



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA EVALUACION DE LA
BIOEQUIVALENCIA DE DOS FORMULACIONES ORALES
CONTENIENDO SULFAMETOXAZOL Y TRIMETOPRIM COMO
PRINCIPIOS ACTIVOS

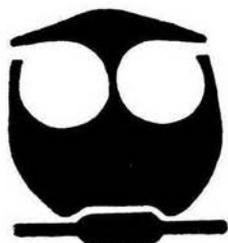
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

DIEGO ALBERTO GARCIA SOLIS



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

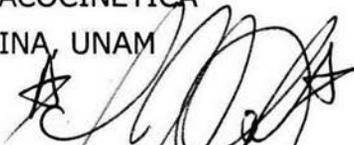
PRESIDENTE SOFÍA MARGARITA RODRÍGUEZ ALVARADO
VOCAL LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMÍREZ
SECRETARIO LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE
1er SUPLENTE JOSÉ MANUEL MORALES HERNÁNDEZ
2º SUPLENTE LIZ JANNET MEDINA REYES

SITIO EN DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE FARMACOCINÉTICA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR DEL TEMA



LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE

SUPERVISOR TÉCNICO



JORGE ABRAHAM AYALA BAUTISTA

SUSTENTANTE



DIEGO ALBERTO GARCÍA SOLÍS

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial, quiero brindar todo mi agradecimiento en estas pequeñas líneas, a la persona que sabe todo de mi, a la que me ha acompañado en cada momento de mi vida y que gracias a el, es posible abrir los ojos para conquistar un nuevo sol día a día.

Gracias por tu presencia, gracias por esa fuerza interna que me ha impulsado a seguir adelante y gracias por ayudarme a conquistar este objetivo.

Gracias por todo cuanto nos das.

Gracias Señor

Gracias a quien camino a mi lado, y después fue en busca de su propio sol, dejando en mi mente un recuerdo ausente de eclipses vespertinos y alas fortalecidas ^(José Antonio Tarango). Gracias Abuelitas.

Brigida Arrátia
Dominga Martínez

Es importante para mí, agradecer a cada una de las personas que con su presencia han dado sentido a mi vida y de las cuales he recibido todo el apoyo, toda la confianza, su amor y su compañía en todo este camino; Primeramente debo citar a mi Mamá y Papá, ustedes saben lo importantes y fundamentales que son en mi vida, gracias por todo su esfuerzo. Este logro es de ustedes.

Tio Beto; gracias por tu apoyo que también ha sido fundamental en todos estos años, gracias por tu amistad y tu presencia. Gracias hermano.

Luis García y Liz Janete, gracias por toda su paciencia, estoy conciente que este proyecto constituyó un trabajo largo debido a muchas circunstancias, pero aquí estamos. Gracias por su amistad y por su enseñanza. Gracias por cada momento compartido a lo largo de nuestro camino.

Gracias a toda mi Familia y mis grandes amigos: Abraham, Maribel, Cindy, Francisco, Gustavo, Francisco Barrón, Carmen Erika, Moisés, Diana, Javier, Sara, Cesar, Elisa, Maximiliano, Santiago, Yoko, Marcos, Felipe González, Azucena, Laura, Raquel, Amaya, Juan Carlos, Luis y Liz, Manuel Cantú y Miguel Pandal.

Manuel Cantú, Sra. Maria Elena, Miguel Pandal, gracias por toda su confianza y la gran oportunidad de crecimiento que me han brindado. Gracias por toda esta enseñanza que no puedo pagar con nada. Con todo mi respeto, gracias.

Violeta, gracias por tu compañía y por llegar en el momento en el que todo parecía perdido. Ahora se, que el camino se vuelve más fácil, cuando dos personas se mueven en la misma dirección y que el soñar con los ojos abiertos, es algo que esta en nuestras manos.

AGRADECIMIENTOS

PARA:

Nuestros ideales, son como las estrellas
Tal vez nunca los alcanzamos
Pero al igual que los marinos en altamar
Guiamos nuestro camino
Siguiendolas.

Índice General

CAPÍTULO 1	RESUMEN	1
CAPÍTULO 2	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	4
CAPÍTULO 3	GENERALIDADES	7
3.1	Estudios de Biodisponibilidad.....	7
3.1.1	Generalidades.....	7
3.1.2	Condiciones de prueba	8
3.1.3	Selección de Voluntarios:	9
3.1.4	Intervalo de Muestreo.....	9
3.1.5	Método Analítico.....	10
3.2	Monografía de Trimetoprim y Sulfametoxazol	11
3.2.1	Sulfametoxazol	12
3.2.2	Trimetoprim.....	13
3.3	Combinación de Trimetoprim y Sulfametoxazol.....	14
3.3.1	Mecanismos de Acción	14
3.3.2	Farmacocinética	15
3.3.3	Usos Terapéuticos	16
3.3.4	Dosis Empleadas	17
3.3.5	Efectos Adversos	18
3.3.6	Presentaciones Comerciales	19
3.4	Sistemas de Clasificación Biofarmacéutica.....	19
3.4.1	Criterios de Clasificación.....	21
3.5	Determinación del Tamaño de Muestra	21
CAPÍTULO 4	PARTE EXPERIMENTAL.....	25
4.1	Desarrollo del Método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para cuantificar Sulfametoxazol y Trimetoprim en plasma.	25
4.1.1	Equipo	25
4.1.2	Reactivos	26
4.1.3	Preparación de Soluciones	26
4.1.4	Preparación de las Curvas Patrón	28
4.1.5	Selección de la Longitud de Onda de Máxima Absorción	29
4.1.6	Selección de la Columna Cromatográfica	29
4.1.7	Fase Móvil	29
4.1.8	Método de Extracción.....	30
4.2	Validación del Método Analítico para la Cuantificación del Sulfametoxazol y Trimetoprim en Plasma	30
4.2.1	Validación del Método:	30
4.3	Etapa Clínica	34
4.3.1	Diseño del Estudio.....	34
4.3.2	Selección de Voluntarios.....	35
4.3.3	Procedimiento.....	37
4.4	Análisis de las Muestras Plasmáticas.....	37
4.4.1	Adecuabilidad del Sistema	38

4.4.2	Curva de Calibración.....	38
4.4.3	Puntos de las Muestras Control	39
4.4.4	Método de Procesamiento.....	39
4.4.5	Criterios de Aceptación de una Corrida Analítica	40
4.4.6	Análisis Farmacocinético.....	40
4.4.7	Análisis Estadístico	41
4.5	Determinación del Tamaño de Muestra	41
CAPÍTULO 5 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS		44
5.1	Desarrollo del Método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para Cuantificar Sulfametoxazol y Trimetoprim en Plasma.....	44
5.1.1	Longitud de Onda de Trabajo	44
5.1.2	Condiciones Cromatográficas	45
5.1.3	Método de extracción.....	46
5.2	Validación del Método Analítico para Cuantificar Trimetoprim y Sulfametoxazol en Plasma.....	48
5.2.1	Linealidad del Método	48
5.2.2	Precisión y Exactitud del Método:	51
5.2.3	Límite de Cuantificación:	55
5.2.4	Límite de Detección	56
5.2.5	Selectividad	56
5.2.6	Recobro	58
5.2.7	Estabilidad de las Muestras.....	60
5.3	Análisis de las Muestras Plasmáticas de Voluntarios.....	68
5.4	Análisis Farmacocinético	72
5.5	Análisis Estadístico de los Resultados	75
5.6	Determinación del Tamaño de Muestra a partir de los datos correspondientes a Trimetoprim.....	77
5.7	Determinación del Tamaño de Muestra a partir de los datos correspondientes a Sulfametoxazol.....	80
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES:		85
BIBLIOGRAFÍA.....		139

Índice de Tablas

Tabla No. 1: Presentaciones comerciales de Trimetoprim y Sulfametoxazol.	19
Tabla No. 2: Curva patrón para las soluciones de Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma.	28
Tabla No. 3 Aleatorización de Voluntarios para el Estudio Preliminar de Bioequivalencia de Trimetoprim y Sulfametoxazol.....	35
Tabla No. 4: Parámetros de Adecuabilidad del Sistema.....	38
Tabla No. 5: Condiciones Comatográficas Finales	45
Tabla No. 6: Parámetros Cromatográficos Finales.....	46
Tabla No. 7: Resultados correspondientes a la linealidad del método para cuantificar Trimetoprim en plasma.	49
Tabla No. 8: Resultados correspondientes a la linealidad del método para cuantificar Sulfametoxazol en plasma.....	50
Tabla No. 9: Resultados correspondientes a la repetibilidad del método analítico para cuantificar Trimetoprim en plasma.....	52
Tabla No. 10: Resultados correspondientes a la repetibilidad del método analítico para cuantificar Sulfametoxazol en plasma.	53
Tabla No. 11: Resultados correspondientes a la reproducibilidad del método analítico para cuantificar Trimetoprim en plasma.	54
Tabla No. 12: Resultados correspondientes a la reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de Sulfametoxazol en plasma.	55
Tabla No. 13: Selectividad del Método Analítico para cuantificar Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma.	57
Tabla No. 14: Resultados correspondientes al recobro obtenido para Trimetoprim una vez aplicado el procedimiento de extracción.....	59
Tabla No. 15: Resultados correspondientes al recobro obtenido para Sulfametoxazol una vez aplicado el procedimiento de extracción.	60
Tabla No. 16: Resultados correspondientes a la estabilidad de Trimetoprim en Refrigeración a 5°C.....	61
Tabla No. 17: Resultados correspondientes a la estabilidad de Sulfametoxazol en Refrigeración a 5°C.....	62
Tabla No. 18: Resultados correspondientes a la estabilidad a largo plazo para Trimetoprim a -70°C.....	63
Tabla No. 19: Resultados correspondientes a la estabilidad a largo plazo para Sulfametoxazol a -70°C	63
Tabla No. 20: Resultados correspondientes a la estabilidad bajo dos ciclos de congelación-descongelación para Trimetoprim.....	65
Tabla No. 21: Resultados correspondientes a la estabilidad bajo dos ciclos de congelación-descongelación para Sulfametoxazol	66
Tabla No. 22: Resultados correspondientes a la estabilidad de la muestra procesada para Trimetoprim.	67

Tabla No. 23: Resultados correspondientes a la estabilidad de la muestra procesada para Sulfametoxazol.	68
Tabla No. 24: Seguimiento de las muestras control para Trimetoprim.....	69
Tabla No. 25: Seguimiento de las muestras control para Sulfametoxazol.	70
Tabla No. 26: Seguimiento de las curvas de calibración para Trimetoprim.....	71
Tabla No. 27: Seguimiento de las curvas de calibración para Sulfametoxazol....	71
Tabla No. 28: Concentración plasmática promedio (en $\mu\text{g/mL}$) para Trimetoprim, después de la administración del producto farmacéutico.....	72
Tabla No. 29: Concentración plasmática promedio (en $\mu\text{g/mL}$) para Sulfametoxazol, después de la administración del producto farmacéutico. ..	73
Tabla No. 30: Parámetros farmacocinéticos promedio correspondientes a Trimetoprim para ambas formulaciones.....	75
Tabla No. 31: Parámetros farmacocinéticos correspondientes a Sulfametoxazol para ambas formulaciones.	75
Tabla No. 32: Resultados del análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos para Trimetoprim	76
Tabla No. 33: Resultados del análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos para Sulfametoxazol.....	76
Tabla No. 34: Tamaño de muestra a partir de los resultados de análisis de varianza de ocho sujetos voluntarios (Trimetoprim).....	79
Tabla No. 35: Tamaño de muestra a partir de los resultados de análisis de varianza de ocho sujetos voluntarios (Sulfametoxazol).....	82

Índice de Figuras

Figura 1 Formula desarrollada del Sulfametoxazol	12
Figura 2 Formula desarrollada de Trimetoprim	13
Figura 3 Diagrama de síntesis del Ácido Tetrahidrofolato. Actuación de Sulfametoxazol y Trimetoprim en la vía síntesis.	15
Figura 4 Espectro Ultravioleta de Sulfametoxazol y Trimetoprim. Espectro correspondiente al barrido desde 200 nm hasta 400 nm.	44
Figura 5 Proceso de extracción líquido – líquido empleado durante el análisis de las concentraciones plasmáticas de Sulfametoxazol y Trimetoprim.....	47
Figura 6 Gráfica correspondiente a la linealidad del método para la cuantificación de Trimetoprim en plasma.....	50
Figura 7 Gráfica correspondiente a la linealidad del método para la cuantificación de Sulfametoxazol en plasma.....	51
Figura 8 Gráfica de la concentración plasmática promedio para Trimetoprim (\pm D.E.), contra tiempo, después de la administración de las dos formulaciones.	73
Figura 9: Gráfica de la concentración plasmática promedio para Sulfametoxazol (\pm D.E.), contra tiempo, después de la administración de las dos formulaciones.	74

RESUMEN

CAPÍTULO 1 RESUMEN

En el presente trabajo, se llevó a cabo un estudio preliminar de bioequivalencia entre dos medicamentos conteniendo Trimetoprim y Sulfametoxazol como sustancias activas a una concentración de 80 y 400 mg respectivamente, con la finalidad de establecer el número de voluntarios así como, los tiempos en los que se deberá realizar el muestreo.

La población en estudio estuvo conformada por ocho individuos, cuatro mujeres y cuatro hombres distribuidos al azar de acuerdo a un modelo cruzado 2 x 2, a los cuales se les administró por vía oral, la formulación de referencia así como la formulación de prueba, teniendo un periodo de lavado entre cada etapa de administración.

Posteriormente se colectaron muestras sanguíneas a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 8.0, 12.0, 22.0, y 48.0 horas después de su administración.

Cada muestra fue procesada antes de proceder a su cuantificación mediante un método analítico de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), previamente validado determinando la linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación (LC), límite de detección (LD), selectividad, tolerancia y estabilidad de la muestra dentro del rango de concentraciones de 0.05 a 3.0 µg/ mL para Trimetoprim y 0.5 a 70.0 µg/ mL para Sulfametoxazol.

El método validado proporcionó un recobro mayor al 70 % para Trimetoprim mientras que para Sulfametoxazol, los resultados fueron mayores al 96 %. Trimetoprim fue lineal dentro del rango de concentraciones comprendido entre 0.05 a 3.0 µg/ mL, su límite de cuantificación fue determinado a 0.05 µg/ mL mientras que el límite de detección fue registrado a 0.013 µg/ mL.

Para Sulfametoxazol, su linealidad se encontró dentro del rango de concentraciones de 0.5 a 70.0 µg/ mL, su límite de cuantificación fue determinado a 0.25 µg/ mL y el límite de detección a 0.05 µg/ mL.

En lo que respecta a los parámetros farmacocinéticos promedio para Trimetoprim, el $ABC_{0-\infty}$, ABC_{0-t_r} , $C_{máx}$, $T_{máx}$, $T_{1/2}$ encontrados para la formulación de referencia fueron: $(9.04 \pm 0.22 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL})$, $(7.93 \pm 0.21 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL})$, $(0.85 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{mL})$, $(0.9375 \pm 0.14 \text{ h})$ y $(6.97 \pm 0.18 \text{ h})$ respectivamente, mientras que para la formulación de prueba los resultados fueron los siguientes: $(9.23 \pm 0.22 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL})$, $(8.09 \pm 0.21 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL})$, $(0.95 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{mL})$, $(1.25 \pm 0.14 \text{ h})$ y $(6.99 \pm 0.18 \text{ h})$.

Por su parte, Sulfametoxazol dentro del análisis de los parámetros farmacocinéticos promedio de ABC_{0-t} , $ABC_{0-\infty}$, $C_{máx}$, $T_{máx}$, $T_{1/2}$, encontrados para la formulación de referencia fueron: $(300.07 \pm 8.20 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL})$, $(312.85 \pm 5.02 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL})$, $(23.69 \pm 0.79 \mu\text{g}/\text{mL})$, $(2.62 \pm 0.12 \text{ h})$ y $(7.94 \pm 0.08 \text{ h})$ respectivamente, mientras que para la formulación de prueba, los datos obtenidos fueron los siguientes: $(287.82 \pm 8.20 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL})$, $(301.58 \pm 5.02 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL})$, $(23.98 \pm 0.79 \mu\text{g}/\text{mL})$, $(2.12 \pm 0.12 \text{ h})$ y $(7.78 \pm 0.08 \text{ h})$.

Durante la fase de evaluación del número de individuos requeridos en la realización de un estudio de bioequivalencia, aplicamos un diseño de análisis cruzado 2 X 2 mediante hipótesis puntual considerando la regla 80/20 encontrando que requerimos de por lo menos 16 individuos de prueba para la evaluación de los medicamentos en estudio.

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

CAPÍTULO 2 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS: (1,2)

Las Sulfonamidas fueron los primeros agentes quimioterápicos eficaces que se utilizaron por vía sistémica para evitar y curar infecciones bacterianas en seres humanos. La importancia enorme que tuvo su descubrimiento en la medicina y la salud pública así como su empleo, se reflejaron rápidamente en la disminución de las cifras de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas tratables. Infecciones del tracto urinario, tracto respiratorio superior y otitis media entre otras.

La combinación de Sulfametoxazol y Trimetoprim constituyó un progreso importante en la obtención de antimicrobianos clínicamente eficaces y representó la aplicación práctica de una consideración teórica: *"La utilización de dos fármacos que actúan en fases seriadas en la vía de una reacción enzimática obligada en las bacterias"*.

De esta manera, se logró mostrar gran efectividad en el tratamiento y la profilaxis de neumotitis producida por el *Pneumocystis carinii* y en pacientes inmunocomprometidos, incluyendo aquellos con SIDA.

Dentro del rubro correspondiente a la generación de propuestas terapéuticas alternas, la Industria Farmacéutica ha venido trabajando de manera importante en la optimización y generación de nuevos productos farmacéuticos (Medicamentos Genéricos) cuya finalidad pretende proporcionar tratamiento terapéutico a la población con pocos recursos económicos.

La Secretaria de Salud por su parte, ha establecido los criterios, pruebas y parámetros que deberán ser aplicados con la finalidad de demostrar la bioequivalencia de las nuevas formulaciones desarrolladas, en comparación al medicamento de referencia.

Estos métodos y procedimientos pretenden garantizar el correcto funcionamiento y respuesta fisiológica adecuada de los productos que son administrados.

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

De esta manera, el presente trabajo realizó un estudio preliminar de bioequivalencia para Trimetoprim y Sulfametoxazol tabletas cuyos principales objetivos se orientaron a los siguientes aspectos:

- Desarrollo y Validación de un Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para cuantificar Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma.

- Determinar los tiempos de muestreo óptimos, a fin de poder observar la fase de absorción y eliminación de los activos administrados.
- Evaluación de la biodisponibilidad entre dos formulaciones conteniendo Trimetoprim y Sulfametoxazol (medicamento innovador y medicamento de prueba) en términos de la concentración máxima ($C_{máx}$) y Área Bajo la Curva de cero a infinito ($ABC_{0-\infty}$).
- Determinación del número de individuos necesarios para llevar a cabo un estudio de bioequivalencia para Trimetoprim y Sulfametoxazol.

GENERALIDADES

CAPÍTULO 3 GENERALIDADES:

3.1 Estudios de Biodisponibilidad

3.1.1 Generalidades:

Con base en los datos reportados por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), correspondientes al censo de población y vivienda realizado durante el año 2000, se puede observar que la situación económica que guarda nuestro país en la actualidad, ha propiciado la generación de diversas clases sociales heterogéneas las cuales en su mayoría presentan un poder adquisitivo bajo.

De esta manera es como la industria establecida, mantiene una constante búsqueda de oportunidades de sobrevivencia y desarrollo; por su parte, la Industria Farmacéutica ha orientado sus esfuerzos al diseño y optimización de nuevas formulaciones con principios activos ya conocidos (Medicamentos Genéricos), los cuales juegan un papel importante dentro de nuestra sociedad ya que la reducción en su costo, ha permitido el acceso a tratamientos terapéuticos a un mayor número de individuos.

Se considera que dos productos farmacéuticos son bioequivalentes, siempre y cuando cumplan con las especificaciones de los organismos especializados y reconocidos internacionalmente en materia de la velocidad y cantidad del principio activo absorbido, cuando son administrados bajo condiciones experimentales similares⁽³⁾.

A partir de 1997, año en el cual fueron aprobadas las reformas a la ley General de Salud, se marcaron en nuestro país nuevas pautas para el mercado de los Medicamentos Genéricos Intercambiables, al introducir a la legislación la necesidad de la denominación genérica para su uso, comercialización y prescripción de estos medicamentos, iniciando de esta manera la apertura de un mercado nuevo ⁽⁴⁾.

Durante el mes de Junio de 1997, la Secretaria de Salud con la ayuda de un grupo de expertos, crea la norma de emergencia NOM-EM-003-SSA-1998 publicada en el Diario Oficial de la Nación el 25 de Marzo de 1998. Mas tarde este documento sería sustituido por la NOM-177-SSA-1-1998 publicada en el Diario Oficial el 26 de Enero de 1999, documento en el cual se establecen las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable tomando en cuenta la comparación de la biodisponibilidad de los medicamentos (Medicamento de prueba contra el medicamento de referencia) ⁽⁴⁾.

En la actualidad, la Secretaría de Salud lleva a cabo un programa de evaluación de medicamentos genéricos intercambiables a partir de estudios de disolución y bioequivalencia con la única finalidad de asegurar la eficacia y seguridad en su aplicación.

Si se demuestra que la biodisponibilidad en el medicamento genérico es equivalente a la del medicamento innovador, entonces podemos considerarlos intercambiables es decir, el medicamento genérico puede sustituir a la formulación innovadora durante el tratamiento terapéutico del paciente.

Los estudios para demostrar la biodisponibilidad, deberán ser realizados con base a lo dispuesto en la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, las Buenas Prácticas de Laboratorio y la Norma Oficial Mexicana correspondiente⁽³⁾.

Durante el desarrollo de estos estudios, es administrada una dosis única del medicamento a evaluar y el parámetro de biodisponibilidad es medido mediante la evaluación de los niveles sanguíneos. Las características de las curvas sanguíneas, esencialmente Área Bajo la Curva (ABC), Concentración Máxima (C_{max}), Tiempo Máximo de Absorción (T_{max}), Tiempo de Vida Media del Fármaco ($t_{1/2}$), son evaluados mediante procedimientos estadísticos.

Un estudio de biodisponibilidad debe ser el resultado de un diseño experimental perfectamente planeado durante el cual se permita alcanzar los objetivos planteados a fin de obtener conclusiones validas y confiables ⁽⁵⁾.

De esta manera es necesario comentar que durante la planeación del experimento se deberán controlar los factores que presentan una ingerencia directa sobre la biodisponibilidad de los fármacos, tales como los factores fisiológicos y patológicos ⁽⁵⁾.

3.1.2 Condiciones de prueba:

Durante el desarrollo del experimento, se deben mantener condiciones idénticas de prueba: administración del producto farmacéutico en condiciones de ayuno a cada uno de los voluntarios, ya que la ingesta de alimento es un factor determinante durante absorción del fármaco. Otro factor a controlar es el tipo de dieta que se proporciona durante la fase de estudio ⁽⁶⁾.

3.1.3 Selección de Voluntarios:

La población de voluntarios debe ser seleccionada con la intención de minimizar la variabilidad de los resultados experimentales y permitir la detección de diferencias entre los productos administrados ⁽⁷⁾.

Para la selección de los voluntarios se deben considerar los siguientes aspectos ^(3,5):

1) Características antropométricas:

Son las características referidas a la raza, la edad, peso. Las cuales se eligen generalmente entre los siguientes rangos.

Misma raza, con una edad de entre 18 y 55 años y un peso aproximadamente igual para cada individuo con un margen de ± 10 del peso ideal.

2) Estado Físico:

Se busca el estado sano del individuo de prueba, el cual puede ser determinado mediante la elaboración de un historial clínico y pruebas de laboratorio y de gabinete.

3) Es indispensable trabajar con individuos que no presenten antecedentes de drogadicción o abuso de bebidas alcohólicas, tabaco, bebidas de cola o bien personas que se encuentren bajo tratamientos médicos constantes.

4) Es importante tomar en cuenta que la biodisponibilidad de los productos farmacéuticos puede ser modificada por el stress.

El número de individuos debe calcularse mediante la aplicación de métodos estadísticos adecuados ⁽³⁾. En los estudios de bioequivalencia el tamaño de la muestra requerido para tener la capacidad de establecer resultados confiables dentro de los límites significativos, puede calcularse mediante el procedimiento de hipótesis puntual⁽⁸⁾.

3.1.4 Intervalo de Muestreo.

El muestreo deberá ser realizado por un periodo que permita cubrir por lo menos el 80 % del área bajo la curva de concentración plasmática. El horario de muestreo se debe diseñar de tal forma que se puedan caracterizar adecuadamente los parámetros farmacocinéticos de Área Bajo la Curva (ABC) y Concentración Máxima (C_{max}).

Por lo menos se debe trabajar con once tiempos de muestreo a fin de construir una curva de concentración contra tiempo que refleje tanto la absorción como la eliminación del fármaco, entre ellos se debe considerar al tiempo cero, 3 o 4 puntos antes de lograr la concentración máxima, de 3 a 5 puntos alrededor de la concentración máxima y de 4 a 6 puntos durante la fase de eliminación⁽³⁾.

Es importante obtener todas las muestras al tiempo especificado en el diseño del experimento, esta actividad permitirá un análisis estadístico apropiado⁽³⁾.

El periodo de muestreo debe ser lo suficientemente largo de manera que permita cubrir por lo menos el 80% del área bajo la curva de concentración plasmática con respecto al tiempo⁽³⁾.

3.1.5 Método Analítico: ^(3,5)

Los fluidos más comunes durante este tipo de estudios son los siguientes:

- Sangre
- Plasma
- Suero
- Orina
- Saliva (poca aplicación)

Es muy importante señalar que durante el estudio planteado, no solo se necesita conocer el fármaco que se pretende estudiar, es importante conocer también el o los metabolitos que se forman durante la fase de biotransformación, ya que se tiene la posibilidad de encontrar en cualquier fluido biológico al fármaco así como su metabolito^(5,6).

Para fines de cuantificación, es necesario contar con métodos validados, entendiéndose que esta actividad se refiere a la evidencia documental que se debe presentar a fin de sustentar que un procedimiento cumple con el propósito para el cual fue diseñado.

Los parámetros analíticos para llevar a cabo esta evaluación se deben tratar de acuerdo a lo establecido dentro de la sección nueve de la NOM-177-SSA1-1998, a saber (ver Apéndice I).

- Rango
- Recuperación Absoluta
- Linealidad
- Precisión
- Repetibilidad

- Reproducibilidad Intralaboratorio
- Exactitud
- Estabilidad
- Límite de Cuantificación
- Límite de Detección

3.2 Monografía de Trimetoprim y Sulfametoxazol ^(1,2,9)

Las sulfonamidas constituyen los primeros quimioterápicos eficaces empleados por vía sistémica para evitar y erradicar infecciones bacterianas en el ser humano.

Con el advenimiento de la penicilina y los antibióticos, se redujo la utilización de estos agentes, pero en la actualidad; la introducción de la combinación Trimetoprim / Sulfametoxazol provocó un incremento en el empleo de las sulfonamidas en el tratamiento de infecciones microbianas específicas.

La combinación de los principios activos constituyó un progreso importante en la obtención de antimicrobianos clínicamente eficaces y representó la aplicación práctica de una consideración teórica: *La utilización de dos fármacos que actúan en fases seriadas en la vía de una reacción enzimática obligada en las bacterias.*

La fórmula básica de las sulfonamidas, presenta gran similitud estructural con el ácido para-aminobenzoico (PABA), de hecho esta propiedad explica su mecanismo de acción, el cual impide que la bacteria utilice de manera normal el PABA durante la síntesis del ácido fólico.

Entre los microorganismos que suelen ser sensibles a las sulfonamidas, podemos mencionar los siguientes: *Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, H. Ducreyi, Nocardia, Actinomyces, Calymmatobacterium granulomatis, Clamidia trachomatis.*

Por su parte el Trimetoprim, cuya molécula constituye una trimetoxibenzilpirimidina, presenta un espectro antibacteriano semejante al Sulfametoxazol aunque el primero tiene una potencia de 20 a 100 veces mayor que el segundo.

3.2.1 Sulfametoxazol : ^(10,11)

3.2.1.1 Nombre Químico

N-(5-Metilisoxazol-3-yl) sulfanilamida

3.2.1.2 Fórmula Condensada

C₁₀ H₁₁ N₃ O₃ S

3.2.1.3 Fórmula Desarrollada

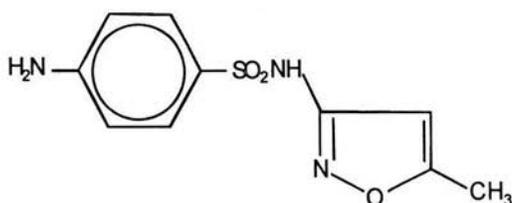


Figura 1 Formula desarrollada del Sulfametoxazol

3.2.1.4 Peso Molecular

253.3 g/mol

3.2.1.5 Descripción

Es un polvo cristalino blanco

3.2.1.6 Solubilidad

Muy soluble en agua, soluble 1 en 50 de etanol y 1 en 3 de acetona, prácticamente insoluble en cloroformo y éter. Soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos.

3.2.1.7 Constante de Disociación

pK_a 5.6 a 25 °C

3.2.1.8 Punto de Fusión

Se han reportado puntos de fusión de 168 °C a 172 °C

3.2.2 Trimetoprim: ^(10,11)

3.2.2.1 Nombre Químico

5-(3,4,5-Trimetoxibenzil)pirimidina-2,4-diyldiamina

3.2.2.2 Fórmula Condensada

$C_{14} H_{18} N_4 O_3$

3.2.2.3 Fórmula Desarrollada

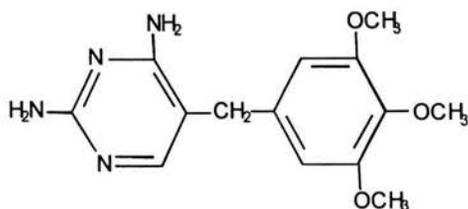


Figura 2 Formula desarrollada de Trimetoprim

3.2.2.4 Peso Molecular

290.3 g/mol

3.2.2.5 Descripción

Es un polvo cristalino blanco amarillento

3.2.2.6 Solubilidad

Soluble 1 en 2500 de agua, 1 en 300 de etanol, 1 en 55 de cloroformo y 1 en 80 de metanol.

Prácticamente insoluble en éter.

3.2.2.7 Constante de Disociación

pK_a 7.2 a 25 °C

3.2.2.8 Punto de Fusión

Se han reportado puntos de fusión de 199 °C a 203 °C

3.3 Combinación de Trimetoprim y Sulfametoxazol:

3.3.1 Mecanismos de Acción: ^(1,2,12)

Por su parte, las sulfonamidas son análogos estructurales competitivos del ácido para-aminobenzoico (PABA), por tal razón impiden que la bacteria utilice de manera normal el PABA en la síntesis del ácido fólico, un paso esencial en la producción de purinas y síntesis de ácidos nucleicos.

Estos compuestos actúan de manera específica como inhibidores reversibles de la enzima bacteriana Dihidropteroato Sintetasa, que incorpora el PABA en el Ácido Dihidropteroico, precursor inmediato del Ácido Fólico.

Las células de algunos mamíferos y de algunas bacterias, carecen de las enzimas necesarias en la síntesis de folatos y dependen de una fuente exógena de este compuesto, por lo tanto no son susceptibles a las sulfonamidas.

La Trimetoprima inhibe a la Reductasa del Ácido Dihidrofólico bacteriano, impidiendo la transformación a ácido tetrahidrofólico, un estadio que permite la síntesis de purinas y finalmente del DNA.

La combinación de Trimetoprim y Sulametoxazol, es consecuencia de la acción en la vía enzimática correspondiente a la síntesis del Ácido Tetrahidrofólico en bacterias, como se indica en la figura 3.

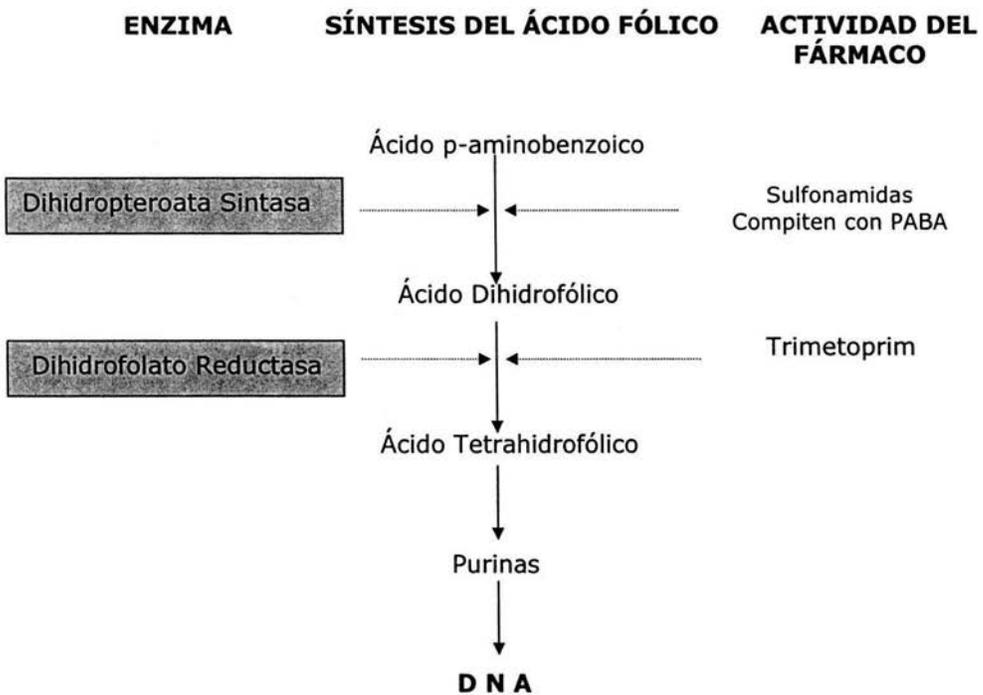


Figura 3 Diagrama de síntesis del Ácido Tetrahidrofolato. Actuación de Sulfametoxazol y Trimetoprim en la vía síntesis.

3.3.2 Farmacocinética ^(1,2,12,13)

La Trimetoprima y el Sulfametoxazol, se absorben en forma rápida y casi completa en la porción superior del tracto gastrointestinal tras su administración oral.

Tras una dosis única de 160 mg de Trimetoprima y 800 mg de Sulfametoxazol, se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas de 1.5 a 3 µg/mL de Trimetoprim y 40 a 80 µg/mL de Sulfametoxazol en un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 4 horas.

El volumen de distribución de la Trimetoprima es de cerca de 130 litros mientras que el de Sulfametoxazol es de 20 litros. El 45% de la Trimetoprima y el 66 % del Sulfametoxazol se unen a las proteínas plasmáticas.

Existe una gran diferencia en cuanto a la liposolubilidad de los principios activos, siendo mayor para Trimetoprim, por lo tanto esta situación explica la mayor distribución del activo en todos los líquidos y tejidos.

Grandes cantidades de Trimetoprima y menores de Sulfametoxazol, pasan del torrente sanguíneo al fluido intersticial y otros fluidos corporales extravasculares.

En humanos, se ha detectado la presencia de estos principios activos en tejidos fetales (placenta, hígado, pulmón) en la sangre del cordón umbilical y en el fluido amniótico, indicando la transferencia placentaria de ambos fármacos.

Aproximadamente del 50 al 70% Trimetoprima y del 10 al 30% de Sulfametoxazol administrado, se excretan sin cambios en la orina.

Los principales metabolitos de la Trimetoprima son 1- y 3- óxidotrimetoprim y los derivados 3- y 4- hidróxitrimetoprim; algunos metabolitos son microbiológicamente activos.

El Sulfametoxazol se metaboliza en el hígado predominantemente por la acetilación N₄ y en menor grado por conjugación de glucurónidos.

Trimetoprim se absorbe con mayor rapidez que Sulfametoxazol, por lo general en un período de dos horas se alcanzan cifras máximas de Trimetoprim en sangre mientras que para Sulfametoxazol, los niveles máximos se alcanzan a las cuatro horas de su administración.

Las semividas de eliminación de los dos compuestos son muy similares (10 horas para Trimetoprim y 11 horas para Sulfametoxazol). Ambas sustancias así como, sus metabolitos, se eliminan casi completamente por los riñones a través de filtración glomerular y secreción tubular.

3.3.3 Usos Terapéuticos ^(1,2,12,13,14)

- Infecciones del Tracto Respiratorio

La combinación de los principios activos tiene gran auge en el tratamiento de la bronquitis crónica y otitis media en niños, de hecho, esta combinación puede ser aplicada en lugar de algún antibiótico.

Eficaz en el tratamiento y profilaxis (primaria y secundaria) de neumonía por *Pneumocystis carinni*, en niños y adultos.

- Infecciones del Tracto Urogenital

Las tabletas de doble componente (Trimetoprim y Sulfametoxazol), administradas cada 12 horas, son eficaces contra infecciones del tracto urinario y prostatitis, uretritis gonocócica y chancroide.

- Infecciones del Tracto Gastrointestinal

Eficaces para el tratamiento de fiebre tifoidea y paratifoidea, shigellosis (cepas susceptibles de *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*), diarrea del viajero causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica y cólera.

- Infecciones Bacterianas

Infecciones provocadas por un amplio rango de organismos como brucelosis, osteomielitis aguda y crónica, nocardiosis, actinomietoma, toxoplasmosis y blastomicosis sudamericana.

- Infecciones por *Pneumocytis carinii*

Eficaz contra la infección grave causada por el microorganismo *Pneumocytis carinii*, en sujetos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Se considera el tratamiento más indicado en la brucelosis como sustituto de la doxiciclina y estreptomycinina ó gentamicina, requiriendo un tratamiento de 800 mg de Sulfametoxazol y 160 mg de Trimetoprim durante una semana y tres veces por día.

3.3.4 Dosis Empleadas ^(1,2,12)

- Tratamiento de Gonorrea y Chancros

Gonorrea: 2 ½ tabletas de 160-800 mg de Trimetoprim y Sulfametoxazol en la mañana y en la noche.

Chancroide: 1 tableta de 160-800 mg de Trimetoprim y Sulfmetoxazol respectivamente dos veces al día durante siete días.

- Infecciones Bacterianas de Vías respiratorias

Bronquitis: Es necesaria la administración de 800 a 1200 mg de Sulfametoxazol y de 160 a 240 mg de Trimetoprim dos veces al día para lograr la disminución de la fiebre, purulencia y volumen de esputo así como las flemas.

- Infecciones del Tubo Digestivo

En adultos se puede aplicar un tratamiento de 800 mg de Sulfametoxazol y 160 mg de Trimetoprim cada 12 horas para combatir la Shigelosis y en algunos casos como auxiliar en el tratamiento de tifoideas.

3.3.5 Efectos Adversos ^(1,2,12)

* Alteraciones Generales: Se han reportado alteraciones de hipersensibilidad tales como fiebre, edema angioneurótico, relaciones anafilácticas.

* Alteraciones cutáneas: Son generalmente leves y fácilmente reversibles tras la suspensión del medicamento.

* Alteraciones Gastrointestinales: Náuseas, estomatitis, diarrea, glositis y casos aislados de enterocolitis.

* Alteraciones Hepáticas: Necrosis hepática, casos raros de hepatitis, colestasis, elevación de transaminasas y bilirrubina.

* Alteraciones del aparato Urinario: Se han reportado casos raros de función renal disminuida, nefritis intersticial, nitrógeno ureico elevado en sangre, pancitopenia o púrpura.

- Alteraciones del Sistema Nervioso: Neuropatía, alucinaciones, uveitis, se han reportado algunos casos raros de meningitis aséptica, ataxia, convulsiones.

Presentaciones Comerciales ^(12,13,15)

En la siguiente tabla, mostramos las presentaciones comerciales de Trimetoprim y Sulfametoxazol.(Ver tabla No. 1).

Tabla No. 1: Presentaciones comerciales de Trimetoprim y Sulfametoxazol.

Nombre Comercial	Forma Farmacéutica	Laboratorio
Bateral	Tabletas, Suspensión	ALLEN
Bactiver	Suspensión	MAVER
Servitrim-F	Tabletas	Novartis Suipharm
Batrizol	Comprimidos, Suspensión	Medimport
Bactropin	Suspensión, Tabletas	Química Son 's
Trimetoger	Suspensión, Tabletas	Streger
Trimexole-F	Tabletas	Rayere
Bactrim Compositum	Suspensión	Roche
Anitrim/Anitrim F	Suspensión, Tabletas	Italmex
Bactrim / Bactrim F	Comprimidos, Suspensión	Roche
Ectaprim F/ Ectaprim	Suspensión, Tabletas	Liomont
Octex	Suspensión	Degot 's
Septrim Familia	Suspensión, Tabletas	GlaxoSmithKline
Trimexazol F	Sol. Inyectable, Suspensión, Tabs.	ICN
Dibaprim F	Tabletas	DIBA
Soltrim	Suspensión	Imp. Manuf. Bruluart
Soltrim	Tabletas	Imp. Manuf. Bruluart

3.4 Sistemas de Clasificación Biofarmacéutica

Los sistemas de clasificación biofarmacéuticos, toman como referencia la solubilidad de los medicamentos en medios acuosos así como también la permeabilidad intersticial a fin de establecer si un medicamento genérico, deberá presentar un protocolo de biodisponibilidad y bioequivalencia ^(3,16,17,18).

Un estudio más completo deberá considerar tres aspectos de suma importancia:

- Grado de disolución
- Solubilidad
- Permeabilidad

Cada uno de estos factores gobiernan, la absorción de los medicamentos y la respuesta fisiológica de las formas farmacéuticas sólidas.

De acuerdo a la clasificación biofarmacéutica, tenemos los siguientes grupos:

<i>Grupo No. 1:</i>	Alta Solubilidad - Alta Permeabilidad
<i>Grupo No. 2:</i>	Baja Solubilidad - Alta Permeabilidad
<i>Grupo No. 3:</i>	Alta Solubilidad - Baja Permeabilidad
<i>Grupo No. 4:</i>	Baja Solubilidad - Baja Permeabilidad

Es posible que las diferencias observadas in vivo entre la velocidad y el alcance de la absorción de un fármaco en dos productos orales sólidos farmacéuticamente equivalentes se deban a diferencias en la disolución del fármaco in vivo. Sin embargo, cuando la disolución in vivo de una forma farmacéutica oral sólida es rápida en relación con el vaciamiento gástrico y el fármaco tiene alta permeabilidad, es poco probable que la velocidad y el alcance de la absorción del fármaco dependan de la disolución y/o el tiempo de tránsito gastrointestinal del fármaco.

Bajo tales circunstancias, es posible que no haga falta la demostración de Biodisponibilidad o Bioequivalencia in vivo para productos medicamentosos que contienen sustancias de la Clase No.1, siempre que los ingredientes activos usados en la forma posológica no afecten significativamente la absorción de los ingredientes activos. Para estos casos las pruebas farmacopéicas constituyen nuestra mejor herramienta.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica constituye una guía y puede ser usada para justificar bioexenciones para sustancias medicamentosas altamente solubles y altamente permeables (Clase No.1), los medicamentos (Clase No.2), la principal herramienta de análisis estará orientada a las pruebas de disolución mientras que los contenidos en el Grupo No. 3 indudablemente deberán presentar protocolos de biodisponibilidad y bioequivalencia.

3.4.1 Criterios de Clasificación

a) Solubilidad:

Una sustancia medicamentosa se considera altamente soluble, cuando la mayor concentración posológica es soluble en 250 mL o menos de medio acuoso en la gama de pH de 1 a 7.5. El cálculo de volumen de 250 mL se deriva de protocolos de estudios de Biequivalencia típicos que prescriben la administración de un producto medicamentoso a voluntarios humanos en condiciones de ayuno con un vaso de agua (aproximadamente 8 onzas).

b) Permeabilidad:

El criterio de permeabilidad es analizado mediante estudios *in vitro* o *in vivo*, cultivo de células o tejidos.

Se clasifica a una alta permeabilidad, cuando el 90 % del principio activo absorbido.

El límite de la clase de permeabilidad se basa indirectamente en la medida de absorción (fracción absorbida) de una sustancia medicamentosa en el hombre y directamente en mediciones de la velocidad de transferencia de masa por la membrana intestinal humana.

c) Disolución:

Se considera que un producto medicamentoso es de disolución rápida cuando no menos del 85 % de la cantidad marcada de la sustancia medicamentosa se disuelve dentro de 30 minutos, usando el Aparato I (Canastas) de la Farmacopea Estadounidense (USP) a 100 rpm o el Aparato II (Paletas) a 50 rpm en un volumen de 900 mL o menos de en cada uno de los siguientes medios:

- HCl 0.1 N o Fluido Gástrico Simulado USP sin enzimas
- Solución Tampón de pH 4.5
- Solución Tampón de pH 6.8
- Fluido Intestinal Simulado USP sin enzimas

3.5 Determinación del Tamaño de Muestra ^(8,19,20)

Como ya lo hemos venido indicando, el principal objetivo de un estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia entre dos formulaciones (Referencia y Prueba), es la demostración de su intercambiabilidad.

Dentro de este tipo de estudios, la pregunta de mayor relevancia resulta estar encaminada al número de individuos necesarios y establecimiento de los tiempos

de muestreo mas apropiados con la finalidad de proveer resultados confiables al investigador.

Por su parte, la determinación del tamaño de muestra es realizada mediante la aplicación de una prueba estadística con la incursión de la hipótesis de equivalencia entre dos formulaciones. Es importante señalar que una hipótesis puede ser considerada como un postulado, suposición ó teoría, la cual es planteada a partir de una idea popular sobre el producto en análisis.

Siempre que se plantea un postulado de este estilo, es importante tomar en consideración las siguientes indicaciones:

- 1) Plantear la hipótesis nula (H_0), la cual será el postulado a cuestionar.
- 2) Seleccionar una hipótesis alterna (H_a), la cual constituye la teoría de interés para el investigador.
- 3) Someter a una prueba estadística cada una de las hipótesis planteadas marcando previamente los límites de aceptación o rechazo para cada premisa evaluada.
- 4) Establecimiento de conclusiones.

Dentro de los trabajos estadísticos desarrollados con la generación de hipótesis, tenemos implícitamente la presencia de dos tipos de error, a saber:

- Error de Tipo I, el cual sucede cuando la hipótesis nula es rechazada cuando esta es verdadera, es denotada como (α).
- Error de Tipo II, el cual sucede cuando no es rechazada la hipótesis nula (H_0) siendo falsa, este error es denotado como (β).

La capacidad o poder de la prueba estadística es definida como la probabilidad de rechazar H_0 cuando es falsa, matemáticamente es denotada como:

$$\Phi = 1 - \beta$$

Considerando cada uno de los errores antes descritos, podemos elegir la hipótesis nula dentro de nuestro estudio:

Regla No. 1:

Cuando la hipótesis nula es elegida con base en la importancia del error de tipo I. Bajo este criterio, el error de tipo I resulta ser más importante que el error de tipo II.

Regla No. 2:

Seleccionar la hipótesis considerando que quisiéramos rechazar H_0 , el propósito de esta regla es trabajar con la hipótesis alterna.

Existen diferentes procedimientos para llevar a cabo la determinación del número de individuos que deberán ser incluidos a un estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia, entre ellos podemos mencionar la prueba de hipótesis puntual ó modelo estándar cruzado 2 X 2.

Esta metodología, realiza una evaluación de los errores de tipo I y tipo II asumiendo que cada secuencia de (n), $n_1 = n_2 = n_c$ proporciona un número de sujetos de muestreo, planteamiento que nos lleva a definir la siguiente ecuación:

$$n_c = 2 \left[t(\alpha/2, 2n-2) + t(\beta, 2n-2) \right]^2 \left[\delta_d / \Delta \right]^2$$

La cual puede ser simplificada a la siguiente ecuación:

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

En donde :

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

El número total de sujetos requeridos para un estudio estándar cruzado 2 X 2 es calculado mediante la ecuación:

$$N = 2 n_c$$

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 4 PARTE EXPERIMENTAL:

El estudio se encuentra dividido en cuatro partes fundamentales, integradas de la siguiente manera;

- a) Desarrollo y Validación del Método Analítico
- b) Análisis de las muestras de los voluntarios
- c) Análisis Estadístico
- d) Determinación de N (número de individuos necesarios para la realización de un estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia) y establecimiento de los tiempos de muestreo.

4.1 Desarrollo del Método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para cuantificar Sulfametoxazol y Trimetoprim en plasma.

4.1.1 Equipo:

- Agitador Vortex Thermolyne Maxi Mix II.
- Balanza Ohaus Standard Analytical Modelo AS 120.
- Potenciometro OAKTON pH 1000 series.
- Baño de Agua Fisher Scientific.
- Membranas de Filtración Millipore de 0.45 µm.
- Micropipetas Eppendorf.
- Micropipeta Repetidora Eppendorf.
- Sistema de Filtración Millipore.
- Sonicador Fisher Scientific FS 20.
- Cromatografo de Líquidos Waters Millenium compuesto por cada uno de los siguientes elementos:
 1. Bomba Cuaternaria con degasificador, modelo 600 Controlled, Waters.
 2. Integrador, paquete computacional Millenium 32 Waters.
 3. Detector UV-VIS, modelo 2487 Waters.
 4. Automuestreador (inyector automático), modelo 717 plus Waters.

4.1.2 Reactivos:

- Acetonitrilo HPLC, J.T. Baker.
- Metanol HPLC, J.T. Baker.
- Acetato de Etilo, J.T. Baker.
- Ácido Perclórico 70%, Merck.
- Fosfato Monobásico de Potasio, J.T. Baker.
- Hidróxido de Potasio, J.T. Baker.
- Sulfametazina, Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Química de la UNAM.
- Agua CLAR, obtenida a partir de agua destilada y desionizada con equipo Mili-Q- Millipore.
- Plasma humano fresco congelado, con etiqueta de sangre segura y resultado negativo de las pruebas de VHI, Hepatitis B y VDRL donado por el Centro Nacional de Transfusión Sanguínea.

4.1.2.1 Sustancia de Referencia:

- Trimetoprim, Cosufar Lote 60A-6.
- Sulfametoxazol, Cosufar Lote 61A-6.

4.1.3 Preparación de Soluciones:

4.1.3.1 Fase Móvil: Solución Amortiguadora de Fosfatos 0.1M, pH 5.9 75 % y Acetonitrilo 25 %

Transferir a un matraz volumétrico de 1 L, 13.60 g de Fosfato Monobásico de potasio, disolver y llevar a volumen con agua grado cromatográfico. Ajustar el pH a 5.9 con solución de hidróxido de potasio 1M.

Transferir a un matraz volumétrico de 1 L, 750 mL de la solución antes preparada y llevar al aforo con acetonitrilo.

Esta solución, deberá ser filtrada al vacío a través de una membrana Millipore de 0.45 μm y degasificada por sonicación al vacío por un periodo de 15 minutos.

4.1.3.2 Solución de Hidróxido de Potasio 1M

Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, 3.61 g de Hidróxido de Potasio, disolver y llevar a volumen con agua.

4.1.3.3 Solución de Ácido Perclórico al 35%

Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, 30 mL de agua. Adicionar lentamente a este matraz, 35 mL de ácido perclórico y llevar a volumen con agua.

4.1.3.4 Estándar Interno (E.I.) de Sulfametazina

Transferir a un matraz volumétrico de 500 mL, el equivalente a 20 mg de Sulfametazina (E.I.), disolver con la mínima cantidad de metanol y llevar a volumen con agua grado cromatográfico.

El Estándar Interno, contiene 40 µg/mL de Sulfametazina.

4.1.3.5 Solución Patrón de Trimetoprim (TMP)

Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, el equivalente a 10 mg de Trimetoprim, disolver y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico. Esta solución contiene 100 µg/mL de Trimetoprim.

4.1.3.6 Disolución de la Solución Patrón de Trimetoprim

Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, 5 mL de la solución de Trimetoprim que contiene 100 µg/mL, llevar a volumen metanol grado cromatográfico y mezclar. Esta solución contiene 5 µg/mL.

4.1.3.7 Solución Patrón de Sulfametoxazol (SMZ)

Colocar en un matraz volumétrico de 100 mL, el equivalente a 10 mg de Sulfametoxazol, disolver y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico. Esta solución contiene 100 µg/mL de Sulfametoxazol.

4.1.4 Preparación de las Curvas Patrón:

4.1.4.1 Preparación de la Curva Patrón para Trimetoprim:

Los estándares de Trimetoprim en plasma a las concentraciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 $\mu\text{g/mL}$, así como las muestras control a las concentraciones de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (muestra de control bajo), 0.75 $\mu\text{g/mL}$ (muestra de control medio) y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (muestras de control alto), fueron preparadas a partir de una solución patrón de Trimetoprim a una concentración 5 $\mu\text{g/mL}$ (ver preparación en 4.1.3.6.), colocando diferentes alícuotas en un tubo de ensayo como se indica en la tabla No.2.

4.1.4.2 Preparación de la Curva Patrón para Sulfametoxazol:

Los estándares de Sulfametoxazol en plasma a las concentraciones de 0.5, 1.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 y 70.0 $\mu\text{g/mL}$, así como las muestras control a las concentraciones de 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (muestra de control bajo), 30.0 $\mu\text{g/mL}$ (muestra de control medio) y 60.0 $\mu\text{g/mL}$ (muestras de control alto), fueron preparadas a partir de una solución patrón de Sulfametoxazol a una concentración 100 $\mu\text{g/mL}$ (ver preparación en 4.1.3.7.), colocando diferentes alícuotas en un tubo de ensayo como se indica en la tabla No.2.

Tabla No. 2: Curva patrón para las soluciones de Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma.

Matraz	μL de TMP (5 $\mu\text{g/mL}$)	μL de SMZ (100 $\mu\text{g/mL}$)	EVAPORACION	Aforo (mL) Plasma	Concentración TMP ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración SMZ ($\mu\text{g/mL}$)
1	10	5		1.0	0.05	0.5
2	20	15		1.0	0.10	1.5
3	40	20		1.0	0.20	2.0
4	50	50		1.0	0.25	5.0
5	100	100		1.0	0.50	10
6	150	300		1.0	0.75	30
7	200	200		1.0	1.00	20
8	400	400		1.0	2.00	40
9	500	600		1.0	2.50	60
10	600	700	1.0	3.00	70	

Después de depositar en un tubo de ensayo con tapón de rosca, las alícuotas de Trimetoprim y Sulfametoxazol correspondientes, evaporamos el metanol presente a 50 °C bajo corriente de Nitrógeno y depositamos 1 mL de plasma (aforo).

4.1.5 Selección de la Longitud de Onda de Máxima Absorción:

A fin de seleccionar la longitud de onda más apropiada para el desarrollo de nuestro estudio, llevamos a cabo un barrido de los principios activos en la región del ultravioleta comprendida entre los 200 y 400 nm.

Las muestras para el barrido fueron preparadas con la ayuda de los estándares correspondientes disueltos con metanol y llevados a su aforo con una solución de HCl 0.1 N, a las concentraciones de 250µg/mL para Trimetoprim y 250µg/mL para Sulfametoxazol.

4.1.6 Selección de la Columna Cromatográfica:

La selección de la columna cromatográfica, constituyó una actividad de gran importancia y la cual estuvo orientada a la elección de la mejor opción de trabajo, la cual nos permitiera obtener parámetros cromatográficos óptimos, tales como:

- Factor de Capacidad > a 2.0
- Simetría de Pico \leq 2.0
- Resolución \geq 2.0

Las columnas cromatográficas probadas fueron las siguientes:

- a) Symmetry Shield™ C₈ 5 µm 3.9 X 150 (Carga de Carbono 12%)
- b) Phenomenex, Ultracarb 50DS(30) 150X4.6, 5µm (Carga de Carbono 31%)
- c) Columna X Terra RP18 5 5µm 4.6 x 250 mm (Carga de Carbono 15%)

4.1.7 Fase Móvil:

Para la selección de este parámetro, llevamos a cabo el desarrollo de diversas pruebas modificando la proporción de Acetonitrilo dentro de un rango del 20 al 25% con respecto a una solución de fosfato de potasio 0.1 M (75 al 80%) con la finalidad de obtener los valores más adecuados para los parámetros cromatográficos (factor de capacidad, simetría de pico y resolución).

Por otro lado, el pH de la mezcla elegida previamente, también fue modificado con la misma finalidad. Los valores probados en la escala de pH fueron; 5.5, 5.8 y 6.2.

4.1.8 Método de Extracción:

Nuestro método de extracción busca cubrir dos puntos de gran importancia, obtener el mayor porcentaje de recobro para cada principio activo así como, minimizar la presencia de impurezas provenientes del plasma.

Para la extracción de los principios activos, se aplicó una técnica de extracción líquido / líquido previa neutralización del plasma con una solución amortiguadora de fosfatos 1M a pH de 6.8.

Los disolventes orgánicos de extracción probados, fueron los siguientes:

- a) Diclorometano
- b) Hexano
- c) Eter
- d) Acetato de Etilo

La capa orgánica fue retirada y evaporada a 50 °C bajo corriente de nitrógeno dentro de un baño de agua, el residuo fue reconstituido en fase móvil antes de ser inyectado.

4.2 Validación del Método Analítico para la Cuantificación del Sulfametoxazol y Trimetoprim en Plasma

Una vez determinado el método (Sección 5.1.3) y las condiciones analíticas (Sección 5.1.2), realizamos la validación correspondiente con la finalidad de generar la base de datos que nos permitiera mostrar la evidencia experimental documentada de que el método se comportaba consistentemente y garantizaba la obtención de resultados confiables.

4.2.1 Validación del Método:

El método analítico fue validado de acuerdo a los parámetros establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, en lo referente a la validación de métodos analíticos para realizar pruebas de biodisponibilidad y bioequivalencia.

4.2.1.1 Linealidad del Método:

La linealidad del método para Trimetoprim fue evaluada mediante la preparación de tres curvas de calibración en plasma durante un día de trabajo y dentro del

rango de concentraciones comprendido entre 0.05 y 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada una de las curvas fueron preparadas partir de soluciones patrón independientes.

De la misma manera, la linealidad del método para Sulfametoxazol fue evaluada mediante la preparación de tres curvas de calibración en plasma durante un día de trabajo y dentro del rango de concentraciones comprendido entre 0.5 y 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las curvas propuestas fueron preparadas a partir de soluciones patrón independientes.

Todas las muestras preparadas fueron procesadas conforme a lo establecido en el método de análisis propuesto e inyectadas en el sistema cromatográfico como se indica en las secciones 5.1.2 y 5.1.3.

La linealidad del método analítico fue definida a partir del coeficiente de correlación (r) obtenido del ajuste de la curva patrón por medio de una regresión lineal mediante mínimos cuadrados. El valor de " r " requerido para cada curva patrón fue de 0.99 o mayor. Dicho análisis fue realizado tratando la relación de alturas, también determinamos la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) de cada curva.

4.2.1.2 Precisión

La precisión del método fue evaluada tomando en consideración los siguientes dos parámetros: repetibilidad y reproducibilidad, analizando tres concentraciones tanto de Trimetoprim como de Sulfametoxazol en plasma diferentes a las concentraciones planteadas para las curvas patrón pero incluidas dentro del rango establecido para cada principio activo en un nivel bajo, medio y alto: 0.2, 0.75 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para Trimetoprim mientras que 2.0, 30.0 y 60.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para Sulfametoxazol.

Para el caso de la repetibilidad del método analítico, los niveles anteriores fueron evaluados por quintuplicado en un mismo día de trabajo a partir de cinco soluciones patrón independientes; mientras que para evaluar la reproducibilidad se analizaron por duplicado durante tres días. Se realizó una curva de calibración para cada día de análisis.

La precisión fue determinada con el coeficiente de variación de las concentraciones recuperadas para cada nivel (Bajo, Medio y Alto), el cual requiere tener un valor menor ó igual al 15%.

4.2.1.3 Exactitud

La exactitud del método fue definida como la desviación absoluta (*Desv. Abs.%*) de los datos de repetibilidad y reproducibilidad con la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\text{Desv. Abs. \%} = 100 \times \frac{| \text{Concentración A} - \text{Concentración R} |}{\text{Concentración A}}$$

En donde:

Concentración A = Concentración Adicionada

Concentración R = Concentración Recuperada

El criterio de aceptación para este parámetro se encuentra establecido en la determinación del promedio de cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad dentro del $\pm 15\%$ de desviación con respecto al valor nominal.

Tanto la precisión como la exactitud del método, fueran evaluadas tratando la relación de alturas de las muestras control como desconocidas e introduciéndolas en la ecuación derivada por la regresión lineal por mínimos cuadrados para obtener los valores de cantidad recuperada.

4.2.1.4 Límite de Cuantificación y Detección

Para determinar estos parámetros, se prepararon por quintuplicado diferentes concentraciones a partir de soluciones patrón independientes.

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

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

4.2.1.5 Selectividad

La selectividad del método fue determinada, analizando muestras de fármacos de uso común (Ácido acetilsalicílico, metamizol, ranitidina, naproxeno, etc) a las

concentraciones plasmáticas reportadas y muestras de plasma conteniendo heparina, evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de Trimetoprim y Sulfametoxazol.

4.2.1.6 Recobro

Para evaluar el recobro se prepararon y procesaron cinco series independientes de muestras de control de calidad en plasma con las concentraciones de 0.2, 0.75 y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ para Trimetoprim y 2.0, 30.0 y 60.0 $\mu\text{g/mL}$ para Sulfametoxazol (nivel bajo, medio y alto en cada caso) y tres series de muestras de fármaco en agua (Ver tabla No.14 y No.15) a las mismas concentraciones.

El recobro fue definido como el porcentaje de Trimetoprim y Sulfametoxazol recuperado después de la extracción de las muestras de la matriz biológica, comparada con un estándar no extraído (muestras en matriz biológica comparadas contra las muestras en solución no sometidas a extracción).

La aceptación de este parámetro, esta dada por un porcentaje de extracción que no necesariamente corresponde al 100% pero que es reproducible en cada nivel de concentración a lo largo del rango de trabajo establecido, para tal fin se determinó la desviación absoluta de los recobros individuales (por nivel de concentración) con respecto al recobro promedio, la desviación no debió ser mayor al 15% para cada caso.

4.2.1.7 Estabilidad

La prueba de estabilidad tuvo como función, determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable dentro de la matriz biológica, durante el manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la respuesta (concentración) del compuesto por analizar.

Fueron evaluados tres niveles de concentración en plasma por duplicado: 0.2, 0.75 y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ para Trimetoprim y 2.0, 30.0 y 60.0 $\mu\text{g/mL}$ para sulfametoxazol (nivel bajo, medio y alto respectivamente en cada caso), bajo condiciones de congelación (-70°C), refrigeración (5°C) y ciclos de congelación-descongelación, así como la estabilidad de la muestra procesada como se indica a continuación:

a) Estabilidad en Congelación a Largo Plazo (-70°C):

Dos series independientes de muestras control para cada principio activo fueron sometidos a la prueba de estabilidad en congelación a largo plazo a -70°C y se analizaron a los 0, 20 y 31 días.

b) Refrigeración:

Para estudiar la estabilidad de Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma bajo condiciones de refrigeración, fueron preparadas dos series independientes de muestras control para cada principio activo, las cuales se conservaron a 5°C y se analizaron a las 0, 6 y 24 horas.

c) Ciclos de Congelación-Descongelación:

Dos series independientes de muestras control, se sometieron a dos ciclos de congelación- descongelación a -70°C y se analizaron a los tiempos 0, 24 y 48 horas.

d) Estabilidad de la muestra procesada:

La estabilidad de la muestra procesada se determinó mediante la preparación por duplicado y con soluciones patrón independientes, muestras de Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma a tres niveles de concentración (nivel bajo, medio y alto), las cuales se sometieron al procedimiento de extracción, se reconstituyeron y se inyectaron al sistema cromatográfico bajo condiciones ambientales del laboratorio. Las muestras permanecieron almacenadas en el automuestreador y se inyectaron a las 0, 20 y 60 horas después de su preparación.

Los principios activos de interés, se consideraron estables bajo cada una de las condiciones antes mencionadas si los resultados obtenidos en cada uno de los casos, presentan una desviación absoluta % comprendida entre el $\pm 15\%$ del valor de concentración obtenido para el tiempo cero de análisis.

4.3 Etapa Clínica

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

4.3.1 Diseño del Estudio

La población en estudio estuvo conformada por ocho individuos, cuatro mujeres y cuatro hombres distribuidos al azar de acuerdo a un diseño cruzado 2 X 2 como se indica en la tabla No.3 y se les administró según el caso, el fármaco A (Medicamento Innovador) o bien, el fármaco B (Medicamento de Prueba) conteniendo Trimetoprim y Sulfametoxazol a una concentración de 80 y 400 mg respectivamente (Tabletas).

Tabla No. 3 Aleatorización de Voluntarios para el Estudio Preliminar de Bioequivalencia de Trimetoprim y Sulfametoxazol.

Sexo	No. De Voluntario	Periodo I Formulación		Periodo II Formulación
Masculino	1	A	Periodo de Lavado	B
	2	A		B
	3	B		A
	4	B		A
Femenino	5	A		B
	6	B		A
	7	B		A
	8	A		B

4.3.2 Selección de Voluntarios

De acuerdo con los lineamientos dispuestos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud, todos los sujetos incluidos en el estudio, participaron de manera voluntaria y contaron con información referente al fármaco que les fue administrado, los fines del estudio, los efectos secundarios del fármaco y las indicaciones a seguir durante la realización del mismo.

Cada uno de los voluntarios firmó una carta de consentimiento y aceptación.

Todas las muestras fueron obtenidas de sujetos clínicamente sanos, comprobado mediante los exámenes de laboratorio que se mencionan a continuación:

- Biometría Hemática Completa
- Química sanguínea: Urea, Creatina, TGO (AST) y TGP (ALT) así como Glucosa.

- Marcadores para Hepatitis B y C
- Detección de VHI
- Examen General de Orina
- Pruebas de Detección de Drogas de Abuso (ABUSIGN) al ingreso del Estudio
- Prueba de Embarazo (Cuando esta aplique)

Criterios de Inclusión para los Voluntarios:

- Se incluyeron solamente voluntarios sanos, con edades entre 18 y 40 años
- El índice de masa corporal para los sujetos sanos del sexo femenino deberá estar entre 18.5 y 29 mientras que para los voluntarios sanos del sexo masculino entre 19 y 30.
- Los voluntarios mantienen un buen estado de salud determinado por los resultados de una historia clínica completa realizada por los médicos de la Unidad de Farmacología Clínica y los estudios de laboratorio y gabinete en los Laboratorios del Hospital Español.
- Los voluntarios no deberán ingerir ningún medicamento(s), previo al estudio y hasta completarlo (si el voluntario ha tomado algún medicamento antes de iniciar el estudio, se deberá dejar pasar un periodo de por lo menos cuatro vidas medias del medicamento ingerido). No consumir alcohol, tabaco, café o bebidas de cola por lo menos 48 horas antes del estudio o durante el mismo.

Criterios de Exclusión para los Voluntarios:

- Individuos que presentaron sensibilidad o alergia a Trimetoprim y/o Sulfametoxazol
- Sujetos que presentaron alguna alteración en sus signos vitales
- Individuos que presentaron trastornos gastrointestinales, hipertensión arterial e insuficiencia renal o hepática
- Sujetos que mostraron antecedentes de drogadicción o de abuso de fármacos
- Sujetos que revelaron resultados positivos en la prueba de embarazo o al estudio cualitativo de fármacos de abuso en orina
- Individuos con un padecimiento medico actual o pasado que pudiera afectar el comportamiento farmacodinámico o farmacocinético de Trimetoprim y/o Sulfametoxazol.
- Sujetos alérgicos a cualquier antibiótico y/o a los analgésicos

4.3.3 Procedimiento

Los voluntarios sanos fueron administrados en la Unidad de Farmacología Clínica del Hospital Español en el turno matutino, permaneciendo internados durante un día.

Una vez ingresados los voluntarios y asignado su lugar dentro del estudio, se verificaron los signos vitales y se realizaron las pruebas cualitativas de fármacos de abuso y embarazo (cuando esta aplicó).

Los individuos se mantuvieron en sus camas respectivas en decúbito y fueron canalizados mediante un catéter en alguna de las venas del brazo.

De manera aleatoria, los voluntarios sanos fueron distribuidos en dos grupos de tratamiento:

Grupo A. Recibió una tableta de Trimetoprim – Sulfametoxazol de 80/400 mg respectivamente, por vía oral del producto innovador. Lote X95693.

Grupo B. Recibió una tableta de Trimetoprim – Sulfametoxazol de 80/400 mg respectivamente, por vía oral del producto de prueba. Lote 001050.

Ambos grupos fueron tratados bajo condiciones de ayuno. La ingesta del medicamento fue considerada como el tiempo cero y el medicamento fue ingerido después de por lo menos 10 horas de ayuno, dos horas antes del desayuno y con 250 mL de agua.

Los tiempos de muestreo fueron: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 8, 12, 24 y 48 horas después de la administración del medicamento. Por medio de un catéter localizado en el brazo se obtuvieron 10 mL de sangre mediante tubos Vacutainer que contenían heparina como anticoagulante. Las muestras se enfriaron durante 5 minutos en hielo escarchado y se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 minutos para finalmente almacenarlas a -20°C hasta su análisis.

4.4 Análisis de las Muestras Plasmáticas

Las muestras plasmáticas fueron analizadas empleando un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) descrito en la sección 5.1.2. y previamente validado de acuerdo a los parámetros establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, en lo referente a la validación de métodos analíticos para realizar pruebas de biodisponibilidad y bioequivalencia.

4.4.1 Adecuabilidad del Sistema

La evaluación de la adecuabilidad del sistema cromatográfico y monitoreo de la columna se realizó mediante la preparación de una solución que contenía los dos fármacos de interés disueltos en el disolvente de reconstitución de las muestras, a una concentración comprendida dentro del rango de trabajo.

Esta solución fue dividida en alícuotas de 3 mL y se almacenó en congelación a -70°C . Al inicio de cada día de trabajo, se descongeló una de las alícuotas y se realizaron inyecciones consecutivas de 20 μL .

El sistema se considero adecuado cada vez que cumplía con los siguientes parámetros:

Tabla No. 4: Parámetros de Adecuabilidad del Sistema

Parámetro	Criterio
Repetibilidad (Altura de Pico)	≤ 2.0 para $N = 6$
Repetibilidad (Tiempo de Retención)	≤ 2.0 para $N = 6$
Factor de Capacidad (k')	≥ 2.0
Simetría de Pico (USP)	≤ 2.0
Platos Teóricos (N)	≥ 2000
Resolución	≥ 2.0

En cada día de trabajo se monitoreo el comportamiento de la columna cromatográfica mediante la cuantificación de la altura del pico promedio de Trimetoprim y Sulfametoxazol, verificándose que este no disminuyera mas del 20% con respecto al valor promedio obtenido en la primera evaluación de adecuabilidad del sistema.

4.4.2 Curva de Calibración

Las curvas de calibración se prepararon antes del estudio y se almacenaron a -70°C para ser descongeladas y procesadas antes de cada corrida analítica.

Una vez evaluada la adecuabilidad del sistema, se procesó una curva de calibración la cual estaba constituida por 7 concentraciones diferentes tanto para Trimetoprim como para Sulfametoxazol dentro del intervalo comprendido entre 0.05 a 3.0 µg/mL y de 0.5 a 70 µg/mL respectivamente.

Dicha curva fue considerada aceptable si al menos el 80% de los valores de las concentraciones estándar utilizados, se encontraban dentro del límite del $\pm 15\%$ con respecto a su valor nominal a excepción del límite de cuantificación (20%) y el valor del coeficiente de correlación "r" fuera ≥ 0.99 . Cada día de análisis se procesaron las muestras plasmáticas provenientes de los voluntarios.

4.4.3 Puntos de las Muestras Control

Las muestras control, fueron preparadas antes del estudio y se almacenaron a -70°C para ser descongeladas y procesadas junto con las muestras de voluntarios. Cada día de trabajo se procesó una serie de muestras control por duplicado a tres niveles de concentración (Nivel bajo, medio y alto) para cada fármaco. 0.2, 0.75 y 2.5 µg/mL para Trimetoprim y 2.0 30 y 60 µg/mL para Sulfametoxazol.

Cada corrida analítica fue aceptada si al menos el 67% de los valores de control de calidad se encuentran dentro del límite $\pm 20\%$ de los valores esperados y que por lo menos el 50% de las muestras de control de calidad para cada nivel de concentración estén dentro del criterio del $\pm 20\%$ con respecto a su valor nominal.

4.4.4 Método de Procesamiento

El integrador computacional Millennium 2010 de Waters S.A. será utilizado para determinar las alturas de Trimetoprim, Sulfametoxazol y Sulfametazina (Estándar interno).

La relación de alturas Trimetoprim/E.I. y Sulfametoxazol/E.I. y las concentraciones de los estándares (x), fueron ajustados por medio de un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $y = b + mx$, en donde "b" constituye la ordenada al origen y "m" corresponde a la pendiente de la curva de calibración. Para cuantificar las muestras del estudio, la relación de alturas Trimetoprim/E.I. y Sulfametoxazol/E.I. fueron convertidas a concentración empleando los parámetros estadísticos generados.

Las concentraciones de las muestras por debajo del límite de cuantificación (tomando en cuenta la variabilidad máxima permitida del $\pm 20\%$), no se incluyeron en los cálculos.

4.4.5 Criterios de Aceptación de una Corrida Analítica

La validez de cada corrida durante el procesamiento de las muestras, fue determinada examinando los resultados de la linealidad de las muestras control. Una corrida analítica será aceptada si:

- a) No menos de dos puntos de la curva de calibración (constituida por seis o mas valores), se encuentran fuera del límite del $\pm 15\%$ con respecto a su valor nominal (después de recalcular), a excepción del límite de cuantificación ($\pm 20\%$).
- b) Si el valor del coeficiente de correlación "r" es ≥ 0.99
- c) Si al menos el 67% de los valores de control de calidad se encuentran dentro del límite $\pm 20\%$ de los valores esperados y que por lo menos el 50% de las muestras de control de calidad para cada nivel de concentración estén dentro del criterio del $\pm 20\%$ con respecto a su valor nominal. Las concentraciones para las muestras de control de calidad baja, media y alta deberán ser las mismas que las empleadas durante la validación del método.
- d) Si no más del 25% del total de muestras analizadas en la corrida presentan una simetría en los picos cromatográficos de interés mayor a 2 (calculado con el integrador Millennium 2010 de Waters S.A. y bajo el método USP), repitiéndose el análisis de aquellas muestras que no cumplan con dicho criterio.

4.4.6 Análisis Farmacocinético

Se graficaron los perfiles de concentración contra tiempo de muestreo para cada voluntario (Apéndice II y Apéndice IV), con la finalidad de obtener cada uno de los parámetros farmacocinéticos, los cuales fueron calculados utilizando el paquete computacional Biopak ® 2.0:

- a) Área Bajo la Curva de concentración plasmática desde la administración hasta el último tiempo " t " ($ABC_{0 \rightarrow t}$), el cual fue calculado mediante la aplicación del método trapezoidal.
- b) Área Bajo la Curva de concentración plasmática extrapolada desde el tiempo " t " a infinito ($ABC_{t \rightarrow \infty}$), el cual fue determinado dividiendo la última concentración plasmática entre la pendiente terminal (BETA).

- c) Área Bajo la Curva de concentración plasmática desde la administración (tiempo cero) a infinito ($ABC_{0 \rightarrow \infty}$) fue calculada sumando el ($ABC_{0 \rightarrow t}$) más ($ABC_{t \rightarrow \infty}$).
- d) La concentración plasmática máxima (C_{max}) fue determinada directamente de la curva de concentración plasmática contra tiempo.
- e) El tiempo al cual se alcanza la concentración plasmática máxima (T_{max}) fue determinado directamente de la curva de concentración plasmática contra tiempo.
- f) La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) el cual fue obtenido del ajuste log-lineal por mínimos cuadrados de la porción terminal de las curvas de concentración plasmáticas contra tiempo.

4.4.7 Análisis Estadístico

Para realizar el análisis estadístico sobre los parámetros farmacocinéticos de ABC, C_{max} , T_{max} y $T_{1/2}$, empleamos el programa computacional Biopak ® 2.0. Para evaluar la bioequivalencia de ambos productos se estimaron los intervalos de confianza clásicos, intervalos de Westlake, Prueba de Shürmann y el valor de probabilidad de Anderson – Hauck.

4.5 Determinación del Tamaño de Muestra

En la determinación del tamaño de muestra por el procedimiento de hipótesis puntual en un estudio estándar cruzado 2X2, considerando en los cálculos la regla 80/20, con una probabilidad del 80% a partir de la cual, se genera la siguiente ecuación:

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

En donde:

α corresponde al símbolo convencional de la probabilidad de un error tipo I, conocido con un valor de 0.05

β corresponde al símbolo de la probabilidad de un error de tipo II, conocido con un valor de 0.2

(2n-2) son los grados de libertad

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

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

En donde:

CME corresponde al cuadrado medio del error después de aplicar un análisis de varianza.

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

El total de sujetos requeridos para un diseño cruzado 2X2 fue calculado con:

$$N = 2 n_c \dots\dots\dots 3$$

**RESULTADOS Y
ANÁLISIS DE RESULTADOS**

CAPÍTULO 5 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Desarrollo del Método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para Cuantificar Sulfametoxazol y Trimetoprim en Plasma

5.1.1 Longitud de Onda de Trabajo:

Con la finalidad de erradicar posibles interferencias durante la fase de cuantificación debido a que Trimetoprim y Sulfametoxazol presentan zonas de máxima absorción cercanas, el estudio fue realizado a 230 nm, longitud de onda a la cual no presentan su máximo de absorción pero logramos excelentes resultados.

En figura 4, podemos observar el comportamiento de los activos durante el barrido realizado a partir de los 200 nm y hasta 400 nm. (Ver figura 4.)

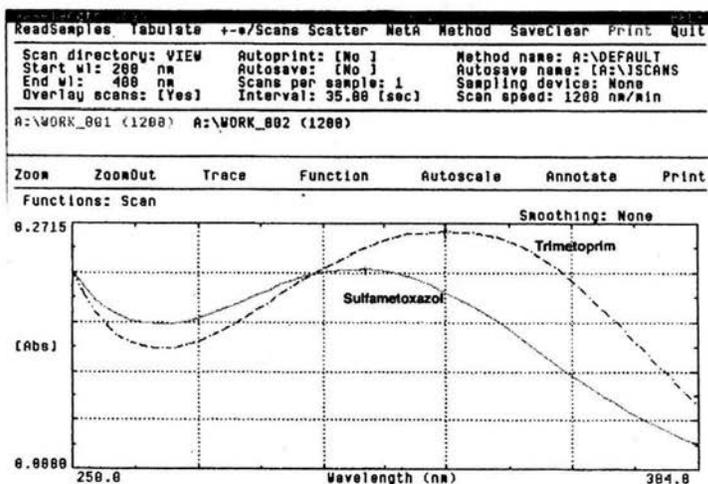


Figura 4 Espectro Ultravioleta de Sulfametoxazol y Trimetoprim. Espectro correspondiente al barrido desde 200 nm hasta 400 nm.

5.1.2 Condiciones Cromatográficas:

De manera muy concreta, en la tabla No.5, mostramos las condiciones cromatográficas para realizar el análisis de cada una de las muestras que integraron el estudio:

Tabla No. 5: Condiciones Comatográficas Finales

Bomba	Bomba cuaternaria con degasificador, modelo 600 Controlled, Waters.
Integrador	Paquete computacional Millenium, 32 Waters
Detector	Detector UV-VIS, Modelo 2487 de Waters a una longitud de onda de 230 nm.
Columna	Columna Phenomenex, Ultracarb 50DS (30) 150X4.6 nm, 5µm.
Automuestreador	Inyector automático, modelo 717 plus de Waters
Fase Móvil	Solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 5.9 : acetonitrilo 75:25 v/v respectivamente.
Volumen de inyección	20 µL
Velocidad de Flujo	Flujo de 0.8 mL/min.
Tiempo de la Corrida	10 min

Los valores obtenidos para los parámetros cromatográficos evaluados a las condiciones establecidas se muestran en la tabla No. 6:

Tabla No. 6: Parámetros Cromatográficos Finales

Parámetro Cromatográfico	Trimetoprim	(E.I.) Sulfametazina	Sulfametoxazol
Tiempos de retención (minutos)	4.167	6.500	8.833
Factor de capacidad (K')	3.200	5.843	7.667
Asimetría	1.293	1.054	1.099
Resolución		7.081	5.069

5.1.3 Método de extracción:

De nuestro método de extracción líquido - líquido, existen diversos comentarios los cuales planteamos a continuación:

- Con este método de extracción (Ver Figura 5) logramos obtener los mejores valores de recobro, debido a que al agregar la solución amortiguadora de fosfatos 1M a pH 6.8, los principios activos se encuentran en su forma no ionizada por tal motivo al agregar el disolvente orgánico (Acetato de etilo), la extracción de los componentes pudo efectuarse.
- La temperatura de evaporación fue establecida a 50 °C bajo una corriente de Nitrógeno gaseoso. Emplear un baño de agua para realizar la operación.
- El proceso de reconstitución de la muestra fue llevado a cabo con 100 µL de fase móvil (Mezcla de Solución Amortiguadora de Fosfatos 0.1 M a pH 5.9 y Acetonitrilo 75:25 respectivamente).
- Una vez reconstituida la muestra, aplicamos un proceso de centrifugación para finalmente inyectar 20 µL del sobrenadante y realizar el estudio correspondiente.

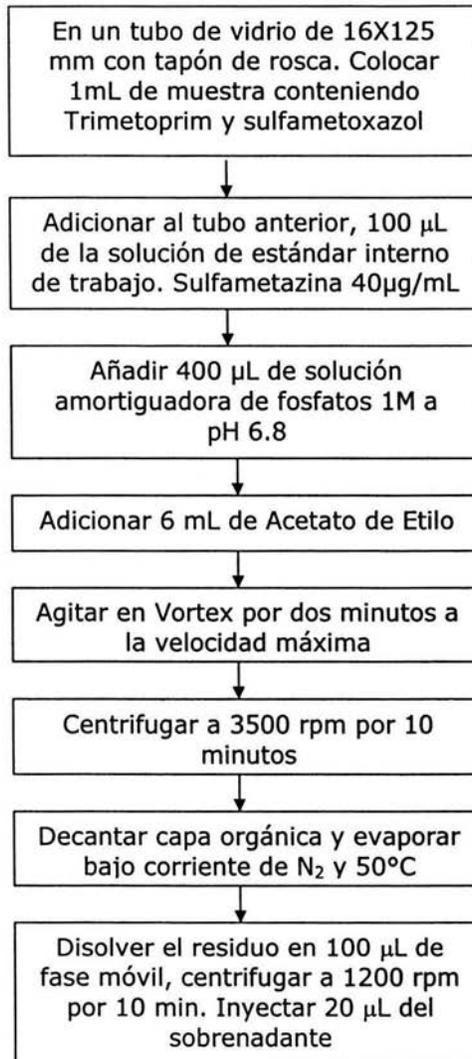


Figura 5 Proceso de extracción líquido – líquido empleado durante el análisis de las concentraciones plasmáticas de Sulfametoxazol y Trimetoprim.

5.2 Validación del Método Analítico para Cuantificar Trimetoprim y Sulfametoxazol en Plasma

Una vez establecidas cada una de las condiciones de análisis, realizamos la validación del método analítico para la cuantificación de Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma, en los siguientes apartados mostramos cada uno de los resultados obtenidos.

5.2.1 Linealidad del Método

A continuación, mostramos cada uno de los resultados obtenidos durante el estudio de la linealidad del método para la cuantificación de Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma.

La linealidad del método fue definida a partir del coeficiente de correlación (r) obtenido mediante el ajuste de la curva patrón por medio de una regresión lineal aplicando el método de mínimos cuadrados.

El valor requerido para cada curva patrón fue de 0.99 o mayor. La linealidad fue evaluada tratando la relación de alturas de los estándares de la curva patrón como desconocidos e introduciéndolos en la ecuación derivada por la regresión lineal por mínimos cuadrados para obtener los valores de "cantidad recuperada".

Para el principio activo Trimetoprim, el método fue lineal en el rango de concentraciones de 0.05 a 3 $\mu\text{g/mL}$, cada uno de los valores obtenidos de " r " fueron de 0.99 o mayores. El valor promedio para la pendiente (m) fue de 1.00 y para la ordenada al origen (b) fue de -0.0004 .

En la tabla No. 7, mostramos cada uno de los valores para linealidad del método durante la cuantificación de Trimetoprim en plasma, mientras que la Figura 6, muestra la curva promedio correspondiente.

Para Sulfametoxazol, el método fue lineal en el rango de concentraciones de 0.5 a 70 $\mu\text{g/mL}$, todos los valores de " r " obtenidos fueron de 0.9999 o mayores. El valor promedio para la pendiente (m) fue de 1.00 y para la ordenada al origen (b) fue de -0.0017 .

La tabla No. 8, muestra los resultados de la linealidad del método para la cuantificación de Sulfametoxazol en plasma, mientras que la Figura 7, muestra la curva promedio correspondiente.

Tabla No. 7: Resultados correspondientes a la linealidad del método para cuantificar Trimetoprim en plasma.

Concentración Nominal $\mu\text{g/mL}$	Curva 1 Concentración Recuperada $\mu\text{g/mL}$	Curva 2 Concentración Recuperada $\mu\text{g/mL}$	Curva 3 Concentración Recuperada $\mu\text{g/mL}$	Promedio Concentración Recuperada $\mu\text{g/mL}$	D.E	C.V %
0.05	0.051	0.058	0.041	0.050	0.008	17.09
0.10	0.102	0.104	0.094	0.100	0.005	5.29
0.25	0.262	0.255	0.247	0.255	0.007	2.95
0.50	0.475	0.504	0.484	0.488	0.015	3.04
1.00	1.002	0.995	0.979	0.992	0.012	1.19
2.00	2.017	1.950	2.135	2.034	0.094	4.60
3.00	2.991	3.034	2.921	2.982	0.057	1.90
Pendiente (m)	0.99997	1.00014	1.00016			
Ordenada (b)	0.00003	-0.00014	-0.00001			
(r)	0.99992	0.99975	0.99832			

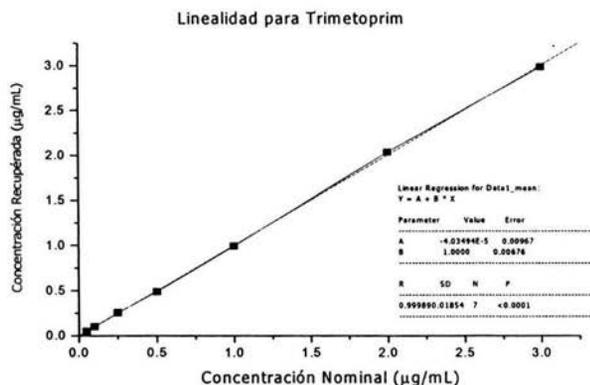


Figura 6 Gráfica correspondiente a la linealidad del método para la cuantificación de Trimetoprim en plasma.

Tabla No. 8: Resultados correspondientes a la linealidad del método para cuantificar Sulfametoxazol en plasma.

Concentración Nominal µg/mL	Curva 1 Concentración Recuperada µg/mL	Curva 2 Concentración Recuperada µg/mL	Curva 3 Concentración Recuperada µg/mL	Promedio Concentración Recuperada µg/mL	D.E	C.V %
0.50	0.450	0.400	0.490	0.447	0.045	10.09
1.50	1.420	1.540	1.550	1.503	0.072	4.81
5.00	5.010	4.840	5.100	4.983	0.132	2.65
10.00	9.890	10.290	10.000	10.060	0.207	2.05
20.00	19.660	19.930	19.600	19.730	0.176	0.89
40.00	41.050	40.010	40.340	40.467	0.531	1.31
70.00	69.520	69.980	69.910	69.803	0.248	0.35
Pendiente (m)	1.00010	0.99998	1.00002			
Ordenada (b)	-0.00215	-0.00100	-0.00185			
(r)	0.99981	0.99998	0.99996			

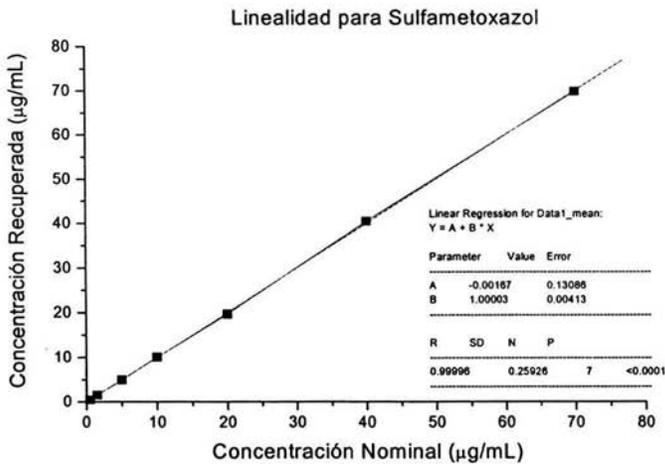


Figura 7 Gráfica correspondiente a la linealidad del método para la cuantificación de Sulfametoxazol en plasma.

5.2.2 Precisión y Exactitud del Método:

5.2.2.1 Repetibilidad:

Tanto la precisión como la exactitud fueron evaluadas tratando la relación de alturas de las muestras control como desconocidas e introduciéndolas en la ecuación derivada por regresión lineal por mínimos cuadrados para obtener los valores de la "cantidad recuperada".

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

En la tabla No. 9, podemos observar los resultados correspondientes a la repetibilidad para Trimetoprim, en los que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados, presentaron valores de variación menores al 4 % con respecto al valor nominal, mientras que la desviación

absoluta (Desv.Abs. %) en los niveles de concentración estudiados fue menor o igual al 2.88%.

Tabla No. 9: Resultados correspondientes a la repetibilidad del método analítico para cuantificar Trimetoprim en plasma.

Muestra	Cantidad Recuperada (µg/mL)	Cantidad Recuperada (µg/mL)	Cantidad Recuperada (µg/mL)
1	0.214	0.731	2.436
2	0.196	0.750	2.494
3	0.203	0.721	2.462
4	0.200	0.711	2.490
5	0.200	0.729	2.446
Promedio	0.203	0.728	2.465
D.E.	0.007	0.014	0.026
C.V. %	3.38	1.98	1.05
Cantidad adicionada (µg/mL)	0.20	0.75	2.5
Des.Abs.%	1.30	2.88	1.38

Para el caso de Sulfametoxazol, se observa que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados, mostraron un valor igual ó menor a 7.82%, en tanto que la desviación absoluta (Desv. Abs. 100%) en los niveles de concentración estudiados fue igual o menor al 3.0%. (Ver tabla No.10).

Tabla No. 10: Resultados correspondientes a la repetibilidad del método analítico para cuantificar Sulfametoxazol en plasma.

Muestra	Cantidad Recuperada (µg/mL)	Cantidad Recuperada (µg/mL)	Cantidad Recuperada (µg/mL)
1	2.200	32.200	61.900
2	1.900	30.801	58.900
3	1.901	29.700	56.202
4	1.904	28.300	58.103
5	1.805	30.300	59.503
Promedio	1.940	30.260	58.920
D.E.	0.152	1.433	2.079
C.V. %	7.82	4.74	3.53
Cantida adicionada (µg/mL)	2	30	60
Des.Abs.%	3.00	0.87	1.80

5.2.2.2 Reproducibilidad

En las tablas No.11 y No.12, se muestran los resultados correspondientes a la reproducibilidad del método, tanto para Trimetoprim como para Sulfametoxazol, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo fue de 6 y 11 % como máximo respectivamente para cada principio activo.

La desviación absoluta % fue menor a 6 para Trimetoprim y menor a 5 para Sulfametoxazol, en cada una de las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla No. 11: Resultados correspondientes a la reproducibilidad del método analítico para cuantificar Trimetoprim en plasma.

Día	Replica Número	Cantidad Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Cantidad Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Cantidad Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)
1	1	0.214	0.731	2.436
	2	0.196	0.750	2.494
2	1	0.212	0.802	2.523
	2	0.210	0.772	2.560
3	1	0.215	0.671	2.500
	2	0.220	0.746	2.365
Promedio		0.211	0.745	2.479
D.E.		0.008	0.044	0.069
C.V. %		3.86	5.90	2.79
Cantidad Adicionada ($\mu\text{g/mL}$)		0.20	0.75	2.50
Desv.Abs.%		5.58	0.62	0.81

Tabla No. 12: Resultados correspondientes a la reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de Sulfametoxazol en plasma.

Día	Replica Número	Cantidad Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Cantidad Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Cantidad Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)
1	1	2.214	32.170	61.852
	2	1.936	30.769	58.886
2	1	1.629	31.972	58.936
	2	1.737	33.083	61.784
3	1	1.916	27.088	58.324
	2	2.017	28.724	57.731
Promedio		1.908	30.634	59.585
D.E.		0.207	2.297	1.784
C.V. %		10.83	7.50	2.99
Cantidad Adicionada ($\mu\text{g/mL}$)		2	30	60
Desv.Abs.%		4.59	2.11	0.69

De acuerdo a los resultados anteriores, el método se consideró reproducible tanto para Trimetoprim como para Sulfametoxazol ya que el coeficiente de variación en cada caso, cumplen con el criterio establecido de ser menor al 15%, mientras que la desviación absoluta también fue menor al 15% en los tres niveles de concentración evaluados. Por lo tanto el método fue considerado preciso y exacto.

5.2.3 Límite de Cuantificación:

La sensibilidad del Método Analítico, fue determinada como la concentración mínima cuantificable (CMC) o límite de cuantificación (LC).

El límite de cuantificación fue la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal (cantidad adicionada) con un coeficiente de variación no mayor que el 20%.

Para Trimetoprim, el límite de cuantificación fue de 0.05 $\mu\text{g/mL}$ mientras que para Sulfametoxazol, fue de 0.25 $\mu\text{g/mL}$.

En este nivel de análisis, la precisión interdía fue de 16.87 % y 10.95 % mientras que la exactitud (desviación absoluta %) fue de 0.06 y 4.14 para Trimetoprim y Sulfametoxazol respectivamente.

5.2.4 Límite de Detección:

El límite de Detección (LD), fue determinado como la concentración contenida en la matriz biológica, que proporciona una respuesta tres veces mayor al nivel de ruido.

El límite de detección para Trimetoprim fue de 0.013 $\mu\text{g/mL}$ y para Sulfametoxazol fue de 0.05 $\mu\text{g/mL}$.

5.2.5 Selectividad:

La selectividad del método fue determinada, analizando muestras identificadas como blanco de la matriz biológica (plasma) provenientes de cada voluntario (muestra pre-dosis), muestras de fármacos de uso común y muestras de plasma obtenidos con diferentes anticoagulantes, evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de Trimetoprim, Sulfametoxazol y Estándar Interno (E.I.).

En la tabla No. 13, se muestran los valores obtenidos en la determinación de la selectividad del método.

Tabla No. 13: Selectividad del Método Analítico para cuantificar Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma.

Fármaco	Concentración (µg/mL)	Tiempo de Retención (min)	Área de Pico	Altura de Pico
Trimetoprim	0.75	4.167	446294	35512
Sulfametoxazol	30	8.833	7523036	449711
Sulfametazina (E.I)	10	6.500	1181559	68866
Ranitidina	100	5.633	65339	4275
Metamizol	100	--	--	--
Ac. Acetilsalicílico	150	--	--	--
Mebendazol	100	--	--	--
Naproxeno	100	5.617	112345	7593
Ampicilina	10	--	--	--
EDTA	15% (0.081 mL)	--	--	--
Citrato de Sodio	0.105 M (1.25 mL)	--	--	--
Heparina	143 U (USP)	--	--	--
Blanco de Plasma	--	--	--	--

Nota:

(--), Se refiere a las concentraciones No Detectables.

Como podemos observar, los fármacos y anticoagulantes probados no interfieren con los tiempos de retención de los principios activos de interés, por lo que el método desarrollado para la cuantificación de Trimetoprim y Sulfametoxazol es selectivo.

5.2.6 Recobro:

El recobro fue definido como el porcentaje de Trimetoprim y/o Sulfametoxazol recuperado después de la extracción de las muestras de la matriz biológica, comparada con un estándar no extraído.

Durante la validación, el recobro de Trimetoprim fue mayor ó igual al 70 % para cada una de las concentraciones de trabajo: 0.2 µg/mL (nivel bajo), 0.75 µg/mL (nivel medio) y 2.5 µg/mL (nivel alto).

Mientras que para Sulfametoxazol, el recobro fue mayor al 96 % para cada una las concentraciones evaluadas: 2.0 µg/mL (nivel bajo), 30.0 µg/mL (nivel medio) y 60 µg/mL (nivel alto). Los resultados se presentan en las tablas No.14 y No.15.

Para ambos principios activos, la técnica de extracción empleada para muestras plasmáticas, permite obtener resultados homogéneos en cuanto a las concentraciones recuperadas, por lo tanto el procedimiento de extracción es eficiente.

El criterio de aceptación para el recobro de cada principio activo, se encuentra determinado básicamente por la homogeneidad de los resultados en cada nivel de concentración mientras que el recobro marcado como promedio global, deberá tener un coeficiente de variación (CV) menor o igual al 15 % para cada muestra procesada.

T abla No. 14: Resultados correspondientes al recobro obtenido para Trimetoprim una vez aplicado el procedimiento de extracción.

Estándar	Estándar en Plasma (extraído) Altura de Pico	Estándar en Agua (No extraído) Altura de Pico	Recobro %	Desviación %
Control Alto 2.5 µg/mL	210145	279474	70.8	0.7
	196259	279937		
	190891	270835		
	186872	275339		
	190598	271176		
Promedio	194953	275352.2		
Control Medio 0.75 µg/mL	59890	85288	70.0	1.8
	59050	86789		
	61490	84871		
	54929	81984		
	58347	80391		
Promedio	58741.2	83864.6		
Control Bajo 0.2 µg/mL	14857	22299	73.0	2.4
	14728	22015		
	16311	21326		
	17002	20334		
	15307	21113		
Promedio	15641	21417.4		
Promedio global			71.3	
%C.V.			2.2	

Tabla No. 15: Resultados correspondientes al recobro obtenido para Sulfametoxazol una vez aplicado el procedimiento de extracción.

Estándar	Estándar en Plasma (extraído) Altura de Pico	Estándar en Agua (No extraído) Altura de Pico	Recobro %	Desviación %
Control Alto 60 µg/mL	1127683	1052971	96.3	0.7
	979571	1035658		
	921248	1020517		
	921369	1011807		
	979589	998363		
Promedio	985892	1023863.2		
Control Medio 30 µg/mL	558347	535225	97.9	0.9
	513136	542804		
	535618	538488		
	462789	515762		
	513491	506285		
Promedio	516676.2	527712.8		
Control Bajo 2µg/mL	33499	35638	96.9	0.1
	31768	34718		
	34263	34353		
	35016	31875		
	29465	32753		
Promedio	32802.2	33867.4		
Promedio global			97.0	
% C.V.			0.83	

5.2.7 Estabilidad de las Muestras:

- Estabilidad en Refrigeración

En las tablas No.16 y No.17, se muestran los resultados correspondientes al análisis de las muestras de plasma almacenadas a temperatura en refrigeración a 5°C.

Tabla No. 16: Resultados correspondientes a la estabilidad de Trimetoprim en Refrigeración a 5°C

Tiempo Cero (0)			
Nivel de Estándar	Bajo 0.2 µg/mL	Medio 0.75 µg/mL	Alto 2.5 µg/mL
	0.19	0.69	2.48
	0.20	0.71	2.35
Promedio	0.19	0.70	2.41
Tiempo 6 Horas			
Nivel de Estándar	Bajo 0.2 µg/mL	Medio 0.75 µg/mL	Alto 2.5 µg/mL
	0.19	0.69	2.43
	0.21	0.69	2.32
Promedio	0.20	0.69	2.38
DesvAbs %	1.32	1.99	1.53
Tiempo 24 Horas			
Nivel de Estándar	Bajo 0.2 µg/mL	Medio 0.75 µg/mL	Alto 2.5 µg/mL
	0.19	0.68	2.43
	0.19	0.69	2.48
Promedio	0.19	0.69	2.45
DesvAbs %	0.96	2.50	1.66

Como podemos observar, la desviación absoluta es menor al $\pm 15\%$ con respecto al valor original hasta las primeras 24 horas, por lo que se considera que Trimetoprim es estable a una temperatura de 5°C.

Tabla No. 17: Resultados correspondientes a la estabilidad de Sulfametoxazol en Refrigeración a 5°C

Tiempo Cero (0)			
Nivel de Estándar	Bajo 2 µg/mL	Medio 30 µg/mL	Alto 60 µg/mL
	2.17	29.26	58.33
	2.14	29.16	60.51
Promedio	2.15	29.21	59.42
Tiempo 6 Horas			
Nivel de Estándar	Bajo 2 µg/mL	Medio 30 µg/mL	Alto 60 µg/mL
	2.15	29.93	59.24
	2.14	29.94	61.05
Promedio	2.15	29.94	60.15
DesvAbs %	0.34	2.49	1.23
Tiempo 24 Horas			
Nivel de Estándar	Bajo 2 µg/mL	Medio 30 µg/mL	Alto 60 µg/mL
	2.10	29.56	58.75
	2.30	29.35	59.67
Promedio	2.20	29.45	59.21
DesvAbs %	2.21	0.82	0.35

Las muestras de Sulfametoxazol fueron estables durante las primeras 24 horas a una temperatura de 5°C.

- Estabilidad a Largo Plazo (-70°C):

En las tablas No.18 y No.19, se muestran los resultados del análisis de las muestras sometidas a la evaluación de la estabilidad a largo plazo a -70°C. Como se puede observar, los valores obtenidos se encuentran por debajo del límite correspondiente al $\pm 15\%$ de desviación del valor original, por lo que Trimetoprim y Sulfametoxazol son estables a -70°C durante 31 días.

Tabla No. 18: Resultados correspondientes a la estabilidad a largo plazo para Trimetoprim a -70°C

Tiempo Cero (0)			
Nivel de Estándar	Bajo 0.2 µg/mL	Medio 0.75 µg/mL	Alto 2.5 µg/mL
	0.20	0.74	2.46
	0.20	0.74	2.53
Promedio	0.20	0.74	2.49
Tiempo 20 Días			
Nivel de Estándar	Bajo 0.2 µg/mL	Medio 0.75 µg/mL	Alto 2.5 µg/mL
	0.20	0.79	2.61
	0.20	0.77	2.55
Promedio	0.20	0.78	2.58
DesvAbs %	0.99	5.35	3.44
Tiempo 31 Días			
Nivel de Estándar	Bajo 0.2 µg/mL	Medio 0.75 µg/mL	Alto 2.5 µg/mL
	0.20	0.75	2.50
	0.19	0.73	2.49
Promedio	0.20	0.74	2.50
DesvAbs %	0.10	0.12	0.13

Tabla No. 19: Resultados correspondientes a la estabilidad a largo plazo para Sulfametoxazol a -70°C

Tiempo Cero (0)			
Nivel de Estándar	Bajo 2 µg/mL	Medio 30 µg/mL	Alto 60 µg/mL
	2.11	29.54	60.85
	1.99	30.94	60.31
Promedio	2.05	30.24	60.58
Tiempo 20 Días			
Nivel de Estándar	Bajo 2 µg/mL	Medio 30 µg/mL	Alto 60 µg/mL
	1.93	30.26	60.77
	2.01	29.68	59.88
Promedio	1.97	29.97	60.33
DesvAbs %	4.00	0.90	0.41
Tiempo 31 Días			
Nivel de Estándar	Bajo 2 µg/mL	Medio 30 µg/mL	Alto 60 µg/mL
	1.93	29.54	57.84
	1.90	28.98	59.51
Promedio	1.91	29.26	58.68
DesvAbs %	6.67	3.24	3.14

- Ciclos de Congelación-Descongelación

El monitoreo de la estabilidad de Trimetoprim y Sulfametoxazol, en plasma durante dos ciclos de congelación-descongelación se muestran en las tablas No.20 y No.21 bajo los términos de concentración recuperada (µg/mL).

Para cada una de las tablas podemos observar las siguientes premisas:

- Cada uno de los valores obtenidos en los ciclos, se encuentran por debajo del valor permitido de desviación con respecto al valor original ($\pm 15\%$).
- Los resultados obtenidos nos permiten concluir que tanto Trimetoprim y Sulfametoxazol, son estables durante dos ciclos de congelación-descongelación a 48 horas.

Tabla No. 20: Resultados correspondientes a la estabilidad bajo dos ciclos de congelación-descongelación para Trimetoprim.

Tiempo Cero (0)			
Nivel de Estándar	Bajo 0.2 µg/mL	Medio 0.75 µg/mL	Alto 2.5 µg/mL
	0.19	0.76	2.37
	0.21	0.74	2.31
Promedio	0.20	0.75	2.34
Tiempo 24 horas			
Nivel de Estándar	Bajo 0.2 µg/mL	Medio 0.75 µg/mL	Alto 2.5 µg/mL
	0.20	0.81	2.66
	0.21	0.78	2.51
Promedio	0.20	0.79	2.59
DesvAbs %	0.05	5.31	10.59
Tiempo 48 horas			
Nivel de Estándar	Bajo 0.2 µg/mL	Medio 0.75 µg/mL	Alto 2.5 µg/mL
	0.20	0.78	2.40
	0.20	0.78	2.57
Promedio	0.20	0.78	2.49
DesvAbs %	0.96	3.88	6.30

Tabla No. 21: Resultados correspondientes a la estabilidad bajo dos ciclos de congelación-descongelación para Sulfametoxazol

Tiempo Cero (0)			
Nivel de Estándar	Bajo 2 µg/mL	Medio 30 µg/mL	Alto 60 µg/mL
	1.99	29.60	57.02
	1.95	29.38	59.40
Promedio	1.97	29.49	58.21
Tiempo 24 horas			
Nivel de Estándar	Bajo 2 µg/mL	Medio 30 µg/mL	Alto 60 µg/mL
	2.00	32.04	62.25
	2.05	31.78	63.83
Promedio	2.02	31.91	63.04
DesvAbs %	2.89	8.20	8.30
Tiempo 48 horas			
Nivel de Estándar	Bajo 2 µg/mL	Medio 30 µg/mL	Alto 60 µg/mL
	1.90	29.75	57.93
	1.94	29.14	59.78
Promedio	1.92	29.45	58.85
DesvAbs %	2.39	0.16	1.11

- Estabilidad de la Muestra Procesada

Para realizar el estudio de la estabilidad de la muestra procesada, preparamos dos series de muestras de Trimetoprim y Sulfametoxazol, en plasma a tres niveles de concentración dentro del rango de linealidad del método, cada concentración preparada fue sometida al procedimiento de extracción del fármaco e inyectadas en el sistema cromatográfico a las condiciones ambientales del laboratorio a los tiempos 0, 20 y 60 horas después de su preparación.

Tanto Trimetoprim como Sulfametoxazol, fueron estables en la solución de inyección durante 60 horas posterior a su preparación; ya que su desviación absoluta no fue mayor que el $\pm 15\%$ con respecto al valor original.

Tabla No. 22: Resultados correspondientes a la estabilidad de la muestra procesada para Trimetoprim.

Tiempo Cero (0)			
Nivel de Estándar	Bajo 0.2 µg/mL	Medio 0.75 µg/mL	Alto 2.5 µg/mL
	0.19	0.74	2.44
	0.18	0.74	2.46
Promedio	0.19	0.74	2.45
Tiempo 20 Horas			
Nivel de Estándar	Bajo 0.2 µg/mL	Medio 0.75 µg/mL	Alto 2.5 µg/mL
	0.19	0.74	2.45
	0.18	0.74	2.47
Promedio	0.18	0.74	2.46
DesvAbs %	1.26	0.54	0.39
Tiempo 60 Horas			
Nivel de Estándar	Bajo 0.2 µg/mL	Medio 0.75 µg/mL	Alto 2.5 µg/mL
	0.19	0.74	2.45
	0.18	0.74	2.47
Promedio	0.18	0.74	2.46
DesvAbs %	1.36	0.78	0.46

Tabla No. 23: Resultados correspondientes a la estabilidad de la muestra procesada para Sulfametoxazol.

Tiempo Cero (0)			
Nivel de Estándar	Bajo 2 µg/mL	Medio 30 µg/mL	Alto 60 µg/mL
	1.87	29.29	58.83
	1.83	29.35	61.40
Promedio	1.85	29.32	60.11
Tiempo 20 Horas			
Nivel de Estándar	Bajo 2 µg/mL	Medio 30 µg/mL	Alto 60 µg/mL
	1.87	29.3000	58.84
	1.83	29.3840	61.41
Promedio	1.85	29.3420	60.12
DesvAbs %	0.12	0.05	0.02
Tiempo 60 Horas			
Nivel de Estándar	Bajo 2 µg/mL	Medio 30 µg/mL	Alto 60 µg/mL
	1.88	29.30	58.84
	1.84	29.38	60.39
Promedio	1.86	29.34	59.62
DesvAbs %	0.49	0.06	0.82

5.3 Análisis de las Muestras Plasmáticas de Voluntarios

El análisis de las muestras de los voluntarios se realizó una vez que los parámetros establecidos para efectuar la validación, fueron cubiertos.

En una corrida fueron analizadas todas las muestras de tres voluntarios las cuales incluyen las muestras de los dos periodos de estudio para cada uno de ellos (modelo cruzado). Las muestras control, se analizaron en réplicas para lo cual, empleamos el integrador computacional Millenium de Waters S.A., en la determinación las alturas correspondientes a los picos de Trimetoprim, Sulfametoxazol y Estándar Interno.

Las relaciones de alturas (y) de los principios activos Trimetoprim y Sulfametoxazol con respecto al estándar interno y las concentraciones de los estándares (x) fueron ajustadas por medio de un análisis de regresión lineal mediante mínimos cuadrados a la ecuación $y = b + mx$, en donde tenemos las siguientes notaciones:

b.- corresponde a la ordenada al origen de la recta (intersección con eje y)

m.- es la pendiente de la curva de calibración

Las alturas obtenidas en cada una de las muestras analizadas durante el desarrollo del estudio, fueron convertidas a concentraciones mediante la aplicación de los parámetros estadísticos antes descritos.

En la tabla No.24, se muestran los resultados de las muestras control de cada corrida.

Tabla No. 24: Seguimiento de las muestras control para Trimetoprim

Corrida	Voluntarios	Control Bajo 0.2 µg/mL	Control Medio 0.75 µg/mL	Control Alto 2.5 µg/mL
1	1, 2 y 3	0.23	0.73	2.66
		0.21	0.78	2.64
		0.22	0.73	2.63
2	4, 5 y 6	0.21	0.73	2.47
		0.21	0.69	2.47
		*	0.72	2.51
3	7 y 8	0.18	0.71	2.45
		0.21	0.69	2.37
		0.22	0.72	2.62
Promedio		0.211	0.722	2.536
D.E. (n-1)		0.015	0.027	0.104
C.V. %		6.90	3.71	4.10
Concentración Nominal		0.20	0.75	2.5
Desv. Absoluta(%)		5.63	3.73	1.44

(*) Valores que excedieron el límite de $\pm 15\%$ de desviación con respecto al valor nominal.

Tabla No. 25: Seguimiento de las muestras control para Sulfametoxazol.

Corrida	Voluntarios	Control Bajo 2 µg/mL	Control Medio 30 µg/mL	Control Alto 60 µg/mL
1	1, 2 y 3	1.64	27.33	57.82
		1.83	31.56	64.6
		2.06	29.93	57.98
2	4, 5 y 6	1.96	29.74	62.57
		1.83	27.69	59.2
		2.1	28.11	58.76
3	7 y 8	2.09	28.97	63.69
		2.03	29.72	64.49
		1.88	29.79	63.7
Promedio		1.9356	29.2044	61.4233
D.E. (n-1)		0.1536	1.3243	2.9157
C.V. %		7.93	4.54	4.75
Concentración Nominal		2	30	60
Desv. Absoluta(%)		3.22	2.65	2.37

Como se puede observar, no rechazamos alguna corrida. Todas cumplieron con los criterios establecidos para la aceptación de la corrida de que no más de 2 concentraciones de seis muestras de control de calidad debían encontrarse fuera del $\pm 15\%$ de desviación con respecto al valor nominal.

En las tablas No.26 y No.27, se muestra el seguimiento de las curvas de calibración para la cuantificación de Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma.

Tabla No. 26: Seguimiento de las curvas de calibración para Trimetoprim

Corrida	Voluntarios	Trimetoprim en Plasma (µg/mL)							Intercepto (b)	Pendiente (m)	Coeficiente de Correlación (r)
1	1, 2 y 3	0.0488	0.0901	0.2531	0.502	1.0041	2.0104	2.9914	-4.27 E -06	0.9999	0.9999
2	4, 5 y 6	0.0563	0.1005	0.2538	0.5011	0.9671	2.0324	2.9888	-2.16 E -05	1.0021	0.9998
3	7 y 8	0.0468	0.0938	0.2499	0.4964	1.0122	2.0123	2.9886	6.55 E -07	0.9999	0.9999
Promedio		0.0506	0.0948	0.2523	0.4998	0.9945	2.0184	2.9896	0.0000	1.0000	0.9999
D.E. (n-1)		0.0050	0.0053	0.0021	0.0030	0.0240	0.0122	0.0016			
C.V. %		9.90	5.56	0.83	0.60	2.42	0.61	0.05			
Conc. Nominal		0.05	0.10	0.25	0.50	1.00	2.00	3.00			
Desv. Abs %		1.27	5.20	0.91	0.03	0.56	0.92	0.35			

Tabla No. 27: Seguimiento de las curvas de calibración para Sulfametoxazol

Corrida	Voluntarios	Sulfametoxazol en Plasma (µg/mL)							Intercepto (b)	Pendiente (m)	Coeficiente de Correlación (r)
1	1, 2 y 3	0.5525	1.2625	4.8602	10.0824	20.4644	40.4794	69.5984	0.0755	0.9984	0.9999
2	4, 5 y 6	0.5018	1.4864	5.0083	9.8141	19.9626	40.4433	69.7836	3.08 E -05	0.9999	0.9999
3	7 y 8	0.6130	1.5977	5.0088	9.7674	20.0462	39.8842	70.0827	-1.09 E -05	1.0000	0.9999
Promedio		0.5558	1.4489	4.9591	9.8880	20.1577	40.2690	69.8216	0.0252	0.9995	0.9999
D.E. (n-1)		0.0557	0.1707	0.0857	0.1700	0.2689	0.3337	0.2444			
C.V. %		10.02	11.78	1.73	1.72	1.33	0.83	0.35			
Conc. Nominal		0.50	1.50	5.00	10.00	20.00	40.00	70.00			
Desv. Abs %		11.15	3.41	0.82	1.12	0.79	0.67	0.25			

Cada uno de los datos mostrados en las tablas anteriores, presentan un excelente comportamiento, de esta manera, podemos concluir que todas las curvas de calibración fueron aceptadas. Cada una de las curvas se encuentra dentro del $\pm 15\%$ de desviación permitido con respecto al valor nominal, mientras que los valores correspondientes al coeficiente de correlación se encuentran por arriba del 0.99.

5.4 Análisis Farmacocinético

Las muestras sanguíneas fueron recolectadas antes de cada administración y posteriormente de ella, en once puntos dentro de las 48 horas después de la administración de la dosis. Las concentraciones plasmáticas de ambos fármacos, fueron determinadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

En las tablas No.28 y No.29, mostramos los valores promedio de los 8 voluntarios para las concentraciones plasmáticas de los activos presentes en la formulación administrada a cada tiempo de muestreo.

Tabla No. 28: Concentración plasmática promedio (en $\mu\text{g/mL}$) para Trimetoprim, después de la administración del producto farmacéutico.

Tiempo (h)	Formulación de Referencia (A) Promedio \pm (D.E)	Formulación de Prueba (B) Promedio \pm (D.E)
0.0	0.0000 \pm (0.0000)	0.0000 \pm (0.0000)
0.5	0.6445 \pm (0.1344)	0.6440 \pm (0.3690)
1.0	0.8090 \pm (0.2021)	0.7879 \pm (0.3082)
1.5	0.7817 \pm (0.1355)	0.7317 \pm (0.2166)
2.0	0.7328 \pm (0.1086)	0.7546 \pm (0.1302)
2.5	0.6829 \pm (0.0899)	0.7122 \pm (0.0721)
3.0	0.6453 \pm (0.1080)	0.6621 \pm (0.0845)
4.0	0.6050 \pm (0.1292)	0.5990 \pm (0.1021)
8.0	0.4140 \pm (0.0990)	0.4273 \pm (0.0691)
12.0	0.2775 \pm (0.0789)	0.2936 \pm (0.0714)
22.0	0.1019 \pm (0.0515)	0.1030 \pm (0.0537)
48.0	N.D.	N.D.

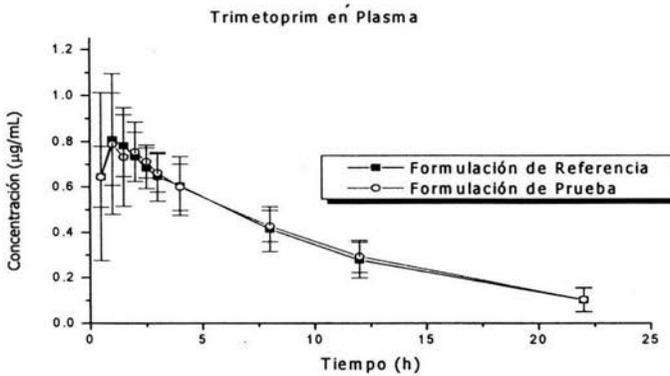


Figura 8 Gráfica de la concentración plasmática promedio para Trimetoprim (\pm D.E.), contra tiempo, después de la administración de las dos formulaciones.

Tabla No. 29: Concentración plasmática promedio (en $\mu\text{g/mL}$) para Sulfametoxazol, después de la administración del producto farmacéutico.

Tiempo (h)	Formulación de Referencia (A) Promedio \pm (D.E)	Formulación de Prueba (B) Promedio \pm (D.E)
0.0	0.0000 \pm (0.0000)	0.0000 \pm (0.0000)
0.5	9.1376 \pm (4.8765)	9.6068 \pm (6.7895)
1.0	14.8798 \pm (5.8364)	14.8819 \pm (7.5066)
1.5	20.2024 \pm (4.2656)	19.6801 \pm (7.0386)
2.0	21.9738 \pm (3.4777)	22.3065 \pm (5.3436)
2.5	22.8021 \pm (4.2876)	23.2003 \pm (3.7903)
3.0	23.1938 \pm (4.8891)	21.9946 \pm (4.1206)
4.0	20.7049 \pm (3.9267)	19.7532 \pm (3.8089)
8.0	13.8775 \pm (3.6189)	13.1479 \pm (2.7047)
12.0	9.1490 \pm (2.2591)	8.7929 \pm (1.9642)
22.0	3.9126 \pm (1.2084)	3.7738 \pm (1.3895)
48.0	0.6029 \pm (0.3250)	0.5661 \pm (0.3056)

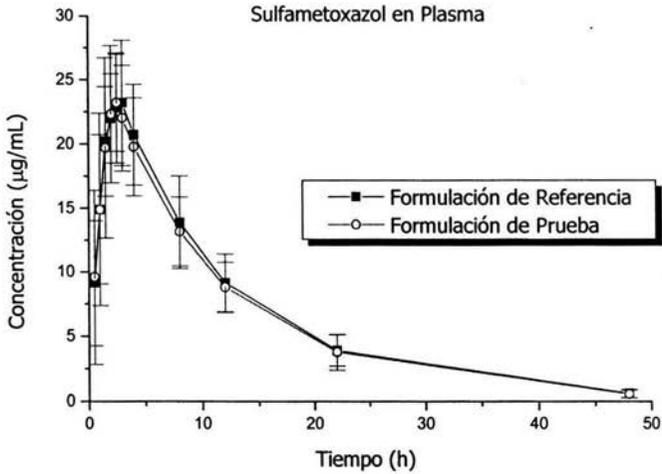


Figura 9: Gráfica de la concentración plasmática promedio para Sulfametoxazol (\pm D.E.), contra tiempo, después de la administración de las dos formulaciones.

En el apéndice II y IV, se muestran los datos correspondientes a la concentración plasmática para cada voluntario así como, las gráficas de concentración plasmática contra tiempo.

Los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos de los 8 voluntarios tanto para el medicamento de referencia como el de prueba, se presentan en las tablas No.30 y No.31

Tabla No. 30: Parámetros farmacocinéticos promedio correspondientes a Trimetoprim para ambas formulaciones.

Parámetro Farmacocinético Promedio +/- D.E.	Formulación de Referencia (A)	Formulación de Prueba (B)
$(ABC_{0 \rightarrow t})_r$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$)	7.9306 ± 0.2103	8.0900 ± 0.21032
$(ABC_{0 \rightarrow \infty})$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$)	9.0464 ± 0.2241	9.2373 ± 0.2241
C máx ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	0.8527 ± 0.0552	0.9511 ± 0.0552
T máx (h)	0.9375 ± 0.1420	1.2500 ± 0.1420
T $\frac{1}{2}$ (h)	6.9795 ± 0.1874	6.9958 ± 0.1874

Tabla No. 31: Parámetros farmacocinéticos correspondientes a Sulfametoxazol para ambas formulaciones.

Parámetro Farmacocinético Promedio +/- D.E.	Formulación de Referencia (A)	Formulación de Prueba (B)
$(ABC_{0 \rightarrow t})_r$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$)	300.0750 ± 8.2021	287.8230 ± 8.2021
$(ABC_{0 \rightarrow \infty})$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{mL}$)	312.8510 ± 5.0206	301.5810 ± 5.0206
C máx ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	23.6944 ± 0.7977	23.9872 ± 0.7977
T máx (h)	2.6250 ± 0.1250	2.1250 ± 0.125
T $\frac{1}{2}$ (h)	7.9487 ± 0.0887	7.7810 ± 0.0887

Como se puede observar en las tablas anteriores, los parámetros farmacocinéticos obtenidos para la formulación de referencia como de prueba, presentan valores equivalentes.

5.5 Análisis Estadístico de los Resultados

El análisis estadístico fue realizado mediante el empleo del programa computacional Biopak® 2.0:

- Intervalos de confianza clásico
- Intervalos de Westlake

- Prueba de Shüirmann
- Valor de Probabilidad de Anderson-Hauck
- Poder de la prueba

En el Apéndice III y V, se presentan los resultados correspondientes al análisis estadístico obtenidos para los siguientes parámetros farmacocinéticos (Trimetoprim y Sulfametoxazol respectivamente):

- * $ABC_0 \rightarrow t$
- * $ABC_0 \rightarrow \infty$
- * C max
- * T max
- * $t_{1/2}$

Tabla No. 32: Resultados del análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos para Trimetoprim

Parámetro farmacocinético	Intervalo Clásico	Intervalo de Westlake	Prueba de Schuirmann	Prueba de Anderson-Hauck	Poder
$ABC_0 \rightarrow t$	94.71 - 109.29	92.03 - 107.97	0.0020	0.0010	0.9862
$ABC_0 \rightarrow \infty$	95.30 - 108.92	92.39 - 107.61	0.0015	0.0007	0.9915
C max	93.73 - 129.33	75.04 - 124.96	0.2022	0.1885	0.4023
T max	91.68 - 174.99	35.51 - 164.49	0.7453	0.6980	0.0978
$t_{1/2}$	92.93 - 109.53	92.61 - 107.39	0.0019	0.0001	0.9849

Tabla No. 33: Resultados del análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos para Sulfametoxazol

Parámetro farmacocinético	Intervalo Clásico	Intervalo de Westlake	Prueba de Schuirmann	Prueba de Anderson-Hauck	Poder
$ABC_0 \rightarrow t$	88.40 - 103.43	90.18 - 109.82	0.0035	0.0027	0.9839
$ABC_0 \rightarrow \infty$	91.99 - 100.81	93.09 - 106.90	0.0002	0.0002	0.9997
C max	91.98 - 110.49	90.53 - 109.47	0.0060	0.0017	0.9352
T max	67.86 - 94.04	71.25 - 128.75	0.4467	0.4455	0.6907
$t_{1/2}$	94.82 - 100.96	95.58 - 104.42	0.0000	0.0000	1.000

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico para Trimetoprim (ver tabla No. 32) para el cálculo de la concentración máxima, el intervalo de Westlake se encuentra fuera de los rangos establecidos dentro de la NOM-177-SSA1-1998, criterio por el cual se define la equivalencia entre dos formulaciones (rango de 80 a 120 para datos no transformados), en relación con este valor, podemos observar que el resultado obtenido en el parámetro de poder correspondiente a la prueba de hipótesis puntual, presenta gran variación con respecto a la unidad para el mismo parámetro farmacocinético, debido básicamente a que es necesario aumentar el número de individuos de prueba a fin de que los resultados sean confiables.

Esta misma situación, la podemos ver reflejada en el cálculo del número de individuos, ya que por lo menos necesitamos de la participación de 16 personas. (ver tabla No. 34).

Para el caso de Sulfametoxazol, los resultados reflejan una bioequivalencia (ver tabla No. 33) en cada parámetro farmacocinética analizado, pero es importante considerar que el poder correspondiente a la prueba de hipótesis puntual para el análisis de la concentración máxima, presenta una variación importante respecto a la unidad por lo cual podemos confirmar la necesidad de incrementar el número de voluntarios (ver tabla No. 35).

5.6 Determinación del Tamaño de Muestra a partir de los datos correspondientes a Trimetoprim

Para obtener el número de sujetos requeridos en un estudio cruzado 2X2, fueron tomados los resultados de análisis de varianza obtenidos con el programa de computo BIOPAK®, para 8 voluntarios (ver Apéndice VI).

En este caso, obtuvimos el cuadrado medio del error (CME) y (μ_R) promedio de la formulación de referencia para cada parámetro farmacocinético.

A continuación, se muestran los cálculos para el parámetro farmacocinético $ABC_{0 \rightarrow t}$:

a) Área Bajo la Curva de 0 \rightarrow t: (Tomando datos emitidos por Biopak®)

El CME de $ABC_{0 \rightarrow t}$: 0.3539,

El μ_R : 7.93068

Aplicando la siguiente ecuación, obtenemos el siguiente valor para el coeficiente de variación C.V.:

$$C.V. = 100 \times \frac{(0.3539)^{1/2}}{7.9307} = 7.50$$

Posteriormente suponemos un $n_c = 9$, por lo tanto calculamos los grados de libertad (*g.l.*) de la siguiente manera:

$$g.l. = 2n - 2 ; \quad g.l. = 2(9) - 2 ; \quad g.l. = 18 - 2$$

$$g.l. = 16$$

Siendo 16 el valor correspondiente a los grados de libertad, el siguiente paso constituye la aplicación de la siguiente ecuación:

$$N_c = \left[t(\alpha/2, 2n-2) + (\beta, 2n-2) \right]^2 \left[CV/20 \right]^2$$

Donde:

$$\alpha = 0.05 \quad \text{y} \quad \beta = 0.2$$

Por lo tanto debemos buscar en tabla de distribución t (ver apéndice VIII) $t(\alpha/2, 2n-2)$ y $t(\beta, 2n-2)$.

- $t(0.025, 16) = 2.120$
- $t(0.2, 16) = 0.865$

Sustituyendo cada uno de los resultados anteriores en nuestra ecuación para determinar N_c , obtenemos un n_c preliminar:

$$n_c \text{ preliminar} = \left[t(2.120) + (0.865) \right]^2 \left[7.50/20 \right]^2$$

$$n_c \text{ preliminar} = 1.2533 \text{ aproximadamente } 1$$

tomamos $n = 1$, para calcular los grados de libertad para nuestro estudio.

$$g.l. = 2n - 2 ; \quad g.l. = 2(1) - 2 ; \quad g.l. = 2 - 2$$

$$g.l. = 0$$

Por lo tanto ahora:

$$* t (0.025, \text{infinito}) = 1.960$$

$$* t (0.2, \text{infinito}) = 0.842$$

$$n_c = \left[t (1.960) + (0.842) \right]^2 \left[7.50/20 \right]^2$$

$$n_c = 1.043 \text{ aproximadamente } 1$$

$$N_c = 2 (n_c) ; N_c = 2 (1) ;$$

$$N_c = 2$$

Para cada uno de los parámetros mostrados en las tablas No.34 y No.35, aplicamos el mismo procedimiento. La decisión sobre el número de individuos necesarios para realizar el estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia, fue determinada tomando en consideración los parámetros de ABC y C_{max}.

Tabla No. 34: Tamaño de muestra a partir de los resultados de análisis de varianza de ocho sujetos voluntarios (Trimetoprim).

Parámetro	CME	μ_R	C.V.	n_c Preliminar	2n-2	t(0.025,2n-2)	t(0.2, 2n-2)	n_c	N
ABC $0 \rightarrow t$	0.3539	7.9307	7.5009	1	0	1.96	0.842	1	2
ABC $0 \rightarrow \infty$	0.4019	9.0464	7.0086	1	0	1.96	0.842	1	2
C max	0.0244	0.8528	18.3138	7	12	2.179	0.873	8	16
T max	0.1614	0.9375	42.8606	40.9210	78	2.000	0.848	37	74
T ½	0.2811	6.9795	7.5963	1	0	1.96	0.842	1	2

5.7 Determinación del Tamaño de Muestra a partir de los datos correspondientes a Sulfametoxazol

Para obtener el número de sujetos requeridos en un estudio cruzado 2X2, fueron tomados los resultados de análisis de varianza obtenidos con el programa de computo BIOPAK®, para 8 voluntarios (ver Apéndice VII).

En este caso, obtuvimos el cuadrado medio del error (CME) y (μ_R) promedio de la formulación de referencia para cada parámetro farmacocinético.

A continuación, se muestran los cálculos para el parámetro farmacocinético $ABC_{0 \rightarrow t}$:

a) $ABC_{0 \rightarrow t}$:

El CME de $ABC_{0 \rightarrow t}$: 538.2044,

El μ_R : 300.075

Aplicando la siguiente ecuación, obtenemos el siguiente valor para el coeficiente de variación C.V.:

$$C.V. = 100 \times \frac{(538.2044)^{1/2}}{300.075} = 7.7311$$

Posteriormente suponemos un $n_c = 9$, por lo tanto calculamos los grados de libertad ($g.l.$) de la siguiente manera:

$$g.l. = 2n - 2 ; \quad g.l. = 2(9) - 2 ; \quad g.l. = 18 - 2$$

$$g.l. = 16$$

Siendo 16 el valor correspondiente a los grados de libertad, el siguiente paso constituye la aplicación de la siguiente ecuación:

$$N_c = \left[t_{(\alpha/2, 2n-2)} + (\beta, 2n-2) \right]^2 \left[CV/20 \right]^2$$

Donde:

$$\alpha = 0.05 \quad \text{y} \quad \beta = 0.2$$

Por lo tanto debemos buscar en tabla de distribución t (ver apéndice VIII) $t(\alpha/2, 2n-2)$ y $t(\beta, 2n-2)$.

- $t(0.025, 16) = 2.120$
- $t(0.2, 16) = 0.865$

Sustituyendo cada uno de los resultados anteriores en nuestra ecuación para determinar N_c , obtenemos un n_c preliminar:

$$n_c \text{ preliminar} = \left[t(2.120) + (0.865) \right]^2 \left[7.7.7311/20 \right]^2$$

$$n_c \text{ preliminar} = 1.33 \text{ aproximadamente } 1$$

tomamos $n = 1$, para calcular los grados de libertad para nuestro estudio.

$$g.l. = 2n - 2 ; \quad g.l. = 2(1) - 2 ; \quad g.l. = 2 - 2$$

$$g.l. = 0$$

Por lo tanto ahora:

- * $t(0.025, \alpha) = 1.960$
- * $t(0.2, \alpha) = 0.842$

$$n_c = \left[t(1.960) + (0.842) \right]^2 \left[7.7311/20 \right]^2$$

$$n_c = 1.17 \text{ aproximadamente } 1$$

$$N_c = 2(n_c) ; \quad N_c = 2(1) ;$$

$$N_c = 2$$

Tabla No. 35: Tamaño de muestra a partir de los resultados de análisis de varianza de ocho sujetos voluntarios (Sulfametoxazol).

Parámetro	CME	μ_R	C.V.	n_c Preliminar	2n-2	t(0.025,2n-2)	t(0.2, 2n-2)	n_c	N
ABC _{0→t}	538.20	300.075	7.731	1	0	1.960	0.842	1	2
ABC _{0→infinito}	201.65	312.851	4.539	1	0	1.960	0.842	0.5	1
C max	5.092	23.694	9.523	2	2	4.303	1.061	6.5	13
T max	0.126	2.625	13.469	4	6	2.447	0.906	5	10
T ½	0.063	7.949	3.158	1	0	1.960	0.842	1	2

Con base en los resultados de C_{max} y ABC_{0-α} presentados en las tablas No. 34 y No. 35, se determinó que para poder realizar un estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia con los medicamentos evaluados, es necesario contar con la participación de por lo menos 16 voluntarios.

Por otro lado, la técnica de extracción empleada para las muestras plasmáticas, permitió obtener resultados consistentes de recuperación en cada nivel de concentración analizada, dando un recobro igual o mayor al 70 % para Trimetoprim y mayor al 96 % para Sulfametoxazol.

En lo referente al análisis de estabilidad practicado a nuestras muestras bajo diversas condiciones de análisis, los activos de interés fueron estables hasta las 24 horas en estado de refrigeración a 5 °C, las muestras fueron estables hasta los 31 días a -70 °C, mientras que las muestras procesadas brindan excelentes resultados de estabilidad por un periodo de 60 horas y dos ciclos de congelación-descongelación.

De acuerdo con lo observado en la tabla No. 32, Trimetoprim no demuestra ser bioequivalente en el renglón de concentración máxima para el intervalo de Westlake, de esta manera es como la prueba de poder para este mismo parámetro farmacocinética, presenta una gran variación respecto a la unidad por tal motivo es necesario incrementar el número de voluntarios con la finalidad de mejorar los resultados obtenidos en este parámetro.

Esta misma situación se puede corroborar al momento en el que se realiza el análisis para Sulfametoxazol. Para este principio activo si se logró demostrar la bioequivalencia pero de la misma manera, el parámetro de concentración máxima nos obliga a pensar en un incremento de voluntarios. (Ver tabla No. 33).

Como lo hemos definido al inicio de este análisis, requerimos de por lo menos 16 voluntarios para realizar un estudio formal de biodisponibilidad y bioequivalencia entre los medicamentos evaluados. (Ver tablas No. 34 y No. 35).

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES:

De acuerdo con los resultados obtenidos durante el desarrollo de la parte experimental, podemos concluir que la metodología analítica desarrollada para la cuantificación de Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma, puede ser aplicada si se desea llevar a cabo un estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia entre dos formulaciones que contengan los principios activos antes citados debido a que es lineal, preciso, exacto y selectivo dentro del rango de concentraciones de 0.05 a 3.0 µg/mL para Trimetoprim y de 0.50 a 70.0 µg/mL para Sulfametoxazol.

Aún y cuando los tiempos de muestreo establecidos en el protocolo, permitieron la caracterización de por lo menos el 85% del área bajo la curva para ambos fármacos, se sugiere incrementar el muestreo en la fase inicial (absorción) con la finalidad de mejorar el perfil de concentración plasmática de Trimetoprim:

Tiempos de Muestreo Propuestos (en horas):

0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 8.0, 12.0, 24.0 y 48.0.

En lo referente a Sulfametoxazol, la caracterización de los perfiles es adecuada, pero debido a que el producto farmacéutico se encuentra compuesto por los dos principios activos, es necesario respetar los tiempos de muestreo propuestos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio preliminar, las formulaciones no presentaron bioequivalencia para el principio activo Trimetoprim en el renglón de concentración máxima dentro del intervalo de Westlake. Para Sulfametoxazol, los resultados demuestran una bioequivalencia, pero corroboran la necesidad de incrementar el número de voluntarios durante el desarrollo de un estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia entre los medicamentos evaluados con la finalidad de mejorar los resultados obtenidos aplicando la metodología planteada. (Por lo menos, 16 voluntarios).

APÉNDICE I
Definiciones Generales

APÉNDICE I:

Definiciones Generales

Biofarmacia: ^(1,21)

Es una disciplina científica dedicada al estudio de la relación entre las propiedades fisicoquímicas de un principio activo, las formas de dosificación y las respuestas biológicas observadas después de la administración. ⁽¹⁾

Farmacocinética: ⁽¹⁾

La farmacocinética estudia la evolución temporal del fármaco en el organismo y puede ser dividido en cuatro etapas:

- Absorción
- Distribución
- Metabolismo
- Eliminación (Excreción)

Cada una de estas etapas, constituye el conjunto de fenómenos físicos y químicos, cualitativos y cuantitativos a los que se encuentra expuesto el fármaco en el organismo receptor. ^(1,3)

Absorción: ⁽¹⁾

Constituye el paso de la molécula de un principio activo, desde el sitio en donde se deposita el medicamento hacia la sangre a través de una barrera fisiológica (membranas).

Cabe señalar, que el proceso de absorción solo es posible cuando el fármaco es liberado de los excipientes es decir, una vez que la desintegración y disolución de la forma farmacéutica se ha llevado a cabo en los fluidos fisiológicos. ⁽¹⁾

Distribución: ⁽¹⁾

El proceso de distribución, se lleva a cabo una vez que el principio activo se encuentra disuelto en la circulación, dicho evento pretende transportar al principio activo a todas las regiones del organismo. ⁽¹⁾

Metabolismo (Biotransformación): ⁽²²⁾

Este proceso comprende la transformación metabólica o biotransformación del fármaco. El metabolito originado en la región enzimática es un derivado más polar que la molécula original.

La biotransformación o metabolismo constituye una desaparición por la vía química y su cinética de adición a la excreción para construir la cinética global de eliminación. ⁽¹⁾

Eliminación: ⁽¹⁾

Una vez que cualquier molécula exógena ha ingresado al organismo, son activados diversos mecanismos que permiten la eliminación por el proceso de excreción. ⁽³⁾

El riñón y la orina constituyen los mecanismos clásicos de excreción, a pesar de que podemos citar algunos otros tales como: excreción a través de la bilis, excreción pulmonar, dérmica, glándular etc.. ⁽¹⁾

Farmacodinamia: ⁽²²⁾

Estudia la relación entre el principio activo y el organismo que recibió la administración, durante esta fase, la concentración del principio activo constituye el parámetro principal de la respuesta fisiológica.

Es igualmente importante, la interacción principio activo / receptor, fenómenos de competencia, mecanismos de acción y la toxicología. ⁽⁹⁾

Existen diversos factores fisiopatológicos que influyen en la farmacocinética y farmacodinamia de un fármaco, a saber: raza, posición corporal, pH urinario, edad, sexo, gestación, menopausia flujo sanguíneo, estado nutricional entre otros. ⁽¹⁾

Biodisponibilidad: ^(1, 21)

La biodisponibilidad se define como la fracción del fármaco inalterado que se absorbe a la circulación sistémica después de la administración de un medicamento por cualquier vía y tiempo que requiere para hacerlo. ⁽¹⁾

Es una medida de la velocidad y cantidad del fármaco, o de la porción terapéuticamente activa de este que es adsorbida desde el producto farmacéutico y que se encuentra en el sitio de acción. ⁽¹⁰⁾

Bioequivalencia:

Se refiere a la velocidad y proporción en que el mismo principio activo de dos medicamentos (medicamento innovador y medicamento de prueba) alcanzan circulación sistémica. ⁽⁴⁾

Parámetros Farmacocinéticos ⁽²²⁾

Área Bajo la Curva:

El área bajo la curva representa la fracción de fármaco absorbido a la circulación y resulta ser independiente a la velocidad a la cual realiza este proceso. Constituye el parámetro más importante durante los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia. ⁽⁹⁾

Concentración Máxima:

Es la concentración máxima alcanzada, representa la concentración más alta del fármaco en sangre después de la administración oral. Este parámetro se encuentra directamente relacionado con la fracción absorbida y la velocidad con la cual se efectuó el proceso de absorción. ⁽⁹⁾

Tiempo Máximo:

Constituye el tiempo que tarda un fármaco en alcanzar la concentración máxima. Mantiene una estrecha relación con la velocidad de absorción. ⁽⁹⁾

Depuración:

Dentro del área clínica, este parámetro se considera el de mayor importancia y constituye la medida de la capacidad del organismo para eliminar el fármaco administrado. Este parámetro está referido a la cantidad de fluido biológico que se encuentra liberado del fármaco. ⁽⁹⁾

Volumen de Distribución:

Este parámetro se encuentra referido al volumen del líquido que se requeriría para contener todo el fármaco en el cuerpo a las mismas concentraciones en que está presente en la sangre o plasma. ⁽⁹⁾

Tiempo de Vida Media:

Es el tiempo que necesita la concentración plasmática o la cantidad de fármaco en el cuerpo para disminuir su concentración a la mitad. La presencia del medicamento en el cuerpo depende tanto del volumen de distribución así como, de la depuración. ⁽¹⁾

Parámetros de Validación (4)

Como habíamos mencionado anteriormente, cada una de las metodologías analíticas que son aplicadas para la cuantificación de fármacos, deben ser validadas a fin de presentar la evidencia documental que sustenta el correcto funcionamiento del método.

El proceso de validación deberá ser desarrollado de acuerdo a lo establecido en la NOM-177-SSA1-1998, en donde se establecen las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, es por ello que en esta sección describimos cada uno de los parámetros que serán analizados durante la validación del método:

Linealidad:

Es la capacidad de un método analítico dentro de un intervalo de trabajo, que nos permitirá obtener resultados proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra que se analiza.

Rango:

Es el intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Estabilidad:

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

Exactitud:

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Límite de Detección:

Es la mínima concentración de un compuesto en una matriz, la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas; se determina la concentración a la cual la señal del compuesto de interés en la matriz biológica pueda distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto por analizar.

Límite de Cuantificación:

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

Precisión:

Se denomina Precisión, al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, este parámetro se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad:

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

Reproducibilidad Intralaboratorio:

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, analistas.

Exactitud:

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Selectividad:

Es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto por analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

Tolerancia:

Es la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporcionan una idea de su confiabilidad durante su uso normal.

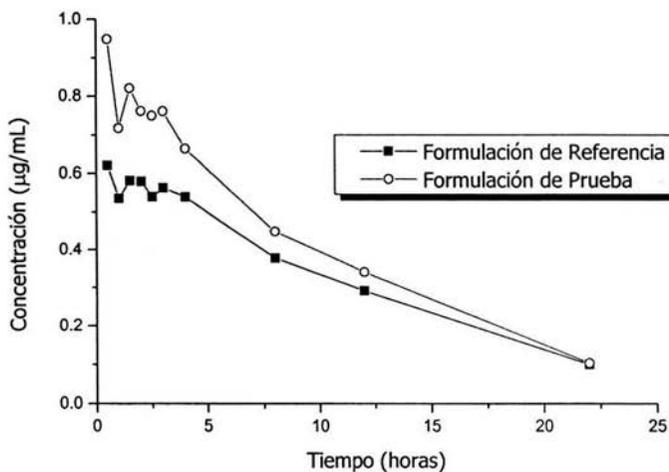
APÉNDICE II

Datos y Gráficas de Concentración Plasmática para Trimetoprim en Cada Voluntario

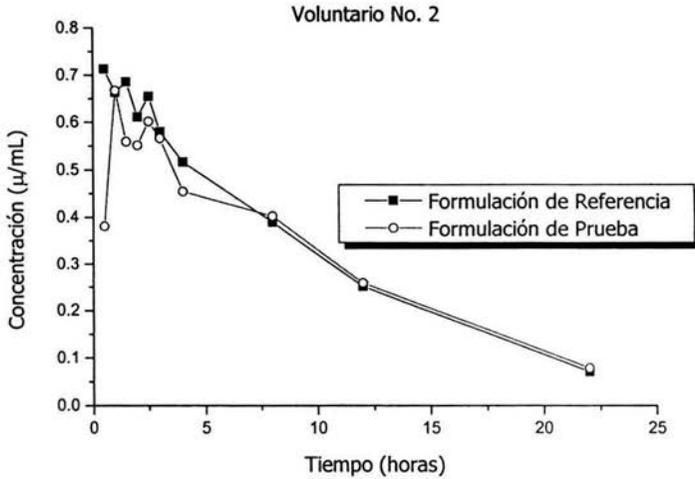
**Apéndice II:
Datos y Gráficas de Concentración Plasmática para Trimetoprim en Cada
Voluntario**

Voluntario 1		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	0.6207	0.9483
1.0	0.5359	0.7173
1.5	0.5809	0.8208
2.0	0.5789	0.7613
2.5	0.5396	0.7493
3.0	0.563	0.761
4.0	0.5392	0.6642
8.0	0.3778	0.4486
12.0	0.2917	0.3407
22.0	0.0992	0.1031
48.0	N.D.	N.D.

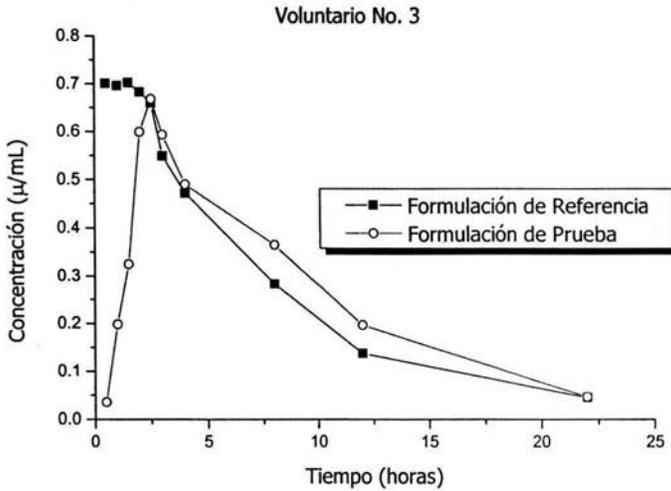
Voluntario No. 1



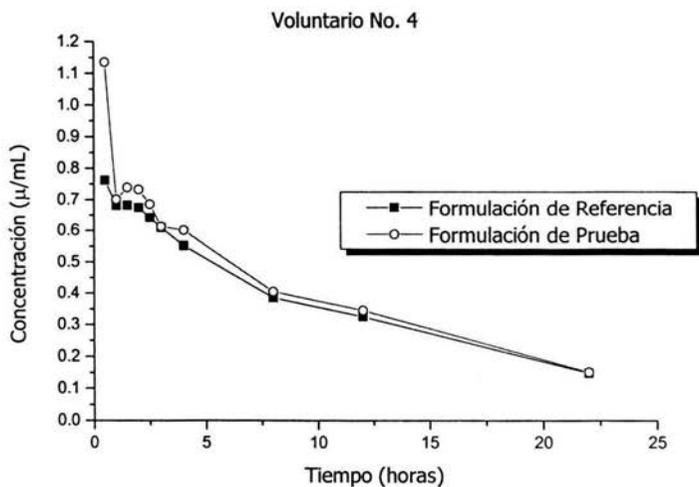
Voluntario 2		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	0.7132	0.3811
1.0	0.6637	0.6669
1.5	0.6854	0.559
2.0	0.6114	0.5513
2.5	0.6546	0.6015
3.0	0.5797	0.5656
4.0	0.5166	0.4542
8.0	0.3899	0.4026
12.0	0.2509	0.2585
22.0	0.0711	0.0788
48.0	N.D.	N.D.



Voluntario 3		
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	0.7005	0.0354
1.0	0.6957	0.1982
1.5	0.7018	0.3248
2.0	0.6826	0.5991
2.5	0.6596	0.6677
3.0	0.549	0.5934
4.0	0.4725	0.4902
8.0	0.2829	0.3648
12.0	0.1377	0.1968
22.0	0.0453	0.0467
48.0	N.D.	N.D.

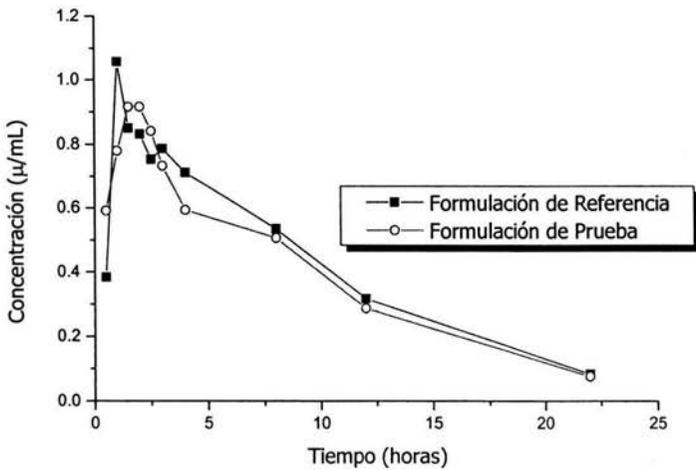


Voluntario 4		
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	0.7618	1.1348
1.0	0.6816	0.7013
1.5	0.6823	0.7389
2.0	0.6749	0.7326
2.5	0.642	0.6856
3.0	0.6091	0.6123
4.0	0.5517	0.6009
8.0	0.3852	0.4049
12.0	0.3252	0.3451
22.0	0.1476	0.1504
48.0	N.D.	N.D.

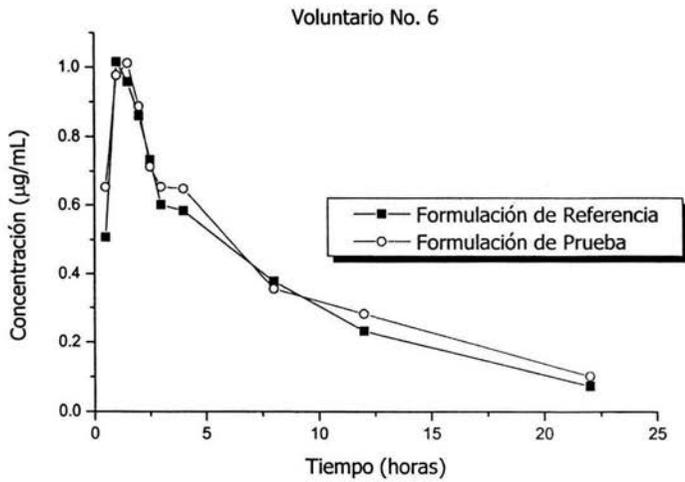


Voluntario 5		
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	0.384	0.5911
1.0	1.0566	0.7799
1.5	0.8498	0.9161
2.0	0.8322	0.9167
2.5	0.7536	0.8411
3.0	0.7867	0.7334
4.0	0.7124	0.5938
8.0	0.5353	0.5073
12.0	0.3171	0.2862
22.0	0.0826	0.0753
48.0	N.D.	N.D.

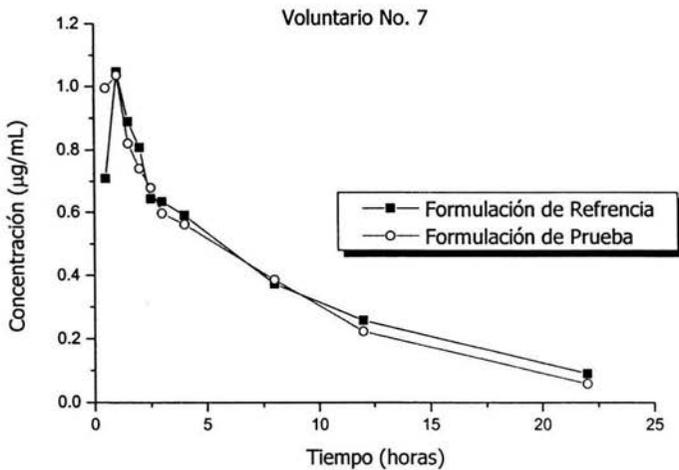
Voluntario No. 5



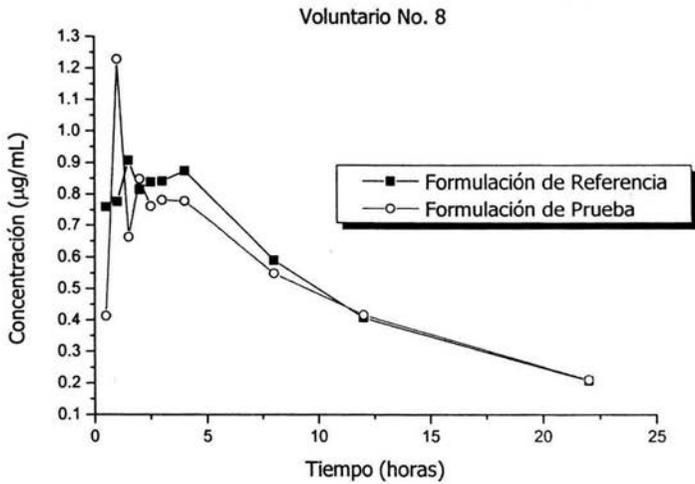
Voluntario 6		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	0.5069	0.6528
1.0	1.0153	0.9768
1.5	0.9577	1.0118
2.0	0.8602	0.8873
2.5	0.7329	0.7127
3.0	0.6012	0.6534
4.0	0.5835	0.6482
8.0	0.3775	0.3552
12.0	0.2321	0.2820
22.0	0.0727	0.1010
48.0	N.D.	N.D.



Voluntario 7		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	0.7093	0.9953
1.0	1.0463	1.0353
1.5	0.8894	0.8202
2.0	0.8071	0.741
2.5	0.6433	0.6789
3.0	0.6341	0.5964
4.0	0.5903	0.5619
8.0	0.3736	0.3866
12.0	0.2582	0.2233
22.0	0.0906	0.0587
48.0	N.D.	N.D.



Voluntario 8		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	0.7597	0.413
1.0	0.7762	1.2275
1.5	0.9066	0.6621
2.0	0.8145	0.8474
2.5	0.8376	0.7612
3.0	0.8402	0.7813
4.0	0.8737	0.7781
8.0	0.5904	0.5486
12.0	0.4073	0.4166
22.0	0.2066	0.21
48.0	N.D.	N.D.



APÉNDICE III

**Parámetros Farmacocinéticos de Trimetoprim por Voluntario y
Formulación**

**Apéndice III:
Parámetros Farmacocinéticos de Trimetoprim por Voluntario y Formulación**

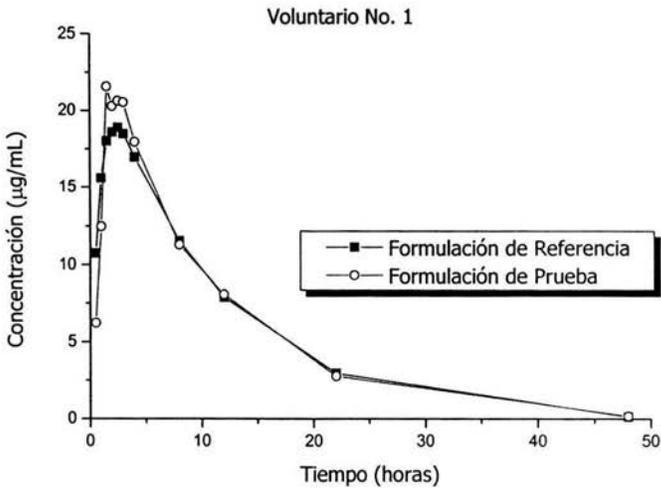
Sujeto	Formulación	Periodo	Secuencia	ABC _{0-t}	ABC _{0-inf}	C _{max}	T _{max}	T _{1/2}
1	A	1	AB	7.2469	8.3016	0.6207	0.5	7.3690
1	B	2	AB	8.9245	9.9210	0.9483	0.5	6.6992
2	A	1	AB	7.0618	7.7069	0.7132	0.5	0.2888
2	B	2	AB	6.7534	7.5367	0.6669	1.0	6.8901
3	B	1	BA	4.4678	6.1145	0.6677	2.5	5.7998
3	A	2	BA	4.7201	5.6031	0.7018	1.5	4.4448
4	B	1	BA	8.7447	10.7127	1.1348	0.5	9.0702
4	A	2	BA	8.1124	10.0920	0.7617	0.5	9.2964
5	A	1	AB	9.0680	9.7610	1.0566	1.0	5.8148
5	B	2	AB	8.4661	9.1040	0.9167	2.0	5.8721
6	B	1	BA	8.1310	9.1449	1.0118	1.5	6.9582
6	A	2	BA	7.4441	8.0696	1.0153	1.0	5.9640
7	B	1	BA	7.3904	7.8648	1.0353	1.0	5.6013
7	A	2	BA	7.7538	8.6222	1.0463	1.0	6.6439
8	A	1	AB	11.1074	13.7209	0.9066	1.5	8.7682
8	B	2	AB	10.6474	13.5746	1.2275	1.0	9.6619

APÉNDICE IV

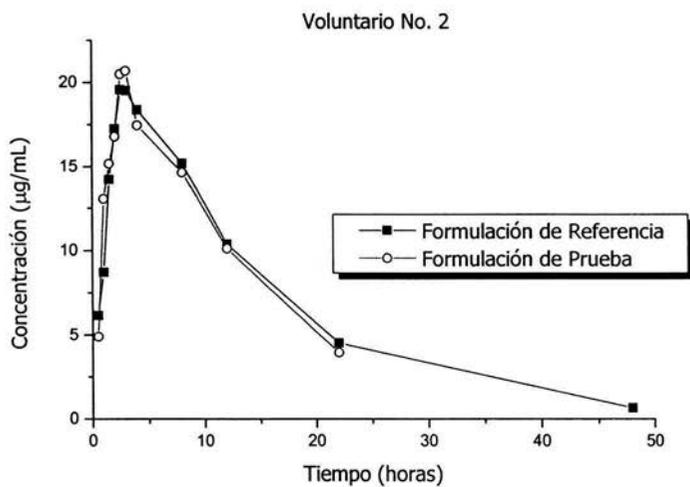
**Datos y Gráficas de Concentración Plasmática para Sulfametoxazol en
Cada Voluntario**

**Apéndice IV:
Datos y Gráficas de Concentración Plasmática para Sulfametoxazol en
Cada Voluntario**

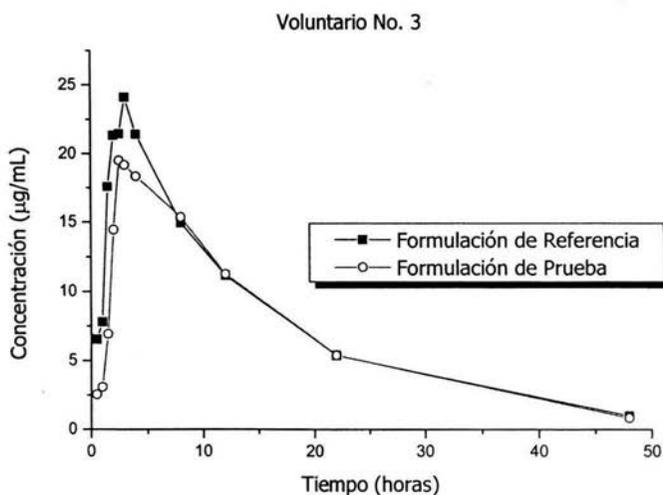
Voluntario 1		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	10.7514	6.2214
1.0	15.592	12.4754
1.5	18.0183	21.5657
2.0	18.5971	20.2809
2.5	18.8921	20.6293
3.0	18.4888	20.5363
4.0	16.9773	17.9580
8.0	11.5446	11.2898
12.0	7.8883	8.0679
22.0	2.9507	2.7619
48.0	0.1287	0.1732



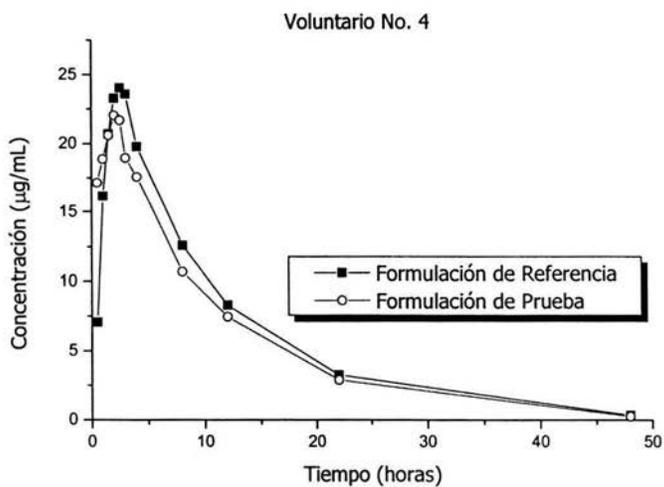
Voluntario 2		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	6.1561	4.8951
1.0	8.7124	13.0335
1.5	14.2190	15.1731
2.0	17.2490	16.7835
2.5	19.5601	20.4836
3.0	19.5046	20.6807
4.0	18.3779	17.4546
8.0	15.1919	14.6360
12.0	10.3763	10.1078
22.0	4.5053	3.9260
48.0	0.645	<0.5



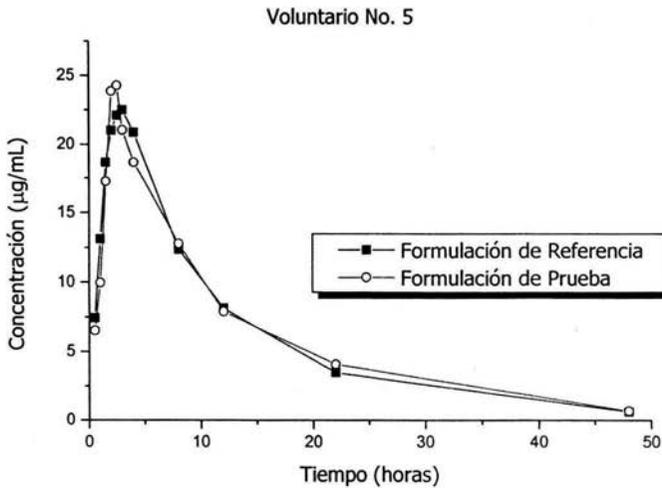
Voluntario 3		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	6.5440	2.5545
1.0	7.8037	3.0898
1.5	17.5739	6.9404
2.0	21.3285	14.4569
2.5	21.4367	19.5068
3.0	24.0985	19.1776
4.0	21.3916	18.3504
8.0	14.9437	15.3573
12.0	11.1498	11.2518
22.0	5.3769	5.3802
48.0	0.9828	0.8246



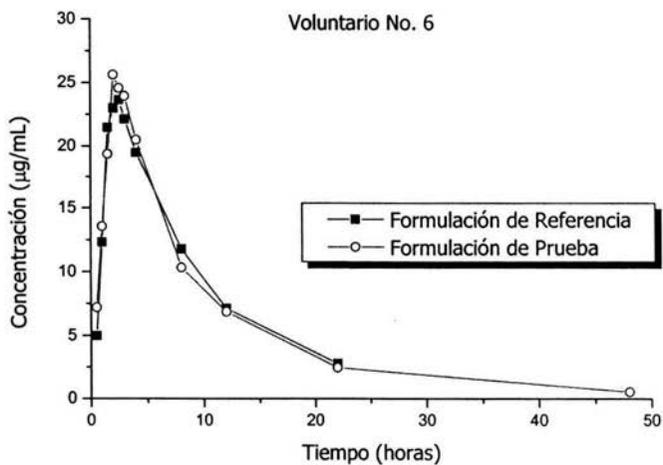
Voluntario 4		
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	7.0650	17.1335
1.0	16.1319	18.8703
1.5	20.7080	20.6010
2.0	23.2838	22.0379
2.5	24.0370	21.6824
3.0	23.5943	18.9603
4.0	19.7830	17.5664
8.0	12.5924	10.6833
12.0	8.2746	7.4473
22.0	3.2460	2.8864
48.0	0.3403	0.2500



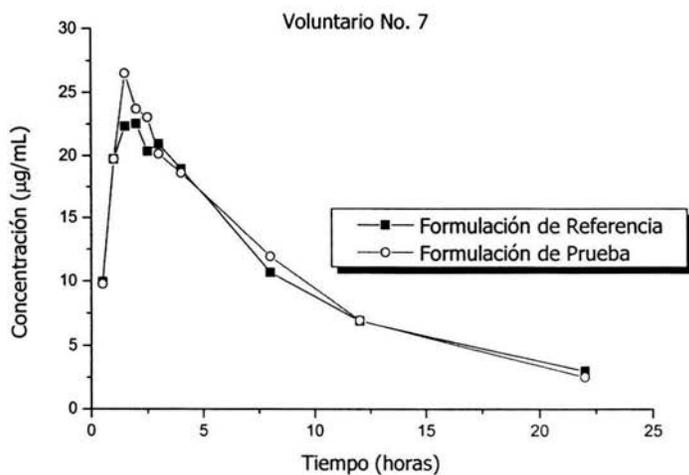
Voluntario 5		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	7.4343	6.5276
1.0	13.1262	9.9647
1.5	18.6655	17.2524
2.0	21.0141	23.8626
2.5	22.0911	24.2760
3.0	22.4845	21.0284
4.0	20.8508	18.6670
8.0	12.3682	12.7908
12.0	8.1385	7.8886
22.0	3.4727	4.0738
48.0	0.6214	0.6780



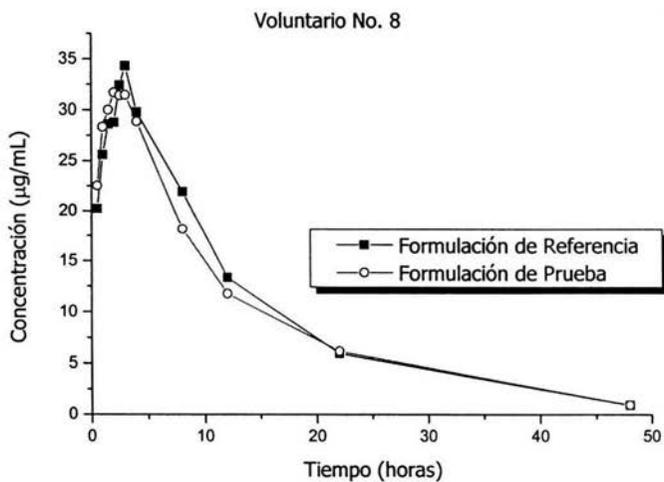
Voluntario 6		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	4.9729	7.2002
1.0	12.3235	13.5531
1.5	21.4591	19.3676
2.0	22.9908	25.6219
2.5	23.6288	24.5655
3.0	22.1204	23.9463
4.0	19.4845	20.4940
8.0	11.7702	10.3297
12.0	7.1193	6.8593
22.0	2.7963	2.4647
48.0	N.D.	0.5404



Voluntario 7		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	9.9470	9.7798
1.0	19.7474	19.7454
1.5	22.3399	26.5104
2.0	22.5315	23.7108
2.5	20.3597	23.0383
3.0	20.9367	20.1592
4.0	18.9709	18.6521
8.0	10.6823	11.9423
12.0	6.8958	6.9423
22.0	3.0138	2.5273
48.0	N.D.	N.D.



Voluntario 8		
Concentración (µg/mL)		
Tiempo (Horas)	Periodo 1 Formulación de Referencia (A)	Periodo 2 Formulación de Prueba (B)
0.0	0.0000	0.0000
0.5	20.2303	22.5425
1.0	25.6019	28.3236
1.5	28.6359	30.0306
2.0	28.7957	31.6980
2.5	32.4117	31.4211
3.0	34.3227	31.4682
4.0	29.8037	28.8834
8.0	21.9267	18.1543
12.0	13.3495	11.7788
22.0	5.9397	6.1704
48.0	0.8997	0.9305



Apéndice V

Datos y Gráficas de Concentración Plasmática para Sulfametoxazol en Cada Voluntario

**Apéndice V:
Parámetros Farmacocinéticos de Sulfametoxazol por Voluntario y Formulación**

Sujeto	Formulación	Periodo	Secuencia	ABC _{0-t}	ABC _{0-inf}	C _{max}	T _{max}	T _{1/2}
1	A	1	AB	213.3853	243.7285	18.8921	2.5	7.1279
1	B	2	AB	216.3276	243.1482	21.5657	1.5	6.7311
2	A	1	AB	316.4035	324.7353	19.5601	2.5	8.9537
2	B	2	AB	243.2600	289.1240	20.6807	3.0	8.0974
3	B	1	BA	331.2885	342.6004	19.5068	2.5	9.5086
3	A	2	BA	356.2800	370.7796	24.0985	3.0	10.2262
4	B	1	BA	217.5951	246.8658	22.0379	2.0	7.0291
4	A	2	BA	237.2878	269.8707	24.0370	2.5	6.9577
5	A	1	AB	287.1851	295.2189	22.4845	3.0	8.9614
5	B	2	AB	291.9062	301.1059	24.2760	2.5	9.4052
6	B	1	BA	255.0726	261.9301	25.6219	2.0	8.7959
6	A	2	BA	218.8864	245.0609	23.6288	2.5	6.4881
7	B	1	BA	222.1585	244.9255	26.5104	1.5	6.2443
7	A	2	BA	216.6613	246.0213	22.5315	2.0	6.7525
8	A	1	AB	467.8530	479.2121	34.3227	3.0	8.7513
8	B	2	AB	446.0500	458.3545	31.6980	2.0	9.1658

Apéndice No. VI

**Datos correspondientes al análisis en BIOPAK para
Trimetoprim.**

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: AUC_LAST

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 32.2113966 df 9
 Error Sum of Squares: 2.1232514 df 6
 Mean Square Error: 0.3538752

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	6.7931906	1	19.1966	0.0047
SUJETO(SECUENCIA)	25.2889714	6	11.9105	0.0041
PERIODO	0.0290702	1	0.0821	0.7840
FORMULA	0.1001643	1	0.2830	0.6138

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	6.7931906	1	19.1966	0.0047
SUJETO(SECUENCIA)	25.2889714	6	11.9105	0.0041
PERIODO	0.0290702	1	0.0821	0.7840
FORMULA	0.1001643	1	0.2830	0.6138

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast A VS B	0.1001643	1	0.2830	0.6138
Contrast: 1-1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test SECUENCIA	6.7931906	1	1.6117	0.2513
Using SUJETO(SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: AUC_LAST

FORMULA	Value	Std. Error
A	7.93068	0.21032
B	8.08892	0.21032

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: AUC_LAST

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

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 7.930681, s.e. 0.210320

Test : B Least squares mean 8.088925, s.e. 0.210320

Difference = 0.1582, s.e.d. 0.2974, df 6
 Ratio = 101.9953

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (96.5948 , 107.3959)	(93.9733 , 106.0267)
C.L. 90%	= (94.7056 , 109.2850)	(92.0310 , 107.9690)
C.L. 95%	= (92.8159 , 111.1748)	(90.1303 , 109.8697)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0005 Prob(> 120%)=0.0015 Max=0.0015 Total=0.0020

A.H. p-value = 0.0010
 Power = 0.9862

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: AUC_INF

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 71.9329555 df 9
 Error Sum of Squares: 2.4119735 df 6
 Mean Square Error: 0.4019956

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	11.0946387	1	27.5989	0.0019
SUJETO(SECUENCIA)	60.6819381	6	25.1586	0.0005
PERIODO	0.0106051	1	0.0264	0.8763
FORMULA	0.1457736	1	0.3626	0.5691

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	11.0946387	1	27.5989	0.0019
SUJETO(SECUENCIA)	60.6819381	6	25.1586	0.0005
PERIODO	0.0106051	1	0.0264	0.8763
FORMULA	0.1457736	1	0.3626	0.5691

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast
 A VS B 0.1457736 1 0.3626 0.5691
 Contrast: 1-1

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test
 SECUENCIA 11.0946387 1 1.0970 0.3353
 Using SUJETO(SECUENCIA) as error term

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: AUC_INF

FORMULA	Value	Std. Error
---------	-------	------------

A	9.04642	0.224164
B	9.23733	0.224164

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: AUC_INF

Alpha = 0.0500 Bioequivalence Limits: Lower = 0.800 Upper = 1.200

Transformation = NONE Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 9.046425, s.e. 0.224164

Test : B Least squares mean 9.237327, s.e. 0.224164

Difference = 0.1909, s.e.d. 0.3170, df 6
 Ratio = 102.1102

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (97.0641 , 107.1564)	(94.2156 , 105.7844)
C.L. 90%	= (95.2990 , 108.9215)	(92.3918 , 107.6082)
C.L. 95%	= (93.5333 , 110.6872)	(90.6146 , 109.3854)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0004 Prob(> 120%)=0.0011 Max=0.0011 Total=0.0015

A.H. p-value = 0.0007
 Power = 0.9915

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: Cmax_ALL

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares:	0.3882421	df	9
Error Sum of Squares:	0.1463501	df	6
Mean Square Error:	0.0243917		

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	0.0063322	1	0.2596	0.6286
SUJETO(SECUENCIA)	0.3420403	6	2.3371	0.1626
PERIODO	0.0011885	1	0.0487	0.8326
FORMULA	0.0386811	1	1.5858	0.2547

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	0.0063322	1	0.2596	0.6286
SUJETO(SECUENCIA)	0.3420403	6	2.3371	0.1626
PERIODO	0.0011885	1	0.0487	0.8326
FORMULA	0.0386811	1	1.5858	0.2547

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast A VS B	0.0386811	1	1.5858	0.2547
Contrast: 1-1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test SECUENCIA	0.0063322	1	0.1111	0.7503
Using SUJETO(SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: Cmax_ALL

FORMULA	Value	Std. Error
A	0.852787	0.0552174
B	0.951125	0.0552174

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Cmax_ALL

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

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 0.852787, s.e. 0.055217

Test : B Least squares mean 0.951125, s.e. 0.055217

Difference = 0.0983, s.e.d. 0.0781, df 6
 Ratio = 111.5313

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (98.3455 , 124.7171)	(79.9172 , 120.0828)
C.L. 90%	= (93.7331 , 129.3295)	(75.0362 , 124.9638)
C.L. 95%	= (89.1193 , 133.9433)	(70.3960 , 129.6040)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0069 Prob(> 120%)=0.1954 Max=0.1954 Total=0.2022

A.H. p-value = 0.1885
 Power = 0.4023

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: Tmax_ALL

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 4.1406250 df 9
 Error Sum of Squares: 0.9687500 df 6
 Mean Square Error: 0.1614583

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	0.1406250	1	0.8710	0.3867
SUJETO (SECUENCIA)	3.5937500	6	3.7097	0.0678
PERIODO	0.0156250	1	0.0968	0.7663
FORMULA	0.3906250	1	2.4194	0.1708

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	0.1406250	1	0.8710	0.3867
SUJETO (SECUENCIA)	3.5937500	6	3.7097	0.0678
PERIODO	0.0156250	1	0.0968	0.7663
FORMULA	0.3906250	1	2.4194	0.1708

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast A VS B	0.3906250	1	2.4194	0.1708
Contrast: 1-1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test SECUENCIA	0.1406250	1	0.2348	0.6452
Using SUJETO (SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: Tmax_ALL

FORMULA	Value	Std. Error
A	0.9375	0.142064
B	1.25	0.142064

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Tmax_ALL

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

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 0.937500, s.e. 0.142064

Test : B Least squares mean 1.250000, s.e. 0.142064

Difference = 0.3125, s.e.d. 0.2009, df 6
 Ratio = 133.3333

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (102.4742 , 164.1925)	(46.9537 , 153.0463)
C.L. 90%	= (91.6795 , 174.9871)	(35.5065 , 164.4935)
C.L. 95%	= (80.8816 , 185.7851)	(24.6661 , 175.3339)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0236 Prob(> 120%)=0.7216 Max=0.7216 Total=0.7453

A.H. p-value = 0.6980
 Power = 0.0978

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: HALF_ALL

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 33.8615694 df 9
 Error Sum of Squares: 1.6871691 df 6
 Mean Square Error: 0.2811948

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	1.2066011	1	4.2910	0.0837
SUJETO (SECUENCIA)	32.6268402	6	19.3382	0.0011
PERIODO	0.0270768	1	0.0963	0.7668
FORMULA	0.0010514	1	0.0037	0.9532

Weighted Squares of Means (Type 3)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	1.2066011	1	4.2910	0.0837
SUJETO (SECUENCIA)	32.6268402	6	19.3382	0.0011
PERIODO	0.0270768	1	0.0963	0.7668
FORMULA	0.0010514	1	0.0037	0.9532

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast
 A VS B 0.0010514 1 0.0037 0.9532
 Contrast: 1-1

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test
 SECUENCIA 1.2066011 1 0.2219 0.6542
 Using SUJETO(SECUENCIA) as error term

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: HALF_ALL

FORMULA	Value	Std. Error
A	6.97953	0.187482
B	6.99574	0.187482

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: HALF_ALL

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

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 6.979530, s.e. 0.187482

Test : B Least squares mean 6.995742, s.e. 0.187482

Difference = 0.0162, s.e.d. 0.2651, df 6
 Ratio = 100.2323

Classical

Westlake

C.L. 80% = (94.7621 , 105.7025) (94.5218 , 105.4782)
C.L. 90% = (92.8486 , 107.6160) (92.6084 , 107.3916)
C.L. 95% = (90.9345 , 109.5300) (90.6945 , 109.3055)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0009 Prob(> 120%)=0.0010 Max=0.0010 Total=0.0019

A.H. p-value = 0.0001
Power = 0.9849

Apéndice No. VII

Datos correspondientes al análisis en BIOPAK para Sulfametoxazol.

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: AUC_LAST

Total Observations: 16 Observations Used: 16
 Model Sum of Squares: 81391.1511961 df 9
 Error Sum of Squares: 3229.2269007 df 6
 Mean Square Error: 538.2044835

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	10916.8083025	1	20.2838	0.0041
SUJETO(SECUENCIA)	69470.8867264	6	21.5132	0.0008
PERIODO	403.0962185	1	0.7490	0.4201
FORMULA	600.3599488	1	1.1155	0.3316

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	10916.8083025	1	20.2838	0.0041
SUJETO(SECUENCIA)	69470.8867264	6	21.5132	0.0008
PERIODO	403.0962185	1	0.7490	0.4201
FORMULA	600.3599488	1	1.1155	0.3316

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast A VS B	600.3599488	1	1.1155	0.3316
Contrast: 1-1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test SECUENCIA	10916.8083025	1	0.9429	0.3690
Using SUJETO(SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: AUC_LAST

FORMULA	Value	Std. Error
A	300.075	8.20217
B	287.823	8.20217

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: AUC_LAST

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

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 300.074603, s.e. 8.202168

Test : B Least squares mean 287.823481, s.e. 8.202168

Difference = -12.2511, s.e.d. 11.5996, df 6
Ratio = 95.9173

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (90.3510 , 101.4836)	(92.2376 , 107.7624)
C.L. 90%	= (88.4038 , 103.4308)	(90.1843 , 109.8157)
C.L. 95%	= (86.4561 , 105.3785)	(88.2232 , 111.7768)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0031 Prob(> 120%)=0.0004 Max=0.0031 Total=0.0035

A.H. p-value = 0.0027
Power = 0.9830

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: AUC_INF

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 79013.9624688 df 9
 Error Sum of Squares: 1209.9358723 df 6
 Mean Square Error: 201.6559787

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	10041.8399409	1	49.7969	0.0004
SUJETO(SECUENCIA)	68460.7606668	6	56.5821	0.0001
PERIODO	3.3150524	1	0.0164	0.9022
FORMULA	508.0468087	1	2.5194	0.1636

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	10041.8399409	1	49.7969	0.0004
SUJETO(SECUENCIA)	68460.7606668	6	56.5821	0.0001
PERIODO	3.3150524	1	0.0164	0.9022
FORMULA	508.0468087	1	2.5194	0.1636

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast A VS B	508.0468087	1	2.5194	0.1636
Contrast: 1-1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test SECUENCIA	10041.8399409	1	0.8801	0.3844
Using SUJETO(SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: AUC_INF

FORMULA	Value	Std. Error
---------	-------	------------

A	312.851	5.02066
B	301.581	5.02066

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: AUC_INF

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

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 312.851222, s.e. 5.020657

Test : B Least squares mean 301.581275, s.e. 5.020657

Difference = -11.2699, s.e.d. 7.1003, df 6
Ratio = 96.3977

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (93.1296 , 99.6657)	(94.3122 , 105.6878)
C.L. 90%	= (91.9864 , 100.8089)	(93.0998 , 106.9002)
C.L. 95%	= (90.8429 , 101.9525)	(91.9520 , 108.0480)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0002 Prob(> 120%)=0.0000 Max=0.0002 Total=0.0002

A.H. p-value = 0.0002
Power = 0.9997

4/16/10
18:41:08

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: Cmax_ALL

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares:	235.2588056	df	9
Error Sum of Squares:	30.5494988	df	6
Mean Square Error:	5.0915831		

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	1.8954406	1	0.3723	0.5641
SUJETO (SECUENCIA)	232.2195607	6	7.6014	0.0131
PERIODO	0.8009355	1	0.1573	0.7054
FORMULA	0.3428688	1	0.0673	0.8039

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	1.8954406	1	0.3723	0.5641
SUJETO (SECUENCIA)	232.2195607	6	7.6014	0.0131
PERIODO	0.8009355	1	0.1573	0.7054
FORMULA	0.3428688	1	0.0673	0.8039

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast A VS B	0.3428688	1	0.0673	0.8039
Contrast: 1-1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test SECUENCIA	1.8954406	1	0.0490	0.8322
Using SUJETO (SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: Cmax_ALL

FORMULA	Value	Std. Error
A	23.6944	0.797777
B	23.9872	0.797777

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Cmax_ALL

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

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 23.694400, s.e. 0.797777

Test : B Least squares mean 23.987175, s.e. 0.797777

Difference = 0.2928, s.e.d. 1.1282, df 6
 Ratio = 101.2356

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (94.3791 , 108.0922)	(92.9470 , 107.0530)
C.L. 90%	= (91.9806 , 110.4906)	(90.5288 , 109.4712)
C.L. 95%	= (89.5815 , 112.8898)	(88.1250 , 111.8750)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0021 Prob(> 120%)=0.0038 Max=0.0038 Total=0.0060

A.H. p-value = 0.0017
 Power = 0.9352

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: Tmax_ALL

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 3.000000 df 9
 Error Sum of Squares: 0.750000 df 6
 Mean Square Error: 0.125000

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
--------	----	----	---	------

SECUENCIA	0.2500000	1	2.0000	0.2070
SUJETO (SECUENCIA)	1.7500000	6	2.3333	0.1631
PERIODO	0.0000000	1	0.0000	1.0000
FORMULA	1.0000000	1	8.0000	0.0300

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	0.2500000	1	2.0000	0.2070
SUJETO (SECUENCIA)	1.7500000	6	2.3333	0.1631
PERIODO	0.0000000	1	0.0000	1.0000
FORMULA	1.0000000	1	8.0000	0.0300

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast

A VS B	1.0000000	1	8.0000	0.0300
Contrast: 1-1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test

SECUENCIA	0.2500000	1	0.8571	0.3903
Using SUJETO(SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: Tmax_ALL

FORMULA	Value	Std. Error
A	2.625	0.125
B	2.125	0.125

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Tmax_ALL

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

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 2.625000, s.e. 0.125000

Test : B Least squares mean 2.125000, s.e. 0.125000

Difference = -0.5000, s.e.d. 0.1768, df 6
 Ratio = 80.9524

		Classical		Westlake
C.L. 80%	= (71.2551 ,	90.6497)	(74.8448 , 125.1552)
C.L. 90%	= (67.8629 ,	94.0418)	(71.2468 , 128.7532)
C.L. 95%	= (64.4697 ,	97.4350)	(67.8532 , 132.1468)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.4461 Prob(> 120%)=0.0006 Max=0.4461 Total=0.4467

A.H. p-value = 0.4455
 Power = 0.6907

BIOPAK ANOVA

Dependent variable: HALF_ALL

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 28.7303170 df 9
 Error Sum of Squares: 0.3784034 df 6
 Mean Square Error: 0.0630672

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
SECUENCIA	2.0879005	1	33.1060	0.0012
SUJETO (SECUENCIA)	26.0637567	6	68.8782	0.0001
PERIODO	0.4660977	1	7.3905	0.0347
FORMULA	0.1125621	1	1.7848	0.2300

Weighted Squares of Means (Type 3)

SECUENCIA	2.0879005	1	33.1060	0.0012
SUJETO (SECUENCIA)	26.0637567	6	68.8782	0.0001
PERIODO	0.4660977	1	7.3905	0.0347
FORMULA	0.1125621	1	1.7848	0.2300

Contrasts

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast				
A VS B	0.1125621	1	1.7848	0.2300
Contrast: 1-1				

Hypothesis Tests

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test				
SECUENCIA	2.0879005	1	0.4806	0.5141
Using SUJETO(SECUENCIA) as error term				

BIOPAK ANOVA

Least Squares Means

Dependent variable: HALF_ALL

FORMULA	Value	Std. Error
A	7.94876	0.0887885
B	7.78101	0.0887885

BIOPAK ANOVA

Bioavailability Statistics

Dependent variable: HALF_ALL

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

Formulation variable: FORMULA

Formulation reference: A

Reference : Least squares mean 7.948757, s.e. 0.088789

Test : B Least squares mean 7.781006, s.e. 0.088789

Difference = -0.1678, s.e.d. 0.1256, df 6
Ratio = 97.8896

	Classical	Westlake
C.L. 80%	= (95.6149 , 100.1643)	(96.4218 , 103.5782)
C.L. 90%	= (94.8192 , 100.9600)	(95.5790 , 104.4210)
C.L. 95%	= (94.0232 , 101.7560)	(94.7789 , 105.2211)

Two One Sided T-tests

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

A.H. p-value = 0.0000

Power = 1.0000

Apéndice No. VIII

Tabla correspondiente a la Distribución estadística "t"

$\alpha \backslash \phi$.25	.20	.15	.10	.05	.025	.01	.005	.0005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	636.619
2	.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.598
3	.765	.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.941
4	.741	.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610
5	.727	.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.859
6	.718	.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7	.711	.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.405
8	.706	.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9	.703	.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10	.700	.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11	.697	.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437
12	.695	.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13	.694	.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14	.692	.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140
15	.691	.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16	.690	.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015
17	.689	.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18	.688	.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19	.688	.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883
20	.687	.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850
21	.686	.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819
22	.686	.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23	.685	.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.767
24	.685	.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.397	3.745
25	.684	.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26	.684	.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707
27	.684	.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690
28	.683	.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674
29	.683	.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659
30	.683	.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646
40	.681	.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.551
60	.679	.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.460
120	.677	.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	3.373
∞	.674	.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.291

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

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Hardman, Joel G. Goodman and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la terapéutica. 9 a. Edición, Volumen II, Ed. Mc. Graw-Hill. Interamericana, México, 1996, pp. 1123-1132.
- 2) Bertram G. Katzung. Farmacología Básica y Clínica. 7ª. Edición, Ed. Manual Moderno pp. 877 – 881.
- 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. Diario Oficial de la Federación, Primera sección, Viernes 7 de Mayo de 1999.
- 4) Marisela Herrera Ayala. Estudio in Vitro de Productos Comerciales Conteniendo Ácido Acetilsalicílico, 2000 pp 2 a 6.
- 5) Arancibia Aquiles, Pezoa Regina; Biodisponibilidad de Medicamentos. Simposio Internacional I; Universidad de Chile, Chile 1992. pp 15, 25 a 50, 239 -245, 267-275, 277-280.
- 6) Fernández Sánchez Eduardo; Biofarmacia, Tomo II; Instituto Politécnico Nacional y ministerio de educación superior; México D.F 1997. pp 289-316.
- 7) Estévez C. Estudios de bioequivalencia: enfoque metodológico y aplicaciones prácticas en la evaluación de medicamentos genéricos. Revista Medica de Uruguay. 16 (2000) pp 133-143.

- 8) Chow SC, Lui JP, Desing and Analises of the Bioavailability and Bioequivalence Studies, Marcel Dekker, Inc., New York 1992. pp 63- 69, 154 – 161.

- 9) Smilack J.D., Trimethoprim – Sulfamethoxazole. Mayo Clin Proc, 1999; No. 74: pp 730 a 734.

- 10) Clark, Isolation and Identification of Drugs, Volumen No.1, The Pharmaceutical Press, London 1990 pp. 988 y 1049.

- 11) Klaus Florey. Ananalytical Profiles of Drugs Substances. Vol. 19 Ed. Academic Press, INC. 1990. San Diego California.

- 12) Lundstrom T.S., Sobel J.D. Vancomycin, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Rifampim. Infect Dis Clin. 1995;9(3):747-764.

- 13) DEF MEXICO. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Interacciones medicamentosas entre principios activos y medicamentos. www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/default.htm
www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/mex/ingredientes/2345.htm

- 14) Vademecum. Farmacocinética. La combinación Trimetoprim-Sulfametoazol es rápida y extensamente absorbida por el tracto gastrointestinal. www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/t074.htm

- 15) DEF MEXICO. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Interacciones medicamentosas entre principios activos y medicamentos. www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/default.htm
www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/mex/ingredientes/6850.htm

- 16) 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. Diario Oficial de la Federación, primera sección Jueves 19 de Marzo de 1999.
- 17) Reglamento de Insumos para la salud. Diario Oficial de la federación, 3 Febrero de 1998.
- 18) Acuerdo por el cual se relacionan las especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables y se determinan las pruebas que deberán aplicárseles. SSA. Diario Oficial de la Federación Primera Sección 19 de Marzo 1998.
- 19) Schuirmann DJ. A comparison gives the procedures he/she gives two one-sides test and the method gives power to evaluate the he/she gives the half biodisponibilidad. J. Pharmacokin Biopharm 715 (1987). Pp 657 – 680.
- 20) Hauck WW. Anderson S. A new stadistival procedure to prove the equivalence in rehearsals gives comparative biodisponibilidad he/she gives two groups. J. Pharmacokin Biopharm 12 (1984) pp. 83 – 91.
- 21) Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires. Curso de Biodisponibilidad y Nuevas Formas Farmacéuticas. Universidad de la Ciudad de Buenos Aires.

- 22) Cárdenas H. Aspectos Biofarmacéuticos de la Evaluación de Medicamentos. Universidad Autónoma Metropolitana. 1ª Edición México D.F., 1996 pp 19 - 28, 31 - 43, 109 - 133, 231 - 246.
- 23) FEUM Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7ª Edición

FE DE ERRATAS

En la página 75 las tablas 30 y 31 correspondientes a los promedios de los parámetros farmacocinéticos, existe un error tipográfico en los promedios y sus debidas desviaciones estándar, los resultados correctos son los siguientes:

Tabla No. 1: Parámetros farmacocinéticos promedio correspondientes a Trimetoprim para ambas formulaciones.

Parámetro Farmacocinético Promedio +/- D.E.	Formulación de Referencia (A)	Formulación de Prueba (B)
(ABC _{0-t}) (μg*h/mL)	7.9307 ± 1.8169	8.0890 ± 1.8137
(ABC _{0-∞}) (μg*h/mL)	9.0442 ± 2.3532	9.2373 ± 2.2681
C máx (μg/mL)	0.8528 ± 0.1743	0.9511 ± 0.2011
T máx (h)	0.9375 ± 0.4173	1.2500 ± 0.7071
T ½ (h)	6.9795 ± 2.8245	6.9957 ± 1.5169

Tabla No. 2: Parámetros farmacocinéticos correspondientes a Sulfametoxazol para ambas formulaciones.

Parámetro Farmacocinético Promedio +/- D.E.	Formulación de Referencia (A)	Formulación de Prueba (B)
(ABC _{0-t}) (μg*h/mL)	300.0750 ± 89.2903	287.8230 ± 78.9004
(ABC _{0-∞}) (μg*h/mL)	312.8510 ± 82.0031	301.5810 ± 73.2223
C máx (μg/mL)	23.6944 ± 4.7240	23.9872 ± 3.9506
T máx (h)	2.6250 ± 0.3536	2.1250 ± 0.5175
T ½ (h)	7.9488 ± 1.3647	7.7810 ± 1.2966