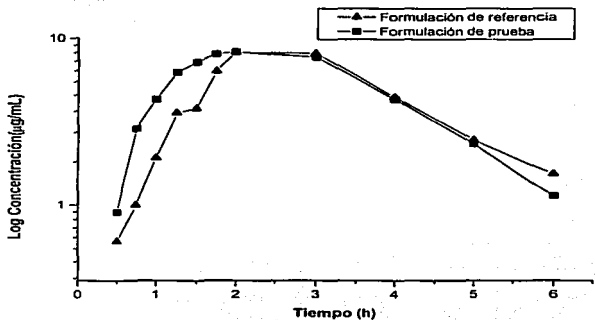
APÉNDICE I

GRÁFICAS DE LOS VOLUNTARIOS

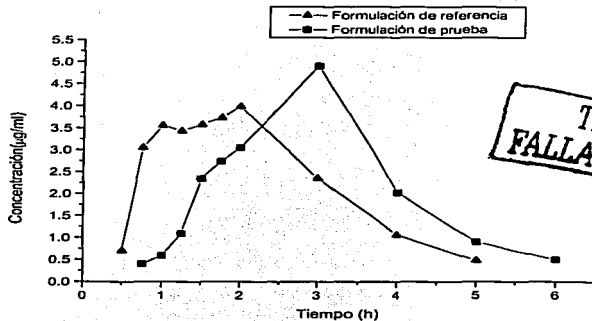
INDIVIDUALES



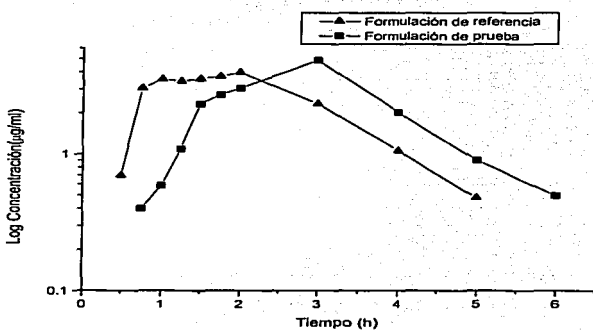
Gráfica 4. Voluntario 1



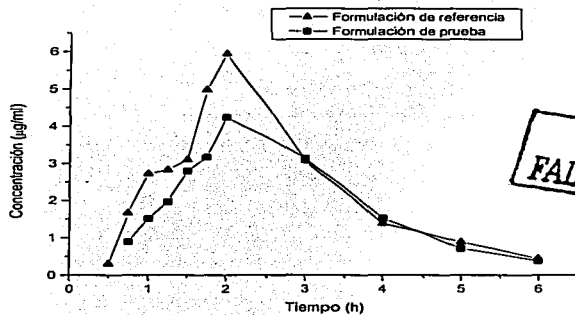
Gráfica 5. Voluntario 1



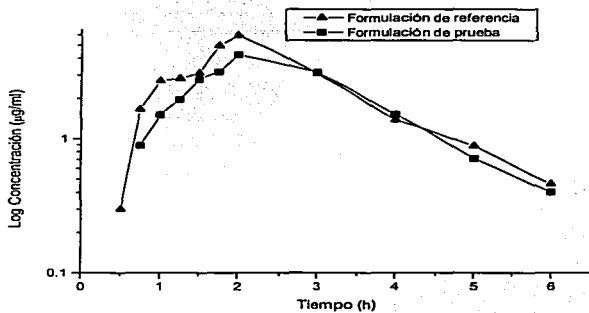
Gráfica 6. Voluntario2



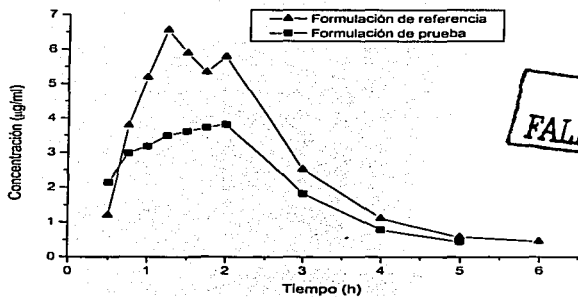
Gráfica 7. Voluntario 2



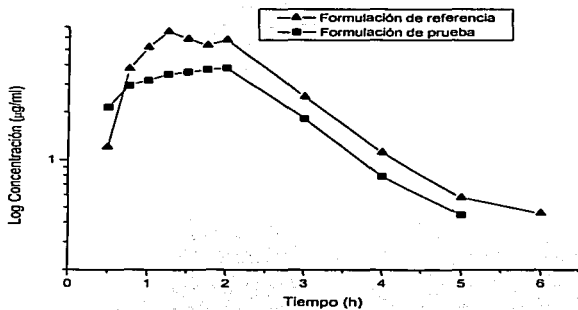
Gráfica 8. Voluntario 3



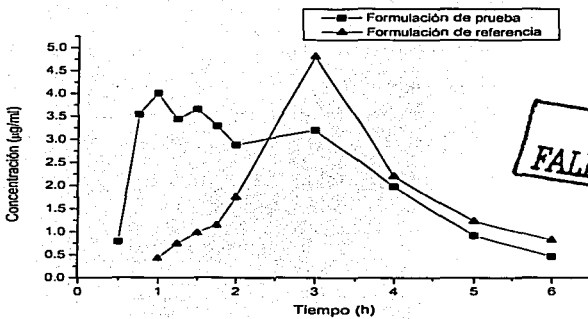
Gráfica 9. Voluntario 3



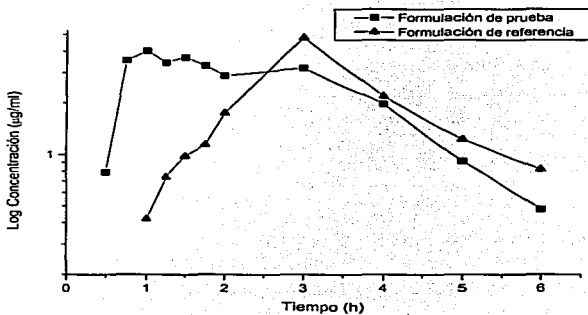
Gráfica 10. Voluntario 4



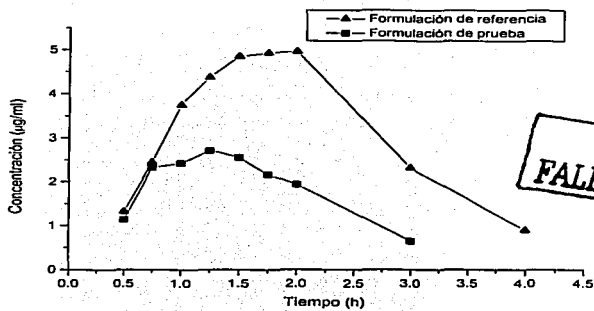
Gráfica 11. Voluntario 4



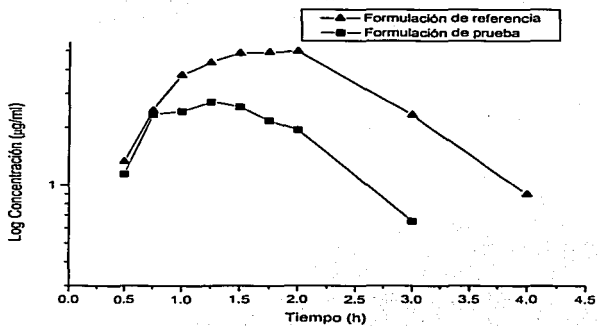
Gráfica 12. Voluntario 5



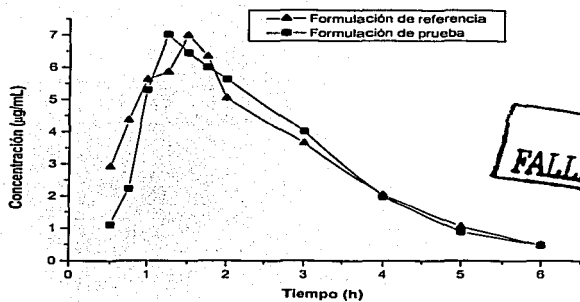
Gráfica 13. Voluntario 5



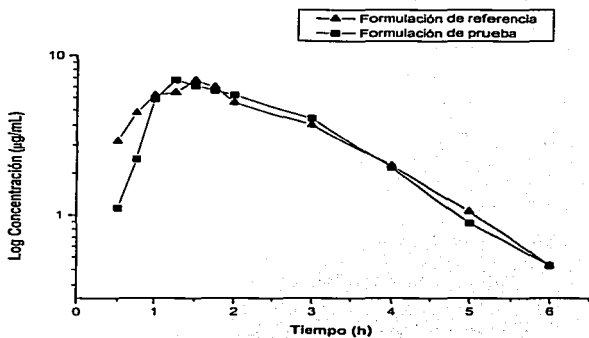
Gráfica 14. Voluntario 6



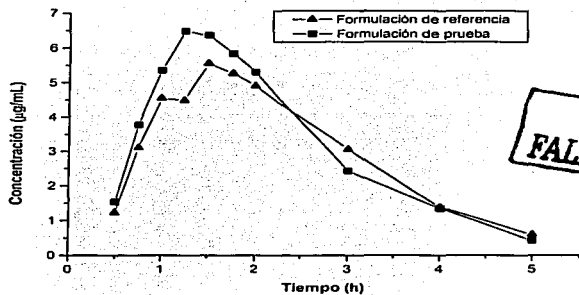
Gráfica 15. Voluntario 6



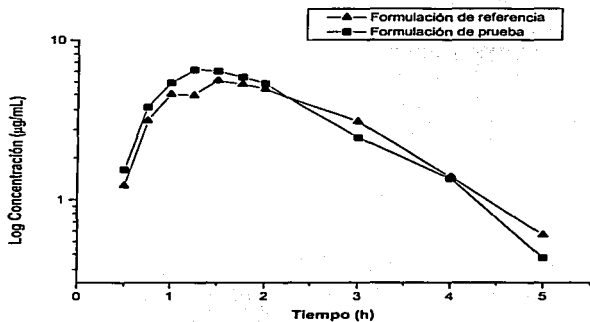
Gráfica 16. Voluntario 7



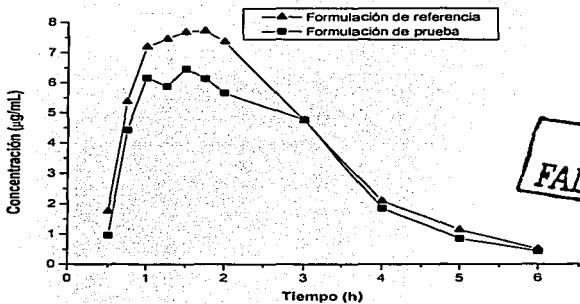
Gráfica 17. Voluntario 7



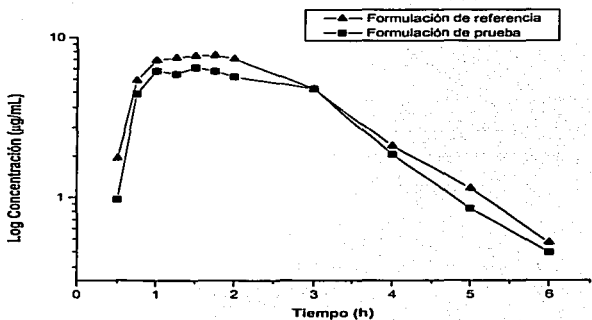
Gráfica 18. Voluntario 8



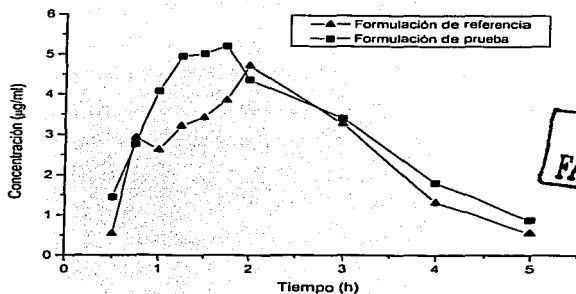
Gráfica 19. Voluntario 8



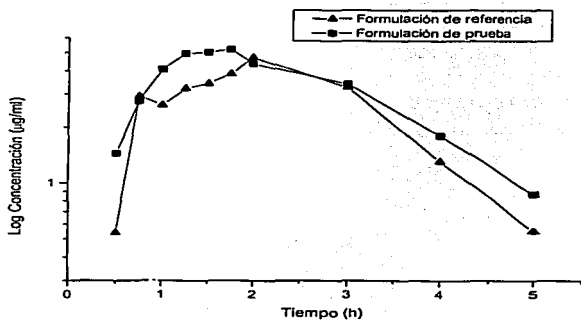
Gráfica 20. Voluntario 9



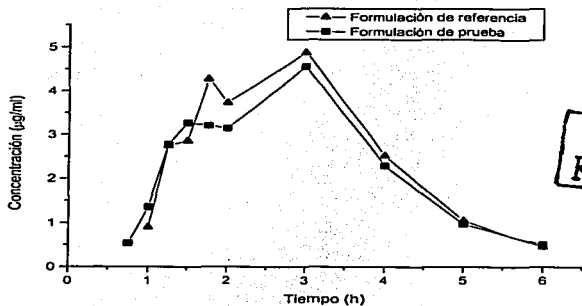
Gráfica 21. Voluntario 9



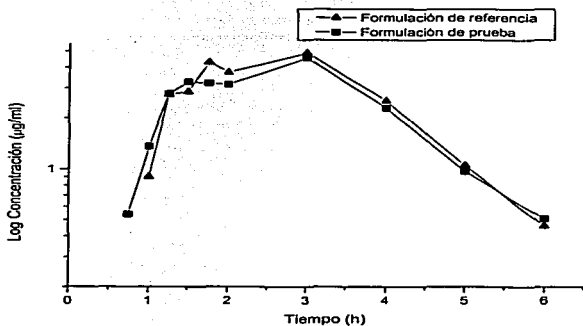
Gráfica 22. Voluntario 10



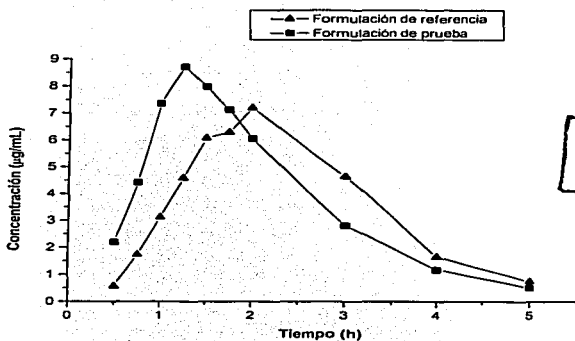
Gráfica 23. Voluntario 10



Gráfica 24. Voluntario 11

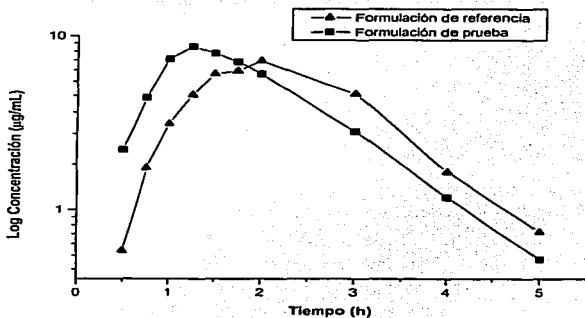


Gráfica 25. Voluntario 11



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 26. Voluntario 12



Gráfica 27. Voluntario 12

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE II

TABLA DE LOS PARÁMETROS

FARMACOCINÉTICOS POR

VOLUNTARIOS

Tabla 26. Voluntario 1

Parámetro farmacocinético	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	25.1337	27.4000
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	27.8822	29.1813
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	8.19	8.24
Tmax (h)	2.00	2.00
$t_{1/2}$ (h)	1.2452	1.0927

Tabla 27. Voluntario 2

Parámetro farmacocinético	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	10.7487	11.8950
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	11.3531	12.5472
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	3.99	4.91
Tmax (h)	2.00	3.00
$t_{1/2}$ (h)	0.8728	0.9041

Tabla 28. Voluntario 3

Parámetro farmacocinético	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$)	13.2025	11.0225
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$)	13.9511	11.59856
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5.94	4.24
Tmax (h)	2.00	2.00
t $\frac{1}{2}$ (h)	1.1281	0.9984

Tabla 29. Voluntario 4

Parámetro farmacocinético	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$)	15.2287	10.3025
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$)	15.8247	10.9220
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	6.57	3.83
Tmax (h)	1.25	2.00
t $\frac{1}{2}$ (h)	0.8980	0.9542

Tabla 30. Voluntario 5

Parámetro farmacocinético	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	10.7212	12.1137
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	12.9187	13.6620
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	4.81	4.01
Tmax (h)	3.00	1.00
$t_{1/2}$ (h)	1.1770	1.0733

Tabla 31. Voluntario 6

Parámetro farmacocinético	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	11.4525	5.0200
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	12.5071	5.6144
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	4.96	2.73
Tmax (h)	2.00	1.25
$t_{1/2}$ (h)	0.8122	0.6339

Tabla 32. Voluntario 7

Parámetro farmacocinético	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	18.4950	17.8150
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	19.3019	18.5613
C _{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	6.99	7.02
T _{max} (h)	1.50	1.25
t $\frac{1}{2}$ (h)	1.1652	1.0777

Tabla 33. Voluntario 8

Parámetro farmacocinético	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	14.0112	14.8475
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	14.8560	15.3765
C _{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5.56	6.49
T _{max} (h)	1.50	1.25
t $\frac{1}{2}$ (h)	0.9759	0.8527

Tabla 34. Voluntario 9

Parámetro farmacocinético	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$)	22.3837	18.8850
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$)	23.1007	19.4571
Cmax ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	7.72	6.47
Tmax (h)	1.75	1.50
$t_{1/2}$ (h)	0.9556	0.8812

Tabla 35. Voluntario 10

Parámetro farmacocinético	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$)	11.9937	14.3987
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$)	12.6119	15.6753
Cmax ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	4.71	5.20
Tmax (h)	2.00	1.75
$t_{1/2}$ (h)	0.7790	1.0171

Tabla 36. Voluntario 11

Parámetro farmacocinético	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	14.0187	12.9712
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	14.5966	13.6576
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	4.88	4.56
Tmax (h)	3.00	3.00
t $\frac{1}{2}$ (h)	0.8707	0.9328

Tabla 37. Voluntario 12

Parámetro farmacocinético	Formulación de referencia (A).	Formulación de prueba (B).
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	16.8375	17.7737
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	17.7967	18.4052
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	7.20	8.72
Tmax (h)	2.00	1.25
t $\frac{1}{2}$ (h)	0.8865	0.8418

APÉNDICE III

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS

PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

CON EL PROGRAMA COMPUTACIONAL

BIOPAK ANOVA

DATOS ESTADÍSTICOS CON ESCALA ARITMÉTICA

Dependent variable: AUC_LAST

Total Observations: 24 Observations Used: 24

Model Sum of Squares: 528.7895383 df 13

Error Sum of Squares: 47.6618677 df 10

Mean Square Error: 4.7661868

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	106.0816378	1	22.2571	0.0008
Sujeto(Secuencia)	418.9512729	10	8.7901	0.0010
Periodo	0.3984815	1	0.0836	0.7784
Formula	3.3581461	1	0.7046	0.4209

Weighted Squares of Means (Type 3)

Secuencia	106.0816378	1	22.2571	0.0008
Sujeto(Secuencia)	418.9512729	10	8.7901	0.0010
Periodo	0.3984815	1	0.0836	0.7784
Formula	3.3581461	1	0.7046	0.4209

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast				
A vs B	3.3581461	1	0.7046	0.4209
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test				
Secuencia	106.0816378	1	2.5321	0.1426
Using Sujeto(Secuencia) as error term				

Least Squares Means

Formula	Value	Std. Error
A	15.3523	0.630224
B	14.6042	0.630224

Bioavailability Statistics

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 15.352292, s.e. 0.630224

Test : B Least squares mean 14.604167, s.e. 0.630224

Difference = -0.7481, s.e.d. 0.8913, df 10
Ratio = 95.1269

Classical Westlake

C.L. 80% = (87.1596 , 103.0943) (89.7239 , 110.2761)
C.L. 90% = (84.6022 , 105.6517) (86.9347 , 113.0653)
C.L. 95% = (82.1882 , 108.0657) (84.4045 , 115.5955)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0131 Prob(> 120%)=0.0008 Max=0.0131 Total=0.0139

A.H. p-value = 0.0123
Power = 0.8742

Dependent variable: AUC_INF

Total Observations: 24 Observations Used: 24

Model Sum of Squares: 599.2612812 df 13
Error Sum of Squares: 48.2957145 df 10
Mean Square Error: 4.8295715

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	119.5904992	1	24.7621	0.0006
Sujeto(Secuencia)	474.3052761	10	9.8209	0.0006
Periodo	0.1040981	1	0.0216	0.8862
Formula	5.2614079	1	1.0894	0.3212

Weighted Squares of Means (Type 3)

Secuencia	119.5904992	1	24.7621	0.0006
Sujeto(Secuencia)	474.3052761	10	9.8209	0.0006

Periodo	0.1040981	1	0.0216	0.8862
Formula	5.2614079	1	1.0894	0.3212

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast

A vs B	5.2614079	1	1.0894	0.3212
--------	-----------	---	--------	--------

Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test

Secuencia	119.5904992	1	2.5214	0.1434
-----------	-------------	---	--------	--------

Using Sujeto(Secuencia) as error term

Least Squares Means

Formula	Value	Std. Error
A	16.3246	0.634401
B	15.3882	0.634401

Bioavailability Statistics

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 16.324645, s.e. 0.634401

Test : B Least squares mean 15.388215, s.e. 0.634401

Difference = -0.9364, s.e.d. 0.8972, df 10
Ratio = 94.2637

	Classical	Westlake
--	-----------	----------

C.L. 80%	= (86.7213 , 101.8061) (89.2872 , 110.7128)
C.L. 90%	= (84.3002 , 104.2272) (86.6129 , 113.3871)
C.L. 95%	= (82.0150 , 106.5124) (84.2045 , 115.7955)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0134 Prob(> 120%)=0.0004 Max=0.0134 Total=0.0138

A.H. p-value = 0.0129
Power = 0.9057

Dependent variable: Cmax_ALL

Total Observations: 24 Observations Used: 24

Model Sum of Squares: 49.3605000 df 13
Error Sum of Squares: 9.5409500 df 10
Mean Square Error: 0.9540950

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	2.8016667	1	2.9365	0.1174
Sujeto(Secuencia)	45.1294833	10	4.7301	0.0109
Periodo	0.3456000	1	0.3622	0.5607
Formula	1.0837500	1	1.1359	0.3116

Weighted Squares of Means (Type 3)

Secuencia	2.8016667	1	2.9365	0.1174
Sujeto(Secuencia)	45.1294833	10	4.7301	0.0109
Periodo	0.3456000	1	0.3622	0.5607
Formula	1.0837500	1	1.1359	0.3116

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast
A vs B 1.0837500 1 1.1359 0.3116
Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test
Secuencia 2.8016667 1 0.6208 0.4490
Using Sujeto(Secuencia) as error term

Least Squares Means

Formula	Value	Std. Error
A	5.96	0.281971
B	5.535	0.281971

Bioavailability Statistics

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 5.960000, s.e. 0.281971

Test : B Least squares mean 5.535000, s.e. 0.281971

Difference = -0.4250, s.e.d. 0.3988, df 10
Ratio = 92.8691

Classical Westlake

C.L. 80% = (83.6868 , 102.0514) (86.8231 , 113.1769)
C.L. 90% = (80.7394 , 104.9988) (83.5642 , 116.4358)
C.L. 95% = (77.9573 , 107.7809) (80.6310 , 119.3690)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0417 Prob(> 120%)=0.0012 Max=0.0417 Total=0.0428

A.H. p-value = 0.0405
Power = 0.7679

Dependent variable: Tmax_ALL

Total Observations: 24 Observations Used: 24

Model Sum of Squares: 5.4296875 df 13
Error Sum of Squares: 2.9427083 df 10
Mean Square Error: 0.2942708

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	0.3151042	1	1.0708	0.3251
Sujeto(Secuencia)	4.5885417	10	1.5593	0.2475
Periodo	0.2109375	1	0.7168	0.4170
Formula	0.3151042	1	1.0708	0.3251

Weighted Squares of Means (Type 3)

Secuencia	0.3151042	1	1.0708	0.3251
Sujeto(Secuencia)	4.5885417	10	1.5593	0.2475
Periodo	0.2109375	1	0.7168	0.4170
Formula	0.3151042	1	1.0708	0.3251

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type I) Contrast

A vs B 0.3151042 1 1.0708 0.3251
Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type I) Test

Secuencia 0.3151042 1 0.6867 0.4266
Using Sujeto(Secuencia) as error term

Least Squares Means

Formula	Value	Std. Error
A	2	0.156597
B	1.77083	0.156597

Bioavailability Statistics

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 2.000000, s.e. 0.156597

Test : B Least squares mean 1.770833, s.e. 0.156597

Difference = -0.2292, s.e.d. 0.2215, df 10
Ratio = 88.5417

Classical Westlake

C.L. 80% = (73.3451 , 103.7382) (78.5062 , 121.4938)
C.L. 90% = (68.4672 , 108.6162) (73.1203 , 126.8797)
C.L. 95% = (63.8628 , 113.2205) (68.2686 , 131.7314)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.2292 Prob(> 120%)=0.0088 Max=0.2292 Total=0.2379

A.H. p-value = 0.2204
Power = 0.3420

Dependent variable: HALF_ALL

Total Observations: 24 Observations Used: 24

Model Sum of Squares: 0.4002952 df 13
Error Sum of Squares: 0.0691278 df 10
Mean Square Error: 0.0069128

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	0.1961576	1	28.3761	0.0003
Sujeto(Secuencia)	0.1844377	10	2.6681	0.0687
Periodo	0.0090147	1	1.3041	0.2801
Formula	0.0106852	1	1.5457	0.2421

Weighted Squares of Means (Type 3)

Secuencia	0.1961576	1	28.3761	0.0003
Sujeto(Secuencia)	0.1844377	10	2.6681	0.0687
Periodo	0.0090147	1	1.3041	0.2801
Formula	0.0106852	1	1.5457	0.2421

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast

A vs B	0.0106852	1	1.5457	0.2421
--------	-----------	---	--------	--------

Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test

Secuencia	0.1961576	1	10.6354	0.0086
-----------	-----------	---	---------	--------

Using Sujeto(Secuencia) as error term

Least Squares Means

Formula	Value	Std. Error
A	0.980519	0.0240014
B	0.938318	0.0240014

Bioavailability Statistics

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 0.980519, s.e. 0.024001

Test : B Least squares mean 0.938318, s.e. 0.024001

Difference = -0.0422, s.e.d. 0.0339, df 10
Ratio = 95.6961

Classical Westlake

C.L. 80% = (90.9453 , 100.4470) (92.6058 , 107.3942)

C.L. 90% = (89.4203 , 101.9720) (90.9100 , 109.0900)

C.L. 95% = (87.9808 , 103.4114) (89.3889 , 110.6111)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0005 Prob(> 120%)=0.0000 Max=0.0005 Total=0.0006

A.H. p-value = 0.0005

Power = 0.9974

DATOS ESTADÍSTICOS CON TRANSFORMACIÓN LOGARÍTMICA

Dependent variable: Log10 AUC_LAST

Total Observations: 24 Observations Used: 24

Model Sum of Squares: 0.4432227 df 13

Error Sum of Squares: 0.0826072 df 10

Mean Square Error: 0.0082607

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	0.0879175	1	10.6428	0.0085
Sujeto(Secuencia)	0.3441678	10	4.1663	0.0170
Periodo	0.0030859	1	0.3736	0.5547
Formula	0.0080514	1	0.9747	0.3468

Weighted Squares of Means (Type 3)

Secuencia	0.0879175	1	10.6428	0.0085
Sujeto(Secuencia)	0.3441678	10	4.1663	0.0170
Periodo	0.0030859	1	0.3736	0.5547
Formula	0.0080514	1	0.9747	0.3468

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type I) Contrast

A vs B 0.0080514 1 0.9747 0.3468

Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type I) Test

Secuencia 0.0879175 1 2.5545 0.1411

Using Sujeto(Secuencia) as error term

Least Squares Means

Formula	Value	Std. Error
A	1.16996	0.0262372
B	1.13333	0.0262372

Bioavailability Statistics

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 1.169957, s.e. 0.026237

Test : B Least squares mean 1.133325, s.e. 0.026237

Difference = -0.0366, s.e.d. 0.0371, df 10

Ratio = 91.9111

	Classical	Westlake
--	-----------	----------

C.L. 80% = (81.7420 , 103.3453) (84.9010 , 115.0990)

C.L. 90% = (78.7227 , 107.3090) (81.4157 , 118.5843)

C.L. 95% = (75.9751 , 111.1898) (78.3704 , 121.6296)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0677 Prob(> 120%)=0.0054 Max=0.0677 Total=0.0731

A.H. p-value = 0.0622

Power = 0.6455

Dependent variable: Log10 AUC_INF

Total Observations: 24 Observations Used: 24

Model Sum of Squares: 0.4220179 df 13
Error Sum of Squares: 0.0761085 df 10
Mean Square Error: 0.0076108

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	0.0860378	1	11.3046	0.0072
Sujeto(Secuencia)	0.3248856	10	4.2687	0.0157
Periodo	0.0018879	1	0.2480	0.6292
Formula	0.0092067	1	1.2097	0.2972

Weighted Squares of Means (Type 3)

Secuencia	0.0860378	1	11.3046	0.0072
Sujeto(Secuencia)	0.3248856	10	4.2687	0.0157
Periodo	0.0018879	1	0.2480	0.6292
Formula	0.0092067	1	1.2097	0.2972

Contrasts**Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast**

A vs B	0.0092067	1	1.2097	0.2972
--------	-----------	---	--------	--------

Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests**Sequential Sum of Squares (Type 1) Test**

Secuencia	0.0860378	1	2.6482	0.1347
-----------	-----------	---	--------	--------

Using Sujeto(Secuencia) as error term

Least Squares Means

Formula	Value	Std. Error
A	1.19678	0.0251841
B	1.1576	0.0251841

Bioavailability Statistics

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 1.196777, s.e. 0.025184

Test : B Least squares mean 1.157605, s.e. 0.025184

Difference = -0.0392, s.e.d. 0.0356, df 10
Ratio = 91.3751

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (81.6487 , 102.2602)	(84.7745 , 115.2255)
C.L. 90%	= (78.7517 , 106.0220)	(81.4265 , 118.5735)
C.L. 95%	= (76.1115 , 109.6997)	(78.5112 , 121.4888)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0680 Prob(> 120%)=0.0039 Max=0.0680 Total=0.0719

A.H. p-value = 0.0642
Power = 0.6837

Dependent variable: Log10 Cmax_ALL

Total Observations: 24 Observations Used: 24

Model Sum of Squares: 0.2894913 df 13
Error Sum of Squares: 0.0764089 df 10
Mean Square Error: 0.0076409

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	0.0194779	1	2.5492	0.1414
Sujeto(Secuencia)	0.2574145	10	3.3689	0.0343
Periodo	0.0005689	1	0.0745	0.7905
Formula	0.0120300	1	1.5744	0.2381

Weighted Squares of Means (Type 3)

Secuencia	0.0194779	1	2.5492	0.1414
Sujeto(Secuencia)	0.2574145	10	3.3689	0.0343
Periodo	0.0005689	1	0.0745	0.7905
Formula	0.0120300	1	1.5744	0.2381

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast
A vs B 0.0120300 1 1.5744 0.2381
Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test

Secuencia	0.0194779	1	0.7567	0.4048
-----------	-----------	---	--------	--------

Using Sujeto(Secuencia) as error term

Least Squares Means

Formula	Value	Std. Error
A	0.764931	0.0252337
B	0.720154	0.0252337

Bioavailability Statistics

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 0.764931, s.e. 0.025234

Test : B Least squares mean 0.720154, s.e. 0.025234

Difference = -0.0448, s.e.d. 0.0357, df 10
Ratio = 90.2034

	Classical	Westlake
--	-----------	----------

C.L. 80%	= (80.5838 , 100.9712)	(83.7624 , 116.2376)
C.L. 90%	= (77.7190 , 104.6931)	(80.4416 , 119.5584)
C.L. 95%	= (75.1084 , 108.3320)	(77.5631 , 122.4369)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0874 Prob(> 120%)=0.0030 Max=0.0874 Total=0.0904

A.H. p-value = 0.0844
Power = 0.6819

Dependent variable: Log10 Tmax_ALL

Total Observations: 24 Observations Used: 24

Model Sum of Squares:	0.2580012	df 13
Error Sum of Squares:	0.1673717	df 10
Mean Square Error:	0.0167372	

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	0.0120859	1	0.7221	0.4153
Sujeto(Secuencia)	0.2112710	10	1.2623	0.3599
Periodo	0.0087420	1	0.5223	0.4864
Formula	0.0259023	1	1.5476	0.2419

Weighted Squares of Means (Type 3)

Secuencia	0.0120859	1	0.7221	0.4153
Sujeto(Secuencia)	0.2112710	10	1.2623	0.3599
Periodo	0.0087420	1	0.5223	0.4864
Formula	0.0259023	1	1.5476	0.2419

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast				
A vs B	0.0259023	1	1.5476	0.2419
Contrast: 1 -1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test				
Secuencia	0.0120859	1	0.5721	0.4669
Using Sujeto(Secuencia) as error term				

Least Squares Means

Formula	Value	Std. Error
A	0.287713	0.0373465
B	0.222008	0.0373465

Bioavailability Statistics

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 0.287713, s.e. 0.037347

Test : B Least squares mean 0.222008, s.e. 0.037347

Difference = -0.0657, s.e.d. 0.0528, df 10
 Ratio = 85.9599

Classical Westlake

C.L. 80% = (72.7464 , 101.5734) (76.9763 , 123.0237)
 C.L. 90% = (68.9517 , 107.1634) (72.4845 , 127.5155)
 C.L. 95% = (65.5516 , 112.7218) (68.6467 , 131.3533)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.2839 Prob(> 120%)=0.0104 Mux=0.2839 Total=0.2942

A.H. p-value = 0.2735
 Power = 0.3521

Dependent variable: Log10 HALF_ALL

Total Observations: 24 Observations Used: 24

Model Sum of Squares: 0.0833207 df 13
 Error Sum of Squares: 0.0173348 df 10
 Mean Square Error: 0.0017335

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	0.0405985	1	23.4203	0.0007
Sujeto(Secuencia)	0.0396623	10	2.2880	0.1040
Periodo	0.0010376	1	0.5986	0.4570
Formula	0.0020222	1	1.1665	0.3055

Weighted Squares of Means (Type 3)

Secuencia	0.0405985	1	23.4203	0.0007
Sujeto(Secuencia)	0.0396623	10	2.2880	0.1040
Periodo	0.0010376	1	0.5986	0.4570
Formula	0.0020222	1	1.1665	0.3055

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast

A vs B	0.0020222	1	1.1665	0.3055
--------	-----------	---	--------	--------

Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test

Secuencia	0.0405985	1	10.2360	0.0095
-----------	-----------	---	---------	--------

Using Sujeto(Secuencia) as error term

Least Squares Means

Dependent variable: Log10 HALF_ALL

Formula	Value	Std. Error
A	-0.0135501	0.012019
B	-0.0319085	0.012019

Bioavailability Statistics

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 -0.013550, s.e. 0.012019

Test : B Least squares mean -0.031908, s.e. 0.012019

Difference = -0.0184, s.e.d. 0.0170, df 10
Ratio = 95.8609

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (90.8478 , 101.1507)	(92.5112 , 107.4888)
C.L. 90%	= (89.2949 , 102.9097)	(90.7586 , 109.2414)
C.L. 95%	= (87.8535 , 104.5982)	(89.2067 , 110.7933)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.9995 Prob(> 120%)=0.9999 Max=0.9999 Total=1.9994

A.H. p-value = 0.0004
Power = 0.9970

APÉNDICE IV

TABLA DE LA

DISTRIBUCIÓN t

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PERCENTILES DE LA DISTRIBUCIÓN t

g.l	0.6	0.7	0.8	0.9	0.95	0.975	0.99	0.995	0.9995
1	0.3250	0.7270	1.376	3.078	6.3138	12.706	31.821	63.657	635.649
2	0.2885	0.6172	1.061	1.886	2.9200	4.3027	6.965	9.9248	31.598
3	0.2766	0.5840	0.978	1.638	2.3554	3.1825	4.541	5.8409	12.924
4	0.2707	0.5692	0.941	1.533	2.1318	2.7764	3.747	4.6641	8.610
5	0.2672	0.5598	0.920	1.476	2.0150	2.5706	3.365	4.0321	6.869
6	0.2648	0.5536	0.906	1.440	1.9432	2.4469	3.143	3.7074	5.959
7	0.2632	0.5493	0.896	1.415	1.8946	2.3646	2.998	3.4995	5.408
8	0.2619	0.5461	0.889	1.397	1.8595	2.3060	2.896	3.3554	5.041
9	0.2610	0.5436	0.883	1.383	1.8331	2.2622	2.821	3.2498	4.781
10	0.2602	0.5416	0.879	1.372	1.8125	2.2281	2.764	3.1693	4.587
11	0.2596	0.5400	0.876	1.363	1.7939	2.2010	2.718	3.1058	4.437
12	0.2590	0.5387	0.873	1.356	1.7823	2.1788	2.681	3.0545	4.318
13	0.2586	0.5375	0.870	1.350	1.7709	2.1604	2.650	3.0123	4.221
14	0.2582	0.5366	0.868	1.345	1.7613	2.1448	2.624	2.9768	4.140
15	0.2579	0.5358	0.866	1.341	1.7520	2.1315	2.602	2.9467	4.073
16	0.2576	0.5358	0.865	1.337	1.7459	2.1199	2.583	2.9208	4.015
17	0.2574	0.5344	0.863	1.333	1.7396	2.1098	2.567	2.8982	3.965
18	0.2571	0.5338	0.862	1.330	1.7341	2.1009	2.552	2.8784	3.922
19	0.2569	0.5333	0.861	1.328	1.7291	2.0930	2.539	2.8609	3.883
20	0.2567	0.5329	0.860	1.325	1.7247	2.0860	2.528	2.8453	3.850
21	0.2566	0.5325	0.859	1.323	1.7207	2.0796	2.518	2.8314	3.819
22	0.2564	0.5321	0.858	1.321	1.7171	2.0739	2.508	2.8188	3.792
23	0.2563	0.5318	0.858	1.319	1.7139	2.0687	2.500	2.9073	3.767
24	0.2562	0.5315	0.857	1.318	1.7109	2.0639	2.492	2.7969	3.745
25	0.2561	0.5312	0.856	1.316	1.7081	2.0595	2.485	2.7874	3.725
26	0.2560	0.5309	0.856	1.315	1.7056	2.0555	2.479	2.7787	3.707
27	0.2559	0.5307	0.855	1.314	1.7033	2.0518	2.473	2.7707	3.690
28	0.2558	0.5304	0.855	1.313	1.7011	2.0484	2.467	2.7633	3.674
29	0.2557	0.5302	0.854	1.311	1.6991	2.0452	2.462	2.7564	3.659
30	0.2556	0.5300	0.854	1.310	1.6973	2.0423	2.457	2.7500	3.646
35	0.2553	0.5292	0.8521	1.3062	1.6896	2.0301	2.438	2.7239	3.5919
40	0.2550	0.5286	0.8507	1.3031	1.6839	2.0211	2.423	2.7045	3.5511
45	0.2549	0.5281	0.8497	1.3007	1.6794	2.0141	2.412	2.6896	3.5207
50	0.2547	0.5278	0.8489	1.2987	1.6759	2.0086	2.403	2.6778	3.4965
60	0.2545	0.5272	0.8477	1.2959	1.6707	2.0003	2.390	2.6603	3.4606
70	0.2543	0.5268	0.8468	1.2938	1.6669	1.9945	2.381	2.6480	3.4355
80	0.2542	0.5265	0.8462	1.2922	1.6641	1.9901	2.374	2.6388	3.4169
90	0.2541	0.5263	0.8457	1.2910	1.6620	1.9867	2.368	2.6316	3.4022
100	0.2540	0.5261	0.8452	1.2901	1.6602	1.9840	2.364	2.6260	3.3909
120	0.2539	0.5258	0.8446	1.2887	1.6577	1.9799	2.358	2.6175	3.3736
140	0.2538	0.5256	0.8442	1.2876	1.6558	1.9771	2.353	2.6114	3.3615
160	0.2538	0.5255	0.8439	1.2869	1.6545	1.9749	2.350	2.6070	3.3527
180	0.2537	0.5253	0.8436	1.2863	1.6534	1.9733	2.347	2.6035	3.3456
200	0.2537	0.5252	0.8434	1.2858	1.6525	1.9719	2.345	2.6006	3.3400
∞	0.2533	0.5244	0.8416	1.2816	1.6449	1.9600	2.326	2.5758	3.2905

Los datos de esta tabla se han tomado con permiso de Documento Geigy Scientific Tables , 6th Ed., pp 32-35.

Geigy Pharmaceuticals, Division of Geigy Chemical Corporation, Ardsley, N.Y.

