



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE 3 PREPARADOS COMERCIALES DE AMOXICILINA TRIHIDRATADA EN PREMEZCLA INDICADA PARA CERDOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
ARACELI MORALES BECERRIL

ASESORES: HÉCTOR SUMANO LÓPEZ
LUIS OCAMPO CAMBEROS



MÉXICO, D. F.

2005

m 343283



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.

DEDICATORIAS

A MI **MAMÁ** POR ENSEÑARME A LUCHAR POR LO QUE UNO QUIERE. TE QUIERO
MUCHO

A **NIZÚ SHARADAD** POR SER LA LUZ QUE ILUMINA TODOS MIS DIAS, TE QUIERO
MUCHO MI NIÑA

A **HORACIO ALDABA** POR AYUDARME A QUE ESTE SUEÑO SE REALIZARA, TE
AMO

A MI **PAPÁ** POR APOYARME EN ESTE PROYECTO

A **TODO AQUEL** QUE ME AYUDO Y ME PUSO OBSTACULOS PARA REALIZAR MI
SUEÑO

AGRADECIMIENTOS

TE AGRADESCO **MAMI**, POR ENSEÑARME A QUE LAS COSAS PARA QUE SALGAN BIEN CUESTAN Y AVECES HAY QUE SUFRIR UN POCO PERO AL FINAL LA SATISFACCION DE REALIZAR LO QUE UNO SE PROPONES TIENE DOBLE RECOMPENSA.

A TI **NIZU SHARASAD**, POR TENER UN ABRAZO PARA MI CADA QUE LO NECESITE.

A **HORACIO ALDABA**, POR SU COMPRESION Y SU AMOR, GRACIAS POR TODO

A **PAPÁ**, POR AYUDARME EN ESTA ETAPA TAN IMPORTANTE DE MI VIDA, GRACIAS PAPI.

A TODA LA FAMILIA **ALDABA RAMIREZ**, EN ESPECIAL A LA SEÑORA MARY Y A DALIA SIN SU AYUDA NUNCA LO HUBIERA LOGRADO.

A MIS **AMIGOS** LOS QUE ESTUBIERON Y A LOS QUE NUNCA SE PRESENTARON

A EL DOCTOR **DAVID PAEZ ESQUILIANO** POR CREER EN MI SIEMPRE

A EL DOCTOR **LUIS OCAMPO** POR AYUDARME SIEMPRE

A EL DOCTOR **HECTOR SUMANO** POR SIEMPRE TENER TIEMPO PARA MI Y MIS DUDAS.

DIOS LES DEVUELVA MULTIPLICADO POR MIL TODO LO QUE HICIERON POR MI

!!!!GRACIAS!!!!!!

CONTENIDO

Índice	1
Resumen	2
Abstract	3
Introducción	4
Hipótesis	8
Metodología	8
Análisis estadístico	11
Resultados	12
Discusión	13
Bibliografía	14

RESUMEN

ARACELI MORALES BECERRIL. Estudio de la estabilidad de 3 preparados comerciales de amoxicilina trihidratada en premezcla indicada para cerdos. Asesores MVZ Héctor Sumano López , MVZ Luis Ocampo Camberos.

Con el objetivo de determinar la velocidad de degradación de la amoxicilina trihidratada incluida en tres premezclas comerciales (una blindada y dos no), se sometieron las premezclas a calentamiento en presencia de humedad y con una diferencia de tiempo de 24 horas.

Se determinó mediante pruebas de difusión en agar la actividad antimicrobiana de los principios activos, y se compararon los valores de milímetros de halos de inhibición contra una curva patrón para expresarlos como microgramos por gramo de premezcla. Se encontró que únicamente la premezcla en presentación blindada conserva su actividad antimicrobiana a un nivel que puede tener utilidad clínica y muy superior al de las otras dos presentaciones de amoxicilina trihidratada cuando se les comparó con un análisis de varianza ($P < 0.001$). Estos estudios permiten postular que la velocidad de degradación de la amoxicilina trihidratada no blindada en premezcla que son sometidas a temperaturas elevadas (peletizado y a la presencia de humedad) generarán respuestas clínicas pobres y variadas, este ensayo sugiere que la y deberá revisarse la bioequivalencia y labilidad de los antibióticos en premezcla a las condiciones del peletizado y de elaboración del alimento final.

ABSTRACT

Stability of three commercial preparations of trihydrated amoxicillin as premix intended for pigs

PMVZ Morales Becerril Araceli. Supervisors: Dr. Héctor Sumano López, Dr. Luis Ocampo Camberos

In order to determine the rate of degradation of three commercially available premix preparation of trihydrated amoxicillin under the influence of heat and humidity, the following trial was carried out. Amoxicillin preparations were labeled as A and B when they were not microencapsulated, while a third group (C) was regarded as the reference preparation of microencapsulated trihydrated amoxicillin. To determine the *in vitro* antimicrobial activity of the β -lactamic drug, an agar diffusion test was adapted to assess the size of the inhibition halo against a standard curve made with the pure hydrated amoxicillin moiety. After various challenges of heat and humidity it became clear that only the reference amoxicillin premix preparation retained most of its antibacterial activity and was statistically superior in antibacterial activity when compared to groups A and B ($P < 0.001$). These studies allow the conclusion of the rapid degradation of trihydrated amoxicillin when it is not microencapsulated or such a process is defective. Such premixes preparations can not withstand the standard pig processing of feed at the farm level, and may render variable and unreliable clinical results.

Estudio de la estabilidad de 3 preparados comerciales de amoxicilina trihidratada en premezcla indicada para cerdos

INTRODUCCIÓN

Recientemente se han constituido los estudios de bioequivalencia (BE) en la base para la autorización de la comercialización de los fármacos genéricos. Este nombre se le asigna a las formulaciones de mismo principio activo y que a menudo ponderan con un precio bastante inferior a los fármacos de marca, siendo ésta la principal justificación de su existencia. Su precio es inferior porque la inversión económica realizada por el laboratorio farmacéutico para su desarrollo y comercialización es menor que en el caso de los medicamentos innovadores o de referencia, ya que para los genéricos no es necesario demostrar la eficacia y no se estudia la relación beneficio/riesgo del producto, ni se invierte en descubrir las indicaciones para las que se va a utilizar. En la mayoría de los casos, basta con demostrar que las concentraciones plasmáticas alcanzadas son similares a las que se alcanzan con el producto original. Se considera un producto innovador (o de marca) aquel que se ha autorizado y comercializado en base a un *dossier* completo que incluye datos químicos, biológicos, farmacéuticos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos, tanto de eficacia como de seguridad. Para los estudios de BE de genéricos éste es el fármaco de referencia. Los estudios de BE no se utilizan solamente para los fármacos genéricos, sino que también son utilizados en muchas ocasiones por los laboratorios investigadores cuando se cambia la formulación o se investigan diferentes vías de administración que busca una biodisponibilidad comparable (4). De hecho, el 59% de las formulaciones de los productos de marca comercializadas son distintas de las

formulaciones utilizadas en los principales ensayos clínicos en fase II y III en los que se ha demostrado la eficacia y seguridad del producto.(1)

En 1977 la agencia norteamericana de regulación de fármacos la FDA (*Food and Drug Administration*) estableció que se requería la determinación de la farmacocinética para los estudios de bioequivalencia y que un factor sería en la cantidad total del fármaco absorbida, medida a través del área bajo la curva (AUC) en la velocidad de absorción, medida como la concentración máxima (Cmax).

En medicina humana hasta que surgió la idea de evaluar la bioequivalencia de preparados farmacéuticos de un mismo principio activo, muchos genéricos habían surgido sin problemas, sin embargo a partir de 1984 la FDA en Estados Unidos y en México exigieron pruebas de BE .(1,2)

Los parámetros para definir la bioequivalencia que se utilizan actualmente, y que se describen más adelante, se establecieron a principios de los años 90 y se basan en que no exista una diferencia mayor a un 20% entre las dos formulaciones; la de referencia –original- y la genérica. Recientemente, las autoridades reguladoras europeas y americanas han propuesto patrones definidos para determinar la BE, pero todavía no han sido aprobados en esas instancias (1,2,3). Los estudios de bioequivalencia tienen como objetivo aportar evidencia para la elección o sustitución entre preparados elaborados por diferentes fabricantes, conteniendo el mismo principio activo. Se ha establecido que dos productos son bioequivalentes cuando resultan estadísticamente indistinguibles basándose en sus respectivas curvas de concentración-tiempo del fármaco activo en una matriz biológica apropiada (con un rango de tolerancia de 0.8 a 1.25 con respecto al preparado de referencia) (4,5)

No todos los productos o preparados genéricos requieren estudios de BE. Habiendo demostrado identidad química y concentración se exceptúan de realizar BE , en general, todos los productos formulados como soluciones acuosas y aquellos que no están diseñados para ser absorbidos o si tienen absorción local pueden requerir otro tipo de estudios como los estudios farmacodinámicos. (4,6)

Recientemente la FDA (*Food and Drug Administration*) de Estados Unidos aprobó otorgar exenciones de estudios de BE *in vivo* a ciertas formas farmacéuticas orales sólidas de liberación inmediata. Esto con base en propiedades fisicoquímicas del principio activo y de la forma farmacéutica en lo que se llamó el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) (1,4). Sin embargo una de las limitaciones para el empleo del SCB como mecanismo de exención de estudios *in vivo*, utilizando alternativamente estudios *in vitro*, es la complejidad y costo de la determinación de la permeabilidad de los principios activos en estudio con respecto en la o las membranas utilizadas (1).

Es importante señalar que las agencias reguladoras consideran inadecuado realizar pruebas de eficacia clínica para determinar la BE o ausencia de BE dado que existen una gran cantidad de variables en las pruebas clínicas que no se pueden controlar y que alterarían la percepción de equivalencia, reduciendo la confiabilidad (4,6)

Por otro lado, se ha demostrado que aunque los medicamentos se consideren equivalentes químicos porque contienen cantidades idénticas del mismo principio activo, no se puede considerar como alternativas farmacéuticas directas, hasta que se determine si logran las concentraciones plasmáticas máximas con relación al fármaco de referencia en virtud de que difieren los vehículos en los que se encuentran

(1,4,7,8). Asimismo es, posible que dos preparados no sean químicamente idénticos a pesar de tener aparentemente un mismo principio activo. ejemplo, al cambiar de sal (clorhidrato, sulfato etc.), No obstante si ofrecen perfiles plasmáticos dentro de los límites mencionados como necesarios para lograr BE, se les debe considerar así . Por lo tanto, las diferencias en excipientes o en el proceso de fabricación (compactación, presencia de capa enterica) dan lugar a notables diferencias en la disolución, estabilidad y biodisponibilidad de las formulaciones. (4,7)

Si se evalúa en el contexto nacional la necesidad de contar con preparados antibióticos que ofrezcan respuestas homogéneas, entonces se puede deducir que es necesario realizar pruebas de bioequivalencia de los productos disponibles en el mercado. En otros países es necesario demostrar bioequivalencia para genéricos bajo los criterios que se muestran en el *cuadro 1*. Sin embargo estos requisitos aún no se establecen en nuestro país, lo que ha dado lugar a la existencia de productos no bioequivalentes (8).

Uno de los medicamentos de mayor uso en la clínica porcina es la amoxicilina trihidratada, administrada en el alimento para el control principalmente de *Streptococcus suis* (9,10). Al igual que la gran mayoría de los β -lactámicos la amoxicilina es inestable y lábil a la luz, humedad y calor, condiciones éstas que a menudo se presentan en la elaboración del alimento y que seguramente degradan a la amoxicilina. Por otro lado existen preparados recubiertos (blindados) que tienen el potencial de ser más estables durante la elaboración de la premezcla y del alimento medicado que por lo tanto pueden llegar en mayor dosis al interior del tubo intestinal del cerdo . Se ha demostrado que la bioequivalencia de preparados blindados o no

blindados es similar en cerdos y el impacto real sobre la bioequivalencia de la amoxicilina en esta especie en el manejo del β -lactámico durante el procesado (11).

Considerando lo anterior, se plantea en este estudio llevar a cabo evaluaciones *in vitro* para desafiar la estabilidad de 2 productos genéricos con respecto al producto de referencia protegido (blindado), todos en premezcla, a fin de determinar que dosis real se ofrece en el alimento a los cerdos cuando supuestamente se les debe administrar a razón de 10 mg / kg.

Hipótesis

Existen diferencias cuantificables en la actividad microbiológica *in vitro* entre 2 preparados-premezclas de amoxicilina trihidratada genérica y la premezcla de referencia antes y después de someterlas a desafíos de estabilidad.

Objetivo

Evaluar mediante pruebas microbiológicas la actividad antimicrobiana de dos preparados genéricos de amoxicilina trihidratada en premezcla y compararla con la amoxicilina trihidratada de referencia, recubierta (blindada) en premezcla antes y después de someterlas a desafíos de estabilidad.

Material y Métodos

Se evaluó la actividad de tres amoxicilinas trihidratadas en premezcla a partir de las presentaciones comerciales clasificados para este estudio de la siguiente manera:

Grupo A amoxicilina trihidratada de referencia Suramox 20 % (Virbac®)

Grupo B amoxicilina genérica 30 %

Grupo C amoxicilina genérica 36 %

Prueba de eficacia antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana por medio del método de dilución en agar Bennet *et al* (13). Realizando dos diluciones decuples y 10 diluciones dobles de acuerdo con los siguientes desafíos:

- a) Evaluación directa de la premezcla homogeneizando con un rotor de alta velocidad (IKA®). Realizando la extracción de premezcla en 50 ml de buffer fosfato, ajustado con pH 6.5 con HCL 0.1N . Se filtraron las muestras (Whatman® 0.45 µm) con presión positiva y se sometieron a desecación por liofilización. Posteriormente se reconstituyeron en el mismo buffer en agua desionizada (100 ml) y se sometieron a evaluación microbiológica.
- b) Evaluación de la premezcla añadiendo alimento comercial homogenizando con un rotor de alta velocidad IKA®. Sometido 24 horas a una temperatura de 40°C con humedad aproximada del 60% lograda mediante vaporizador. Al final de este periodo se realiza la extracción de la manera descrita en el inciso anterior .
- c) Como las premezclas vienen a diferentes porcentajes se tomaron los pesos necesarios de cada premezcla para iniciar con los mismos mg teóricos de amoxicilina de la siguiente manera:

Premezcla A) 2.5 g de premezcla

B) 1.6g de premezcla

C) 1.3g de premezcla

Equivalentes a 500 mg de amoxicilina trihidratada cada una, después se diluyeron en buffer y se procede a realizar las diferentes diluciones de la manera descrita en la figura 1.

Técnica de Bennet et al (13)

Preparación del estándar

Se tomaron 50g de amoxicilina, se colocó en un matraz y se aforó a 100 ml con agua desionizada. Se marcaron 12 tubos de 10 ml del 1 hasta el 12. Del matraz se sacaron 10 ml de la dilución hecha los cuales se vertieron en el tubo marcado con el número 1; en el tubo 2 y 3 se vertieron 9 ml de agua desionizada y en los tubos restantes (4-12) se vertió 5ml en cada uno de ellos. Del tubo número 1 se tomó 1 ml y se agregó en el tubo 2, se homogenizó y de este se tomó 1 ml y se agregó al tubo 3; una vez más se tomó 1 ml y se homogenizó (diluciones decuples), del tubo número 3 se tomó 5 ml y se agregó al tubo 4 a partir del tubo número 5 se tomaron 5 ml de cada tubo para pasar al siguiente de forma que se realizaron diluciones dobles y se continuó hasta completar los 9 tubos. *Figura 1*

Cultivo Bacteriano

Se utilizó una cepa bacteriana ATCC (*American Type Culture Collection*) 25922 de *Escherichia coli*.

Estándar bacteriano

En un tubo de tapón de rosca se colocaron 5 ml de agua destilada y una asada del cultivo bacteriano joven (resembrado 24 horas antes) de *Escherichia coli*, y por medio de los estándares de turbidez de Mc Farland se realizaron los ajustes necesarios a la dilución para obtener una concentración final al 0.5 de Mc Farland. La turbidez al 0.5 de Mc Farland se obtuvo por medio de un espectrofotómetro a una transmitancia del 60-65%, la que corresponde a una concentración bacteriana de 1×10^{14} .

Preparación de las placas

El agar que se utilizó fue el de Mac Conkey (Bixon®) preparado a razón de 50g / l , siguiendo las indicaciones que marca el producto. En un refractario tipo Pirex® de 21 X 20 cm, estéril, se colocaron 300 ml de agar se dejó enfriar por 10 minutos. Sobre el agar ya frío se colocó 400 µl de la suspensión bacteriana y por medio de un hisopo estéril se distribuyó homogéneamente sobre todo el agar.

Lectura de las placas

Una vez preparada la placa y con ayuda de un sacabocado se realizaron a lo largo del refractario, dos hileras de 10 pozos cada una. Se colocó en cada pozo 1ml de cada una de las diluciones, realizándose por duplicado. Se realizaron 4 placas en el mismo día con la misma metodología con la finalidad de tener un total de 4 lecturas por cada desafío, finalmente se incubaron durante 24 horas a 37°C

Análisis estadístico

Se obtuvieron medias y desviaciones estándar del diámetro de halo de inhibición de cada una de las diluciones, éstas a la vez se traspolaron a datos en donde pudiese representarse la concentración en µg por mililitro de cada uno de los halos . A partir de los cuales y con ayuda de los programas Microcal Origin versión 4.0 y Excel, se obtuvieron las gráficas de milímetros de halo de inhibición vs concentración.

RESULTADOS

En total se llevaron a cabo 240 pruebas microbiológicas, representadas en halos de Inhibición, estos a su vez fueron traspolados a datos en donde los resultados fueran interpretados en concentraciones, μg por mililitro, en la figura 2 se muestra la curva de recuperación de concentración de amoxicilina con una ($P = <0.0001$).

En los cuadros 3 y 4 se detallan, ya traspoladas, las concentraciones en μg por mililitro de la amoxicilina trihidratada de referencia grupo A (Suramox®) y en la figura 3, se graficaron los datos comparativos que pertenecen a la premezcla identificada como grupo A (Suramox®) antes y después de ser sometida a los desafíos; en los cuadros 5,6 y figura 4, los que corresponden a la premezcla B y en los cuadros 7,8 y figura 5 se muestran los resultados de la premezcla C. En la figura 6 se muestra el comparativo de las tres premezclas utilizadas. Los resultados mostraron una diferencia significativa diferencia entre la amoxicilina de referencia (Suramox®) y las otras dos.

DISCUSIÓN

Para evaluar la identidad y la concentración de un principio activo en alimento medicado se puede recurrir a técnicas químico-analíticas de gran precisión. Por ejemplo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que permite identificar diferencias en concentración de microgramos y aun de nanogramos.(Flores F.J. 2002) No obstante, la implementación de la técnica y el costo por muestra analizada pueden ser prohibitivos. Mas aun, la identificación de una sustancia en términos de su velocidad de elusión permiten su identificación y cuantificación precisas pero, no se puede deducir actividad antibacteriana. Por ejemplo, es factible que se tenga el mismo tiempo de elusión para formas isómeras (dextro, levo, cis y trans) de un mismo principio activo y a menudo solo una de estas formas es biológicamente activo. (Sumano 2004) En contraste los métodos microbiológicos son menos precisos y su sensibilidad es mas gruesa. Pero brindan valores de actividad antimicrobiana expresada como concentración y por lo tanto generan un valor clínico más tangible. La técnica utilizada en este ensayo (Bennet 1966) es una técnica validada y a pesar de haber sido diseñada en 1966 se le sigue utilizando por la razón expuesta.(Sumano 2001,2003) Adicionalmente se prefirió esta técnica por sobre la simple comparación de halos de inhibición de una extracción simple contra el estándar y los otras amoxicilinas, porque se comparan varias concentraciones lo que reduce el error intra e inter ensayo.

Los resultados obtenidos indican claramente que las presentaciones de amoxicilina en premezclas deben necesariamente contemplar el microencapsulamiento de este principio activo. De los tres productos analizados solo el Suramox® asegura que el principio activo se encuentra micro encapsulado (blindado) mientras que los otros dos productos omiten esta descripción pero también evitan negarla. Los antibióticos β -

lactámicos son muy inestables en presencia de humedad calor y rápidamente reactivos en presencia de vitaminas, minerales y otros elementos de la dieta (Anfossi P. 2002) De tal suerte, los resultados obtenidos podrían haberse considerado como predecibles. Sin embargo se pensaría que las autoridades reguladoras del país así como los fabricantes de premezclas a base de amoxicilina trihidratada tomarían la labilidad de la amoxicilina en cuenta antes de permitir el registro o autorizar la venta de la premezcla.

Las reducciones de la actividad microbiológica expresada en microgramos de las premezclas evaluadas fue de un mínimo de $0.09\mu\text{m/ml}$ y de un máximo de $50\mu\text{g/ml}$ y con una diferencia de tiempo de 24 horas de exposición al calor y humedad en la solución buffer, por lo que resultan obvias las consecuencias de añadir estas premezclas a las mezcladoras y peletizadoras de alimento. Se alcanzan temperaturas mayores a los 90C y un mínimo de 50C cuando se peletiza el alimento y temperaturas variables

cuando se agrega grasa caliente a la mezcla de nutrientes. Si se piensan realizar estudios de bioequivalencia (BE) con preparados de naturaleza química tan distinta como en este ensayo, sería recomendable evaluar primero la viabilidad de los principios activos *in vitro* como se ha descrito en este ensayo.

Las implicaciones de tener disponibles a la venta productos de tan distintos rendimientos una vez hecha la mezcla de alimentos, pueden incluir la generación de cepas bacterianas resistentes por la exposición a bajas concentraciones del principio activo en el organismo de los animales ó bien a la presentación de brotes o recrudescimientos de las enfermedades para las cuales se esta prescribiendo la amoxicilina trihidratada como por ejemplo *Actinobacillus pleuropneumoniae* (9.10).

BIBLIOGRAFÍA

1. Abad SF, Martínez SE, Gálvez MMA. Estudio de bioequivalencia análisis y aspectos metodológicos., Universidad Autónoma de Madrid. 2003
2. FDA (Food and Drug Administration.) Division of bioequivalence. Office of Generic Drug. Statistical procedures for bioequivalence studies using standard two-treatment crossover design. Guidance for Industry. Rockville; 1992.
3. EMEA (European Agency for the Evaluation of Medical Products). CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products). Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence (draft). Diciembre, 1998.
4. ANMAT, Boletín para profesionales, Número especial dedicado a biodisponibilidad y bioequivalencia. Agosto 2002; X (3-4):33-64.
5. Flores FJ. Biodisponibilidad y bioequivalencia en los medicamentos genéricos, Edit AscipiusXXI, S.A. de C.V., 2002.
6. Sumano LH, Ocampo CL. Bioequivalencia de algunos antibacterianos de uso veterinario. Resumen en las Memorias de la XXXV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Yucatán. SAGAR, INIFAP, UNAM Octubre. 1999
7. Estévez CF. Estudios de bioequivalencia: enfoque metodológico y aplicaciones prácticas en la evaluación de medicamentos genéricos, Rev. Med. Uruguay, Septiembre 2000; 16:133-143.
8. Sumano LH., Ocampo CL, Gutierrez OL. Bioequivalence of six generic preparations of enrofloxacin in pigs. Pig veterinary Journal.2003;51: 64-73.
9. Pijpers A, Klingeren B, Schoevers EJ. In vitro activity of five tetracyclines and some other antimicrobials agents against four porcine respiratory tract pathogens. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics1989;12:267-276.

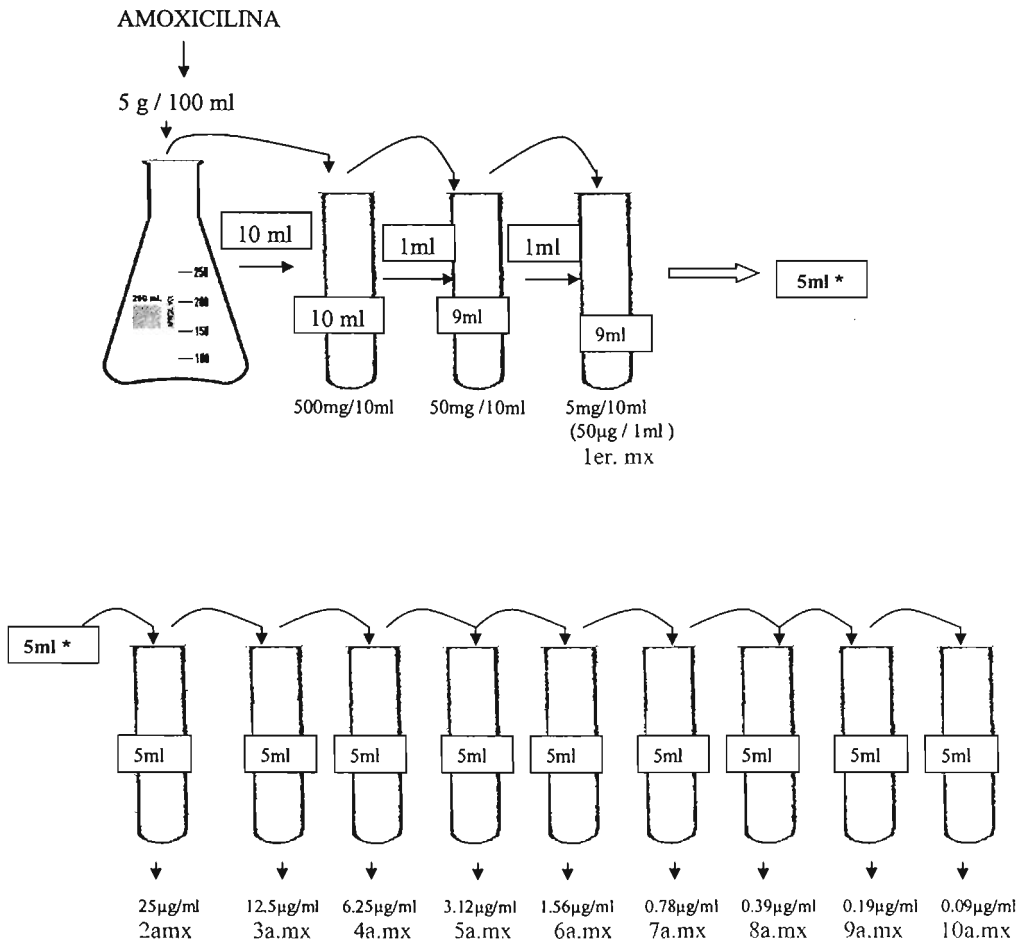
10. Kataoka Y, Yoshida T, & Sawada T. A 10- year survey of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in Japan, Journal of Veterinary Medical Sciences 2000;62:10053-1057.
11. Anfonssi P, Zaghini A, Grassigli G, Relative oral bioavailability of microgranulated amoxicillin in pigs, Journal Veterinary. Pharmacology Therapeutic. 2002 (25):329-334
12. Bert A, de Boer G. Drug absorption enhancement. Concepts, possibilities, limitations and trends. Edit. Harwood academic publishers. 1993
13. Bennet JB, Brodie JL, Benner EJ, Kirby WM. Simplified accurate method for antibiotic assay, Clinical specimens. American Society of Microbiology. 1966; 14170-177.
14. Sumano LH, Gutiérrez OL, Zamora QMA. Bioequivalence of six trademarks of enrofloxacin in poultry. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2001; 24:1-5
15. Sumano LH., Ocampo CL, Gutiérrez OL. Bioequivalence of six generic preparations of enrofloxacin in pigs. Pig veterinary Journal. 2003;51: 64-73.
- 16 Sumano LH., Ocampo CL., Farmacología Veterinaria, McGraw-Hill, México 2004

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 1.
Requerimientos específicos adicionales para la validación de la bioequivalencia

CRITERIOS ADICIONALES			
	FDA	TPD	EMA
Metrics on which to prove BE	C _{max} AUC _{0-t} AUC _{inf}	C _{max} AUC _{0-t} AUC _{0-t}	C _{max} AUC _{0-t} AUC _{inf}
CI on C _{max}	Yes, 80-125	None usually (e.g. yes for drugs listed in schedule C)	Yes 80-125 (larger can be justified)
Need for metabolite data	Supportive evidence if the metabolite is formed before/ during the absorption process	None usually	Yes if the drug is or metabolite contribute to the efficacy
Need for a steady state study	No	Yes if the AUC _X /AUC _{inf} is less than 80%	Yes if the formulation is a prolonged release or a transdermal one.
Need for a food effect study	Need if the effect of food is specified in the labelling	Yes for a modified release formulation Need for an immediate release Formulation if there is a food effect reported with the reference product.	Yes for a delayed release or a prolonged release formulation. Needed for on immediate release formulation if there is a food effect reported with the reference product
Specific requirements for critical dosed drugs	No	Yes	
Minimum percentage of the AUC that needs to be observed (e.g. AUC _{0-t} /AUC _{inf} ratio)	Greater than 88 %	Greater than 80 %	Greater than 80 %

Figura 1
Técnica de Bennet *et al.*
Para la preparación del estándar



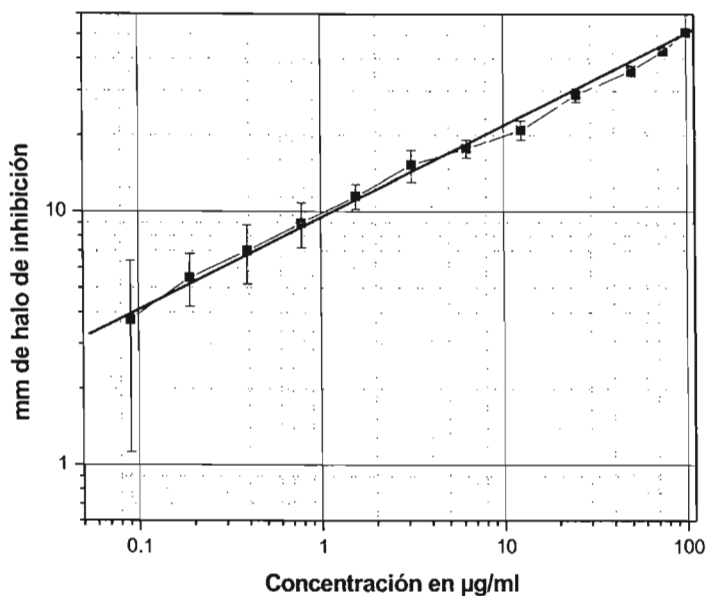


Figura 2. Curva de recuperación de concentración de amoxicilina trihidratada ($\mu\text{g/ml}$) vs. mm de halo de inhibición.

en $\mu\text{g/ml}$	Concentración				X	\pm DE
	1	2	3	4		
100	50	52	53	49	51	1.82574
75	42	44	45	41	43	1.82574
50	35	37	38	34	36	1.82574
25	28	30	31	27	29	1.82574
12.5	20	22	23	19	21	1.82574
6.25	17	19	19	16	17.75	1.5
3.125	14	16	18	13	15.25	2.21736
1.56	11	13	12	10	11.5	1.29099
0.78	8	10	11	7	9	1.82574
0.39	6	8	9	5	7	1.82574
0.19	5	7	6	4	5.5	1.29099
0.09	4	6	5	0	3.75	2.62996

Cuadro2. Curva de recuperación (referencia) de concentración de amoxicilina trihidratada ($\mu\text{g/ml}$) vs. mm de halo de inhibición.

Regresión polinomial:

$$Y = A + B1 * X + B2 * X^2$$

Weight given by Data1_G error bars.

Parameter	Value	Error
A	0.98616	0.03253
B1	0.28984	0.05351
B2	0.0325	0.02312

R-Square(COD)	SD	N	P
0.9941	0.54834	12	<0.0001

Cuadro 3

Actividad antimicrobiana de amoxicilina trihidratada de Suramox®. extracción de la premezcla directamente.

Concentración en µg/l ml	REPETICIONES				X	± DE
	1	2	3	4		
50	34	33	32	33	33	0.8165
25	30	31	30	29	30	0.8165
12.5	28	27	28	27	27.5	0.57735
6.25	20	19	20	19	19.5	0.57735
3.125	15	14	16	15	15	0.8165
1.56	10	11	13	14	12	1.82574
0.78	8	7	9	10	8.5	1.29099
0.39	6	5	6	7	6	0.8165
0.19	5	4	4	5	4.5	0.57735
0.09	4	4	5	4	4.25	0.5

Cuadro 4

Actividad antimicrobiana de amoxicilina trihidratada de Suramox® extracción a partir del desafío de calentamiento premezcla- alimento.

Concentración en µg/l ml	REPETICIONES				X	± DE
	1	2	3	4		
50	30	30	31	29	30	0.8165
25	27	26	27	24	26	1.41421
12.5	25	24	22	19	22.5	2.64575
6.25	19	20	19	18	19	0.8165
3.125	12	13	12	12	12.25	0.5
1.56	8	9	8	7	8	0.8165
0.78	6	7	7	5	6.25	0.95743
0.39	4	5	5	4	4.5	0.57735
0.19	0	4	4	0	2	2.3094
0.09	0	0	0	0	0	0

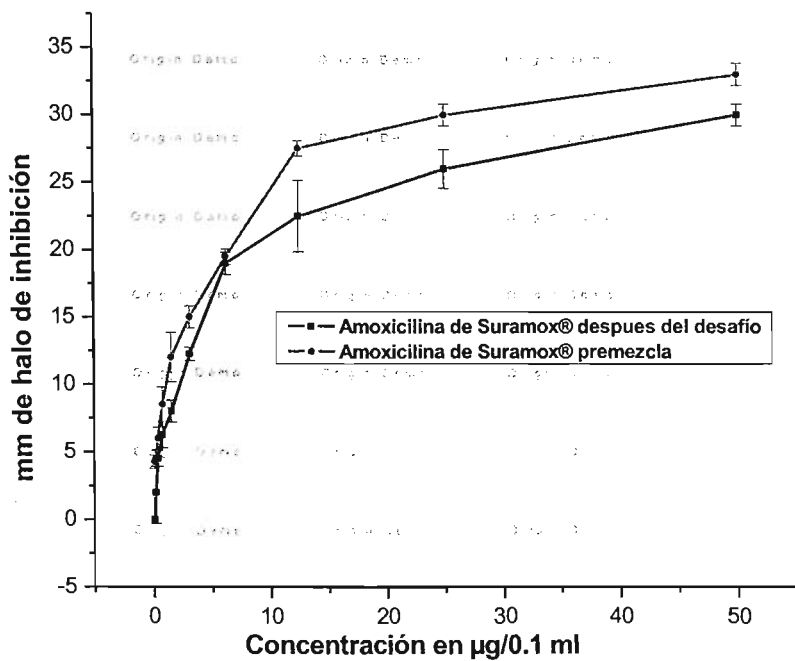


Figura3. Relación de las medias y desviaciones estándar de la concentración de amoxicilina-trihidratada de Suramox® extracción directa y después del desafío premezcla-alimento.

Cuadro 5
Actividad antimicrobiana de amoxicilina trihidratada del grupo B extracción de la premezcla directamente.

Concentración en µg/1 ml	REPETICIONES					X	± DE
	1	2	3	4			
50	26	25	28	27		26.5	1.29099
25	23	22	24	25		23.5	1.29099
12.5	19	18	20	19		19	0.8165
6.25	14	12	15	16		14.25	1.70783
3.125	10	8	10	11		9.75	1.25831
1.56	8	6	8	9		7.75	1.25831
0.78	5	4	6	8		5.75	1.70783
0.39	4	0	4	6		3.5	2.51661
0.19	0	0	0	4		1	2
0.09	0	0	0	0		0	0

Cuadro 6
Actividad antimicrobiana de amoxicilina trihidratada B extracción a partir del desafío de calentamiento premezcla- alimento.

Concentración en µg/1 ml	REPETICIONES					X	± DE
	1	2	3	4			
50	20	18	21	21		20	1.41421
25	18	16	17	15		16.5	1.29099
12.5	12	14	11	13		12.5	1.29099
6.25	8	10	9	11		9.5	1.29099
3.125	6	8	5	9		7	1.82574
1.56	4	5	4	7		5	1.41421
0.78	0	0	0	5		1.25	2.5
0.39	0	0	0	4		1	2
0.19	0	0	0	0		0	0
0.09	0	0	0	0		0	0

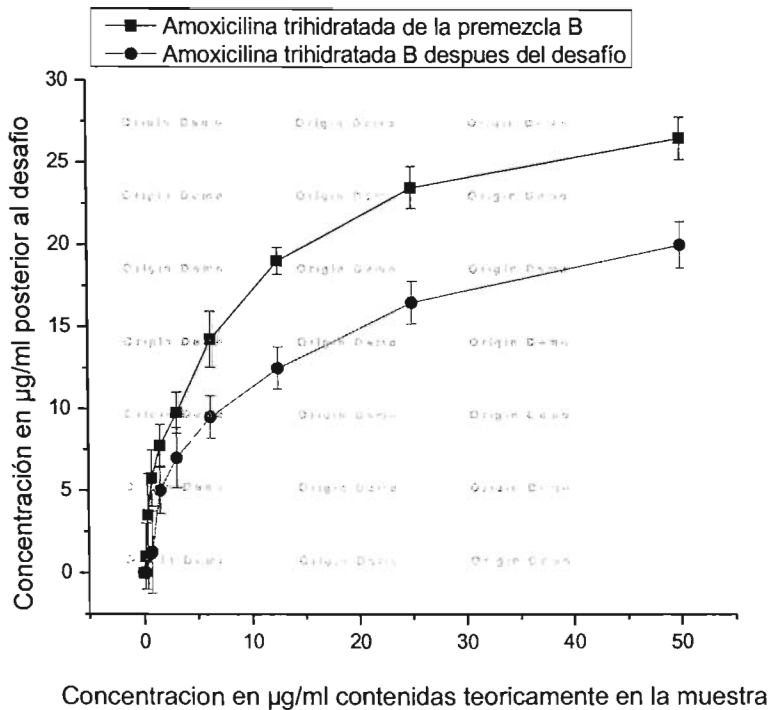


Figura 4. Relación de las medias y desviaciones estándar de la concentración de amoxicilina-trihidratada del grupo B extracción directa y después del desafío premezcla-alimento

Cuadro 7
Actividad antimicrobiana de amoxicilina trihidratada del grupo C extracción de la premezcla directamente.

Concentración en µg/1 ml	REPETICIONES					X	± DE
	1	2	3	4			
50	24	23	26	25		24.5	1.290994
25	21	20	22	24		21.75	1.70782
12.5	17	16	18	18		14.75	0.957427
6.25	12	14	13	14		13.25	0.957427
3.125	8	6	8	11		8.25	2.061552
1.56	6	4	7	9		6.5	2.081666
0.78	4	2	6	7		4.75	2.217355
0.39	2	0	4	5		2.75	2.217355
0.19	0	0	0	4		1	2
0.09	0	0	0	0		0	0

Cuadro 8
Actividad antimicrobiana de amoxicilina trihidratada C extracción a partir del desafío de calentamiento premezcla- alimento.

Concentración en µg/1 ml	REPETICIONES					X	± DE
	1	2	3	4			
50	12.5	11	12	11.5		11.75	0.645997
25	10	9	11.5	10		10.125	1.030776
12.5	8	7	9	11		8.75	1.707825
6.25	6	5	8	9		7	1.825741
3.125	4	4	6	8		5.5	1.914854
1.56	4	3	6	7		5	1.825741
0.78	2	0	5	5		3	2.449489
0.39	0	0	2	3		1.25	1.5
0.19	0	0	0	2		0.5	1
0.09	0	0	0	0		0	0

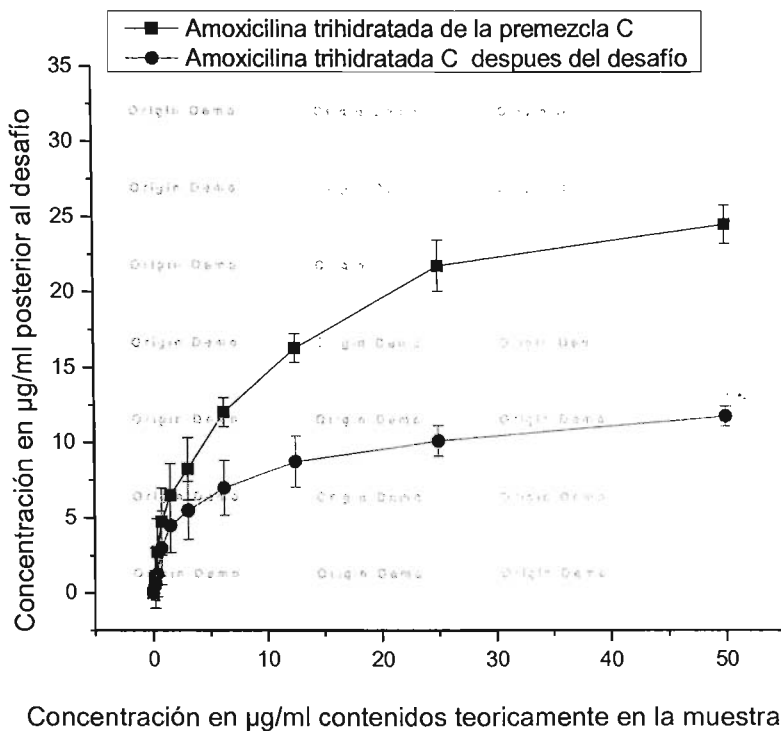


Figura 5. Relación de las medias y desviaciones estándar de la concentración de amoxicilina-trihidratada del grupo C extracción directa y después del desafío premezcla-alimento

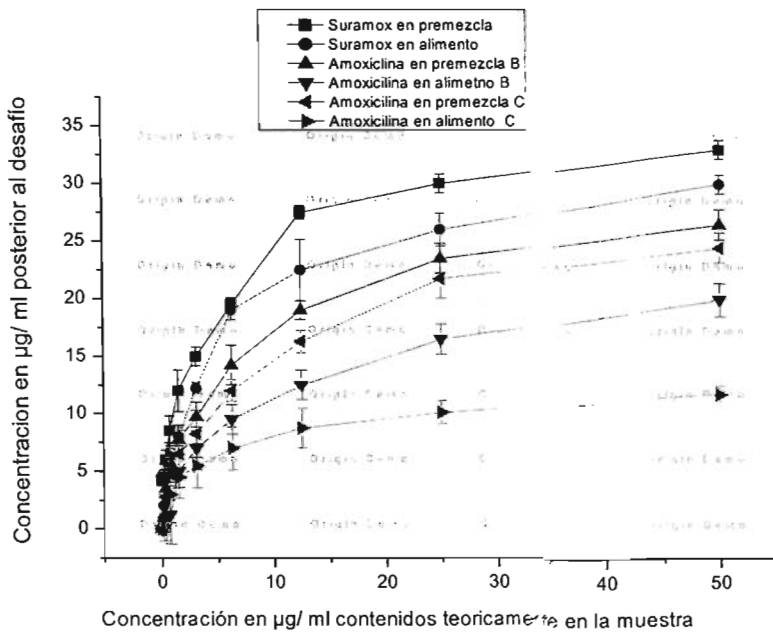


Figura 6. Comparación de las actividades antibacterianas de amoxicilina trihidratada de dos marcas, antes y después de incorporar las premezclas al alimento