

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

" ESTUDIO DE EQUIVALENCIA FARMACEUTICA Y BIODISPONIBILIDAD DE "
AMPICILINA TH. EN CAPSULAS DEL MERCADO NACIONAL

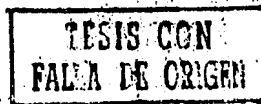
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN QUIMICA FARMACEUTICA
(CONTROL DE MEDICAMENTOS Y FARMACOS)

PRESENTA

Q.F.B. MARIA ANGELICA DORANTES GUEVARA.

MEXICO, D.F.



1982

00565
1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

CONTENIDO

	Página
Agradecimientos	i
Contenido	iv
Lista de Figuras	xix
Lista de Tablas	xi
Lista de Apéndices	xxiv
Capítulo I	1
1. Introducción	2
1.1. Presentación y objetivo	2
Capítulo II	5
2. Generalidades	6
(Monografía de ampicilina)	
2.1. Descripción	6
2.2. Propiedades Físicas	7
2.3. Estabilidad de ampicilina	16
2.4. Métodos de fabricación	24
2.5. Métodos de análisis	24
2.6. Consideraciones de interés Biofar- macéutico.	26

	Página
Capítulo III	38
3. Parte Experimental.	39
3.1. Control Farmacéutico	41
3.2. Estudios <i>in vitro</i> ; disolución de productos de ampicilina del mercado nacional.	41
3.2.1. Determinación cuantitativa de ampi- cilina en HCl 0.1N y agua destilada	41
3.2.1.1. Instrumentos	42
3.2.1.2. Reactivos	42
3.2.1.3. Método	43
3.2.2.4. Linealidad y repetibilidad	43
3.2.1.5. Reproducibilidad	44
3.2.2. Perfil de disolución de catorce pro- ductos farmacéuticos de ampicilina th.	44
3.2.2.1. Instrumentos	45
3.2.2.2. Método	45
3.3. Estudios <u>in vivo</u> : Biodisponibilidad de ampicilina th en humanos	46
3.3.1. Determinación de ampicilina th. en plasma	46
3.3.1.1. Instrumentos	46
3.3.1.2. Material	47
3.3.1.3. Reactivos	47
3.3.1.4. Microorganismo utilizado	48
3.3.1.5. Preparación de la suspensión de esporas	48

	Página
3.3.1.6. Preparación de las cajas petri con el medio inoculado	49
3.3.1.7. Método	50
3.3.1.8. Linealidad	54
3.3.1.9. Reproducibilidad y repetibilidad	
3.3.1.10. Estabilidad de ampicilina th en plasma	55
3.3.1.11. Actividad de los metabolitos (Especificidad)	56
3.3.2. Determinación de ampicilina en orina	56
3.3.2.1. Instrumentos	56
3.3.2.2. Material	58
3.3.2.3. Reactivos	58
3.3.2.4. Microorganismo utilizado	58
3.3.2.5. Preparación de la suspensión de esporas	58
3.3.2.6. Preparación de las cajas petri con el medio inoculado	58
3.3.2.7. Método	58
3.3.2.8. Linealidad	59
3.3.2.9. Repetibilidad y reproducibilidad	59
3.3.2.10. Estabilidad de ampicilina th. en orina	59
3.3.2.11. Actividad de los metabolitos (Especificidad)	60

	Página
3.3.3. Estudios preliminares de Biodisponibilidad	60
3.3.3.1. Estudio preliminar I; administración oral del producto innovador	61
3.3.3.2. Estudio preliminar II: Estudio de Bioequivalencia; producto innovador, solución oral y producto del mercado nacional	63
Capítulo IV	68
4. Resultados	69
4.1. Control Farmacéutico	69
4.2. Estudios <u>in vitro</u>	69
4.2.1. Determinación cuantitativa de ampicilina th. en HCl 0.1N y agua destilada	69
4.2.1.1. Linealidad y repetibilidad	69
4.2.1.2. Reproducibilidad	74
4.2.2. Perfil de disolución de catorce productos de ampicilina th. cápsulas de 250 mg	76
4.3. Estudios in vivo: Biodisponibilidad de ampicilina th. en humanos	76
4.3.1. Determinación de ampicilina th. en plasma	76
4.3.1.1. Linealidad	80

	Página
4.3.1.2. Reproducibilidad y repetibilidad	80
4.3.1.3. Estabilidad de ampicilina th. en plasma	83
4.3.1.4. Actividad de los metabolitos (Especificidad)	88
4.3.2. Determinación de ampicilina th en orina	88
4.3.2.1. Linealidad	89
4.3.2.2. Repetibilidad y reproducibilidad	89
4.3.2.3. Estabilidad de ampicilina th. en orina	92
4.3.2.4. Actividad de los metabolitos (Especificidad)	97
4.3.3. Estudios preliminares de Biodisponi- bilidad	98
4.3.3.1. Estudio preliminar I; Administra- ción oral de ampicilina th.	98
4.3.3.2. Estudio preliminar II. Estudio de Bioequivalencia; producto innovador, solución oral y producto del mer- cado nacional.	105
Capítulo V	129
5. Discusión	130
5.1. Pruebas de Control Farmacéutico	130

	Página
5.2. Estudios in vitro	131
5.2.1. Determinación cuantitativa de ampicilina th. en HCl 0.1N y agua destilada	131
5.2.2. Perfil de disolución de catorce productos de ampicilina th. cápsulas de 250 mg	132
5.3. Estudios in vivo; Biodisponibilidad de ampicilina th. en humanos	137
5.3.1. Determinación de ampicilina th. en plasma y orina	137
5.3.2. Estudios preliminares de Biodisponibilidad	139
5.3.2.1. Estudio preliminar I: Administración oral de ampicilina th.	139
5.3.2.2. Estudio preliminar II: Estudio de Bioequivalencia; producto innovador solución oral y producto del mercado nacional.	141
Capítulo VI	
6. Conclusiones	158
Capítulo VII	162
7. Apéndices	163

Página

Capítulo VIII

178

8. Bibliografía

179

TABLAS

	Página
I. Solubilidad de ampicilina en diferentes disolventes.	9
II. Espectro de infrarrojo de ampicilina trihidratada (Bandas de absorción e interpretación).	11
III. Señales características de los protones de ampicilina trihidratada en RMN-H'	15
IV. Absorción ultravioleta de ampicilina trihidratada	19
V. Estabilidad de ampicilina en función de pH.	23
VI. Estabilidad de ampicilina en soluciones diluidas en fosfatos.	23
VII. Estabilidad de ampicilina en función del pH. y temperatura.	25
VIII. Estabilidad de ampicilina trihidratada en soluciones de acetato de sodio y solución reguladora tris en función del pH.	26
IX. Productos farmacéuticos de ampicilina trihidratada (cápsulas de 250 mg).	40

TABLAS
(Continuación)

	Página
X. Diluciones de la curva patrón de ampicilina th. en plasma, expresadas como ampicilina base.	51
XI. Diluciones de la curva patrón de ampicilina th. en orina, expresadas como ampicilina base.	58
XII. Diseño cruzado para el estudio de bioequivalencia de ampicilina th.	64
XIII. Horario para la toma de muestras biológicas del estudio de bioequivalencia de 3 vías.	66
XIV. Resultados del análisis de control de calidad de catorce productos comerciales de ampicilina th. cápsulas de 250 mg.	70
XV. Repetibilidad del método de valoración de ampicilina th. en HCl 0.1N y agua destilada por el método espectrofotométrico de la B.P.	73
XVI. Reproducibilidad del método de valoración espectrofotométrico para ampicilina th. en HCl 0.1N y agua destilada en diferentes días.	75
XVII. Resultados promedio del estudio de perfil de disolución de catorce productos comerciales de ampicilina	

TABLAS
(continuación)

	Página
th. cápsulas de 250 mg., en dos medios de disolución, HCl 0.1N y agua destilada.	77
XVIII. Repetibilidad del método microbiológico de sensidisco-placa en plasma.	82
XIX. Reproducibilidad del método microbiológico de sensidisco-placa en plasma en diferentes días.	84
XX. Datos de estabilidad de ampicilina th. en plasma a temperatura ambiente.	86
XXI. Datos de estabilidad de ampicilina th. en plasma a temperatura de -10°C .	87
XXII. Repetibilidad del método microbiológico de sensidisco-placa en orina.	91
XXIII. Reproducibilidad del método microbiológico de sensidisco-placa en orina en diferentes días.	93
XXIV. Datos de estabilidad de ampicilina th. en orina a temperatura ambiente.	94
XXV. Datos de estabilidad de ampicilina th. en orina a -10°C .	95
XXVI. Cantidad de ampicilina excretada en orina después de la administración oral de 250 mg del producto	

TABLAS
(continuación)

	Página
innovador a dos voluntarios sanos.	99
XXVII. Parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de datos urinarios, después de la administración oral de 250 mg de ampicilina th. (producto innovador).	104
XXVIII. Datos de concentración plasmática (mcg/ml) obtenidos después de la administración oral de una solución de ampicilina th. (250 mg) a 5 voluntarios sanos.	108
XXIX. Datos de concentración plasmática obtenidos después de la administración oral de 250 mg del producto innovador de ampicilina th. a 6 voluntarios sanos.	110
XXX. Datos de concentración plasmática obtenidos después de la administración oral de 250 mg del producto innovador de ampicilina th. a 5 voluntarios sanos.	112
XXXI. Parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de datos plasmáticos, asumiendo MAUC administración de primer orden después de la administración	

TABLAS
(continuación)

	página
de los productos A, B y C de ampicilina th.	115
XXXII. Cantidad acumulativa excretada en orina después de la administración oral de una solución de ampicilina th. (250 mg) a 5 voluntarios sanos.	117
XXXIII. Cantidad acumulativa excretada en orina después de la administración oral de 250 mg. del producto innovador de ampicilina th. a 4 voluntarios sanos.	117
XXXIV. Cantidad acumulativa excretada en orina después de la administración oral de 250 mg de un producto mexicano de ampicilina th. a 5 voluntarios sanos.	121
XXXV. Parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de datos urinarios promedio, después de la administración de los productos A, B y C de ampicilina th.	127
XXXVI. Parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de datos urinarios individuales, después de la administración de los productos A, B y C de ampicilina th.	128
XXXVII. Análisis estadístico de varianza de la cantidad	

TABLAS
(Continuación)

Página

	de ampicilina th. (cápsulas de 250 mg) disueltas a diferentes intervalos de tiempo en dos medios de disolución.	134
XXXVIII	Constantes de velocidad de disolución de los 14 productos de ampicilina th. de agua destilada.	136
XXXIX	Análisis estadístico de varianza para datos plasmáticos obtenidos a diferentes intervalos de tiempo después de la administración oral de los productos A, B y C de ampicilina th.	145
XL.	Análisis estadístico de varianza para datos plasmáticos obtenidos a diferentes intervalos de tiempo después de la administración oral de los productos B y C de ampicilina th.	146
XLI.	Análisis estadístico de varianza de la cantidad acumulada excretada inalterada de ampicilina en orina a diferentes intervalos de tiempo después de la administración oral de los productos A, B y C.	147
XLII.	Análisis estadístico de varianza de la cantidad acumulativa excretada inalterada de ampicilina en orina a diferentes intervalos de tiempo después	

TABLAS
(Continuación)

	Página
de la administración oral de los productos B y C.	148
XLIII. Análisis estadístico de varianza para datos urinarios obtenidos por el método de velocidad de excreción, después de la administración oral de los productos A, B y C de ampicilina th.	149
XLIV. Análisis estadístico de varianza para datos urinarios obtenidos por el método de velocidad de excreción, después de la administración oral de los productos B y C de ampicilina th.	
XLV. Análisis de Kwan-Till para calcular la biodisponibilidad relativa de los productos A, B y C de ampicilina th.	152
XLVI. Biodisponibilidad obtenida por diferentes métodos para los productos A, B y C de ampicilina th.	154

FIGURAS

	Página
1. Espectro de infrarrojo de ampicilina anhidra.	10
2. Espectro de infrarrojo de ampicilina trihidratada.	11
3. Espectro de R.M.N. de ampicilina th. en D_2O - DCl .	13
4. Espectro de R.M.N. de ampicilina th. en $DMSO-d_6$.	14
5. Espectro de masas de baja resolución de ampicilina th.	17
6. Fragmentación de ampicilina (derivado sililado).	18
7. Degradación de penicilina.	20
8. Curva patrón de ampicilina th. en HCl 0. 1N, método espectrofotométrico.	71
9. Curva patrón de ampicilina th. en agua destilada, método espectrofotométrico.	72
10. Perfil de disolución de catorce productos comerciales de ampicilina th. en HCl 0.1N	78
11. Perfil de disolución de catorce productos comerciales de ampicilina th. en agua destilada.	79
12. Curva patrón de ampicilina en plasma (método	

FIGURAS
(continuación)

	Página
microbiológico).	81
13. Estabilidad de ampicilina th. en plasma a temperatura ambiente y a una temperatura de -10°C .	85
14. Curva patrón de ampicilina th. en orina (método microbiológico).	90
15. Estabilidad de ampicilina th. en orina a temperatura ambiente y a una temperatura de -10°C .	96
16. Gráfica de cantidad acumulativa excretada de ampicilina, después de la administración oral del producto innovador a 2 voluntarios sanos.	100
17. Gráfica de velocidad de excreción contra el tiempo después de la administración oral de 250 mg de ampicilina (producto innovador) a dos voluntarios sanos.	102
18. Gráfica de cantidad remanente por ser excretada contra el tiempo, después de la administración de 250 mg de ampicilina (producto innovador) a dos voluntarios sanos.	103

FIGURAS
(Continuación)

	Página
19. Representación Esquemática del Modelo Abierto de un compartimiento administración oral.	107
20. Gráfica de concentración plasmática promedio vs tiempo, después de la administración oral de una solución de ampicilina th. (250 mg) a 4 voluntarios sanos.	109
21. Gráfica de concentración plasmática promedio vs tiempo, después de la administración oral de 250 mg del producto innovador de ampicilina th. a 6 voluntarios sanos.	111
22. Gráfica de concentración plasmática promedio \pm ES contra el tiempo, después de la administración oral de 250 mg de un producto mexicano de ampicilina th. a 5 voluntarios sanos.	113
23. Gráfica de concentración plasmática promedio contra tiempo, después de la administración oral de los productos A, B y C de ampicilina th.	114
24. Gráfica de velocidad de excreción promedio contra el tiempo después de la administración oral de una	

FIGURAS
(Continuación)

	Página
solución de ampicilina th. (250 mg) a 5 voluntarios sanos.	118
25. Gráfica de velocidad de excreción promedio contra el tiempo, después de la administración oral de 250 mg del producto innovador de ampicilina th. a 4 voluntarios sanos.	120
26. Gráfica de velocidad de excreción promedio contra el tiempo, después de la administración oral de 250 mg de un producto mexicano de ampicilina th. a 4 voluntarios sanos.	122
27. Gráfica de velocidad de excreción promedio contra tiempo obtenida después de la administración oral de los productos A, B y C de ampicilina th.	123
28. Gráfica de la cantidad acumulada excretada promedio (\pm E.S.) en orina después de la administración oral de los productos A, B y C de ampicilina th.	124
29. Gráfica de la cantidad remanente para ser excretada promedio contra tiempo después de la administración oral de los productos A, B y C de ampicilina th.	126

FIGURAS
(Continuación)

	Página
30. Cantidad remanente para disolverse de los catorce productos de ampicilina th. en agua destilada.	135
31. Potencia del contraste del análisis de varianza.	157

APENDICES

	Página
I. Reacciones secundarias y tóxicas a las penicilinas.	163
II. Carta de consentimiento para participar como voluntario en el estudio de biodisponibilidad de ampicilina th.	173
III. Características de los voluntarios para el estudio de la administración oral de 250 mg del producto innovador de ampicilina th.	174
IV. Características de los voluntarios del estudio cruzado de 3 vías; producto innovador solución oral y producto mexicano.	175
V. Datos individuales obtenidos por el método de velocidad de excreción, después de la administración oral de 250 mg de los productos A, B y C de ampicilina.	176
VI. Datos urinarios obtenidos por el método de sigma menos, después de la administración oral de 250 mg de los productos A, B y C de ampicilina th.	177

" CAPITULO I "

CAPITULO I

1. Introducción.

1.1. Presentación y objetivo.

Actualmente, en México la Industria Farmacéutica cuenta con aproximadamente 300 laboratorios farmacéuticos registrados en la Secretaría de Salubridad y Asistencia, de los cuales un 25% de ellos utiliza ampicilina como principio activo para la fabricación de medicamentos. El uso terapéutico de la ampicilina en humanos es tan amplio, que este fármaco está catalogado como el antibiótico de mayor venta en México.

En las farmacias se pueden encontrar al menos 93 marcas comerciales de productos que contienen ampicilina, de los cuales 67 contienen ampicilina como único principio activo en cualquiera de sus formas (anhidra, trihidratada, sódica o potásica). (1)

A pesar del gran uso e importancia socioeconómica que representa hoy en día la ampicilina para México, oficialmente no existen normas suficientes de calidad que garanticen su eficacia terapéutica, únicamente se consideran pruebas físicas, químicas y/o microbiológicas para controlar su "calidad final", y se ha demostrado en diversos países que estas pruebas de control por si solas, no bastan para garantizar la eficacia terapéutica y establecer bioequivalencia entre productos semejantes.

Dependiendo del tipo de pruebas de control de calidad que los medicamentos (conteniendo un sólo principio activo) cumplen se pueden clasificar en:

- 1) Medicamentos Químicamente Equivalentes.
- 2) Medicamentos Farmacéuticamente Equivalentes.
- 3) Medicamentos Bioequivalentes.

Los medicamentos químicamente equivalentes son aquellos que contienen exactamente las mismas cantidades de los mismos principios activos, los cuales no necesariamente se presentan en la misma forma farmacéutica⁽²⁾.

Los medicamentos farmacéuticamente equivalentes son aquellos que además de contener la misma cantidad de principio(s) activo(s) se presentan en la misma forma farmacéutica, aunque no necesariamente su composición de excipientes sea idéntica. Al presentarse en la misma forma farmacéutica deberán cumplir con pruebas de desintegración y/o disolución, cuando sea aplicable.⁽²⁾

Los medicamentos bioequivalentes son aquellos productos farmacéuticamente equivalentes cuya velocidad y cantidad absorbida (Biodisponibilidad) no muestra diferencias entre sí, bajo condiciones experimentales similares.

El "Federal Register" de 1977⁽³⁾ publicado por la F.D.A. (Food and Drug Administration) reglamentó que son necesarias las pruebas de biodisponibilidad (pruebas in vivo) para 110 medicamentos entre los cuales se encuentran incluidos produc

4.

tos de ampicilina. Sin embargo en otros productos farmacéuticos la biodisponibilidad puede ser demostrada en forma satisfactoria con pruebas in vitro, que hayan sido correlacionadas previamente con estudios in vivo. Estas pruebas in vitro incluyen tiempo de desintegración y/o velocidad de disolución. En México es factible la existencia de problemas de bioequivalencia, debido: primero, al gran número de marcas comerciales farmacéuticamente equivalentes que contienen ampicilina como principio activo. Segundo, a que existen un gran número de reportes en la literatura en los que se ha encontrado bioinequivalencia entre diferentes marcas comerciales de ampicilina^(4,5,6), y tercero, debido a que, por sus propiedades biofarmacéuticas la ampicilina está catalogada como un fármaco con alto potencial para presentar problemas de bioequivalencia⁽⁷⁾.

Por lo expuesto anteriormente el objetivo de este trabajo es determinar: primero la equivalencia farmacéutica de la ampicilina th. en cápsulas de 250 mg obtenidas de trece fabricantes nacionales con respecto al producto innovador U.S.A. Pollicylin de Bristol, segundo estudiar la disolución de estos productos y tercero efectuar un estudio de bioequivalencia de un producto nacional de baja disolución.

El logro de estos objetivos proporcionará información para evaluar la calidad de los productos estudiados y bases para proponer normas que ayuden a garantizar la eficacia terapéutica de la ampicilina.

" CAPITULO II "

CAPITULO II

II. GENERALIDADES.

(Monografía de Ampicilina).

2.1. Descripción.

2.1.1. Nombre químico: *Acido D-6(2-amino-2-fenil-acetamid -3,3-dimetil-7oxo-4 tia-1-azabicido [3,2,0] heptano-2-carboxílico⁽⁸⁾

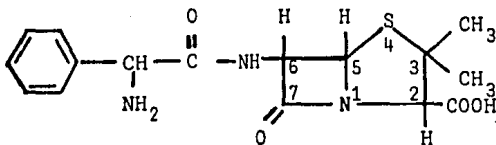
*Acido 6 [D (-)- α -aminofenil acetamido] penicilánico

*D (-)- α -aminobencilpenicilina⁽⁹⁾

* α -aminobencilpenicilina

2.1.2. Nombre común: Ampicilina^(10,11)

2.1.3. Fórmula desarrollada:



2.1.4. Fórmula condensada: $C_{16}H_{19}N_3O_4S$

2.1.5. Peso Molecular: 349.41

2.1.6. Isómeros: La presencia de un átomo de carbón asimétrico en la posición bencílica (carbono 8) produce un isómero óp-

tico. El isómero D, D (-)- α -aminobencilpenicilina, el cual es más activo que el isómero L (-)- α -aminobencilpenicilina.⁽¹²⁾

2.1.7. Hidratos: Se ha reportado que la ampicilina puede existir en las formas anhidra, monohidratada, sesquihidratada y trihidratada⁽¹³⁾.

2.1.8. Sales: Principalmente se usan las sales sódica y potásica de ampicilina.^(10,11)

2.1.9. Apariencia color y olor: La ampicilina se presenta en forma de polvo cristalino blanco, con olor característico a penicilinas^(10,11).

2.2. Propiedades físicas.

2.2.1. Punto de fusión: La ampicilina monohidratada funde con descomposición a 202°C, la ampicilina sódica a 205°C⁽¹²⁾.

La ampicilina sesquihidratada y anhidra descompone entre 199-202°C⁽¹⁴⁾.

La ampicilina trihidratada funde con descomposición a 214.5° - 215.5°C⁽¹⁵⁾.

2.2.2. Solubilidad: Las solubilidades de ampicilina anhidra, trihidratada y sódica de 2 fabricantes en diferentes disolventes fueron determinadas

por Marsh y Weiss⁽¹⁶⁾.

Ellos observaron una variación en las solubilidades de ampicilina sódica entre los 2 fabricantes e indican que esto puede deberse a la estructura cristalina. Los resultados se reportan en la Tabla I.

2.2.3. Constante de ionización, pK: Rapson y Bird⁽¹⁷⁾ reportan constantes de ionización para la ampicilina de: $pK_1 = 2.53 \pm 0.004$ y $pK_2 = 7.24 \pm 0.02$. Han y Poale⁽¹⁸⁾ reportan valores de $pK_1 = 2.66 \pm 0.03$ y $pK_2 = 7.24 \pm 0.03$.

2.2.4. Rotación óptica:

	Referencia
Ampicilina monohidratada $[\alpha]_D^{21} + 281^\circ$ (C = 1 en H ₂ O)	(13)
Ampicilina sesquihidratada $[\alpha]_D^{21} + 283.1^\circ$ (C = 1 en H ₂ O)	(14)
Ampicilina sódica $[\alpha]_D^{20} + 209^\circ$ (C = 0.2 en H ₂ O)	(13)
Ampicilina anhidra $[\alpha]_D^{20} + 287.9^\circ$ (C = 1 en H ₂ O)	(14)

Tabla I. Solubilidad de ampicilina en diferentes disolventes (mg/ml).⁽¹⁶⁾

Disolvente	Ampicilina			
	Anhidra	Sal sódica I*	Sal sódica II*	Trihidratada
Agua	10.098	20	20	7.558
Metanol	2.968	20	20	6.649
Etanol	0.390	20	19.780	2.538
Isopropanol	0.055	1.13	6.405	-
Alcohol isoamílico	0.125	1.902	19.300	-
Ciclohexano	0.048	0.075	0.0	0.068
Benceno	0.002	0.022	0.0	0.032
Eter de Petróleo	0.010	0.025	0.0	0.038
Iso-octano	0.0	0.022	0.0	0.022
Tetracloruro de carbono	0.008	0.032	0.0	0.025
Acetato de etilo	0.025	0.025	0.058	0.225
Acetato de isoamilo	0.030	0.105	0.048	0.078
Acetona	0.125	0.518	20	8.952
Metil etil cetona	0.052	0.178	20	2.790
Eter dietílico	0.022	0.022	0.0	0.03
Cloruro de etileno	0.032	0.060	0.032	0.068
1,4-Dioxano	0.595	1.375	1.845	2.772
Cloroformo	0.095	0.118	0.155	0.075
Disulfuro de carbono	0.015	0.010	0.0	0.022
Piridina	2.100	3.256	20	12.131
Formamida	20	20	20	20
Etilen Glicol	18.415	20	20	19.128
Propilen Glicol	2.230	20	20	19.128
Dimetilsulfóxido	20	20	20	20
NaOH 0.1N	20	20	20	20
NCl 0.1N	20	20	20	20

*Ampicilina sódica de 2 fabricantes diferentes.

Figura No. 1. Espectro de Infrarrojo de ampicilina anhidra. (19)

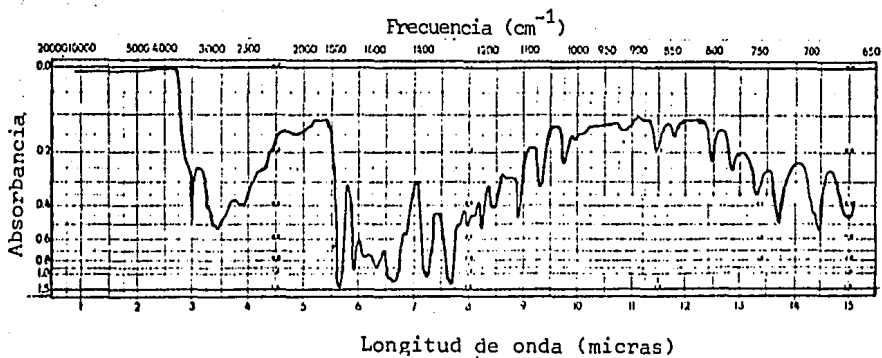


Figura 2. Espectro de infrarrojo de ampicilina trihidratada. (19)

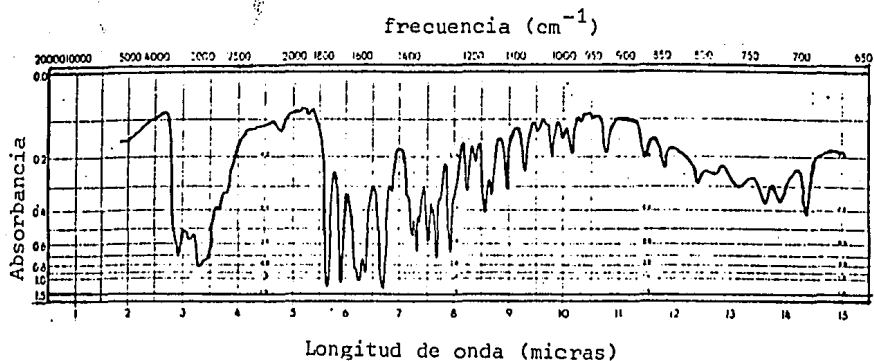


Tabla II. Espectro de Infrarrojo de ampicilina trihidratada (Bandas de absorción e interpretación).

<u>Bandas de absorcion de IR, cm⁻¹</u>	<u>Interpretación</u>
3420	H ₂ O
3230	N H
Bandas débiles 2860-2165	NH ₃ ⁺
1770	β-lactama C = O
1695	Amida C = O
1615 y 1575	COO ⁻ , NH ₃ ⁺
1492	Anillo aromático
690	Amida II, NH ₃ ⁺
	Anillo aromático mono sustituido

2.2.5. Espectros.

2.2.5.1. Espectro de Infrarrojo: En las Figuras 1 y 2 se presentan los espectros de I.R. para ampicilina th. y ampicilina anhidra⁽¹⁹⁾. Estas se corrieron en aceite mineral y pastillas de KBr, usando un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 21 de doble haz.

La interpretación del espectro de ampicilina trihidratada fué hecha por Toeplitz, B.⁽¹⁹⁾, y se encuentra en la Tabla II.

2.2.5.2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear: Cohen y Puar⁽²⁰⁾ han estudiado el espectro de R.M.N. de ampicilina trihidratada en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) y D₂O-DCl. Ellos usaron tetrametilsilano como estándar interno y un espectrofotómetro de R.M.N., Varian XL-100-15. En el caso de DMSO -d₆, los protones de β-lactama fácilmente se distinguen por su constante de acoplamiento.

En las figuras 3 y 4 se presentan los espectros de R.M.N. para ampicilina trihidratada en DMSO-d₆ y D₂O-DCl respectivamente. Las asignaciones se reportan en la Tabla III.

Figura 3. Espectro de R.M.N. de ampicilina trihidratada en D_2O-DCl_1 . (20)

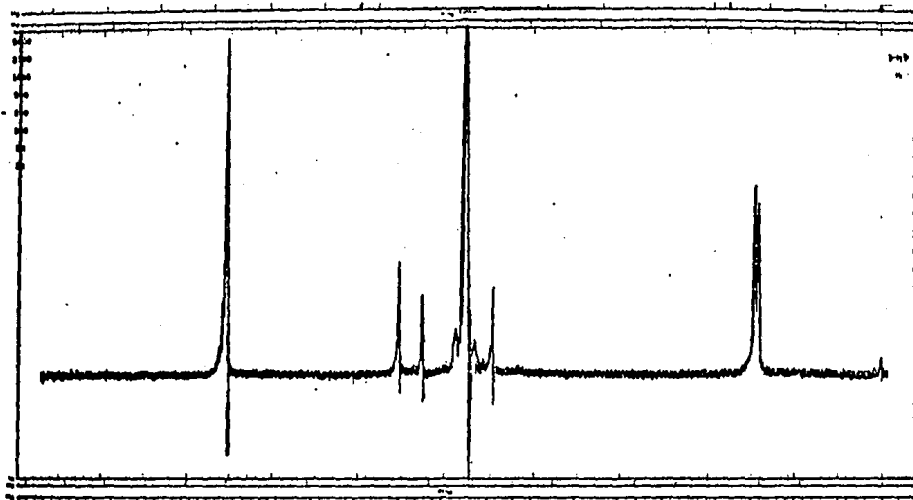


Figura 4. Espectro de R.M.N. de ampicilina tri-
hidratada en DMSO-d_6 . (20)

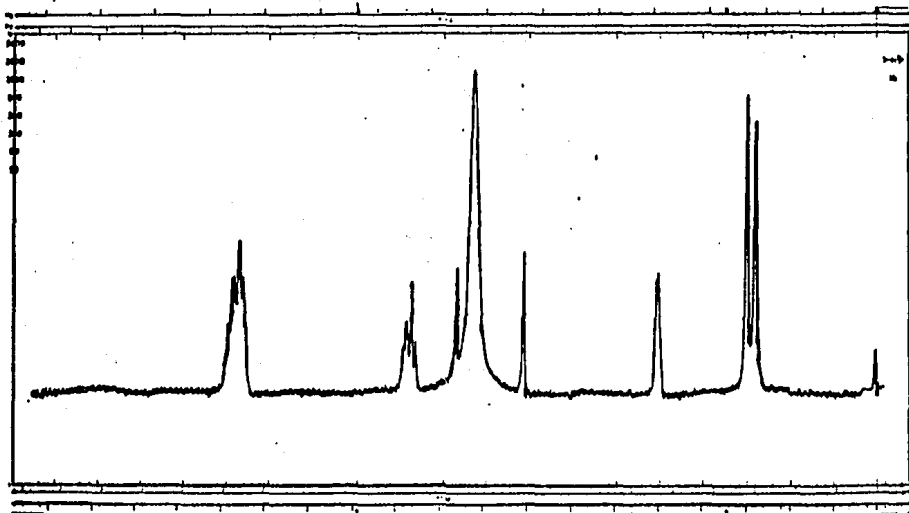


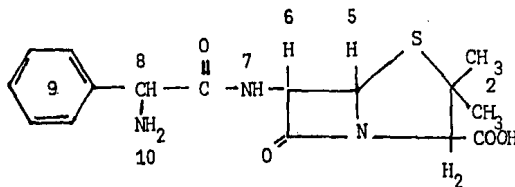
Tabla III. Señales características de los protones de ampicilina th. en RMN-H¹(20).

Desplazamientos químicos

Disolvente

	2H	3H	5H	6H	7H	8H	9	10
DMSO-d ₆	1.39	1.39	5.39q (9.0,4.0)		5.95b	4.84	7.36m	4.64b
	1.49		5.39d (4.0)					
D ₂ O-DCI	1.41	4.47	5.54			5.26	7.53	
	1.44							

b = ancho, m = multiplete, q = cuartete



2.2.5.3. Espectrometría de Masas: El espectro de masas de la ampicilina trihidratada fué determinado por Funke y Cohen⁽²¹⁾, este se presenta en la Figura 5. Ellos prepararon un derivado sililado usando la amida del ácido N,O-bis (trimetilsilil) disuelto en piridina. Las asignaciones del espectro de masas se encuentran resumidas en la Figura 6.

2.2.5.4. Absorción Ultravioleta: El espectro de U.V. para la ampicilina th. fué corrido en un espectrofotómetro Cary Modelo 15, calculándose los valores de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a diferentes valores de pH. Los resultados encontrados por Lerner⁽²²⁾ se reportan en la Tabla IV.

2.3. Estabilidad de la ampicilina.

2.3.1. Manera de degradación de penicilinas: La causa más importante de degradación de las penicilinas es la hidrólisis. En la Figura 7 se muestra el curso de dicha hidrólisis⁽²³⁾.

2.3.2. Estabilidad de ampicilina en soluciones: La degradación de la ampicilina en solución depende de la concentración de dicha solución y del tipo de vehículo usado. La dextrosa y el

Figura 5. Espectro de masas de baja resolución de ampicilina th. (21)

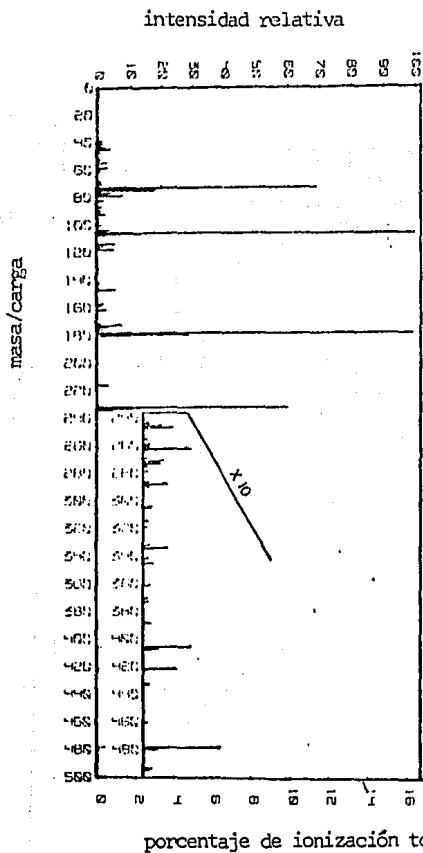


Figura 6. Fragmentación de ampicilina (derivado sililado).⁽²¹⁾

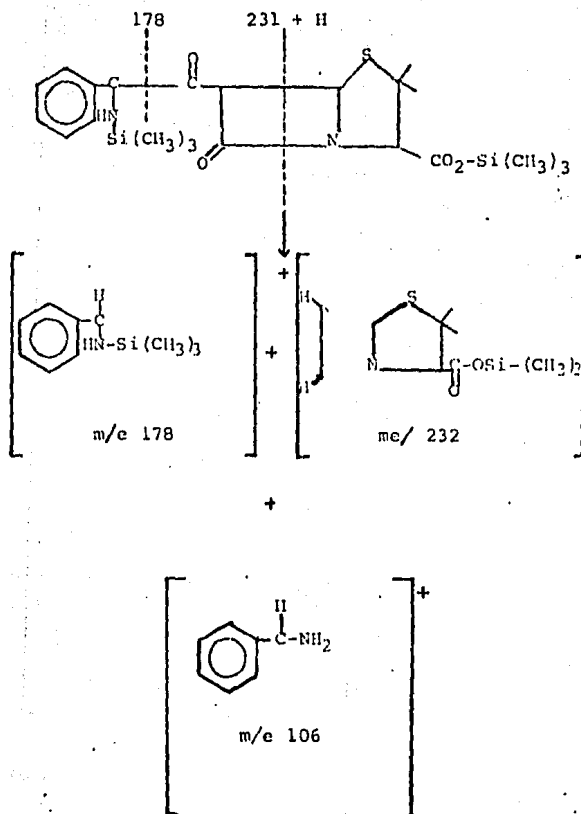
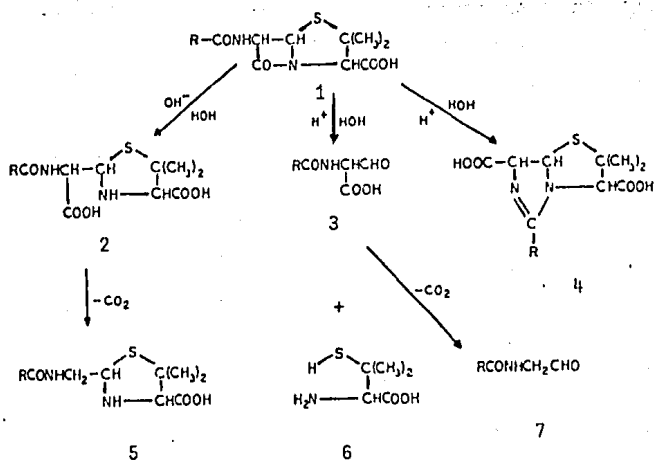


Tabla IV. Absorción ultravioleta de ampicilina trihidratada. (22)

	<u>Longitud de onda, nm</u>		
<u>Solución reguladora de fosfatos pH 5.3</u>	257	262	268
$E^{1\%}$ 1 cm	8.69	7.81	5.61
<u>Solución reguladora de fosfatos pH 7.0</u>	257	262	268
$E^{1\%}$ 1 cm	7.94	6.69	4.55
<u>Solución reguladora de fosfatos pH 9.5</u>	258	268	-
$E^{1\%}$ 1 cm	7.28	5.03	

Figura 7. Degradación de la penicilina. (23)



1. Penicilina
2. Acido penicilico
3. Acido penaldico
4. Acido penilico
5. Acido penilico
6. Penicilamina
7. Penilaldehido

manitol actúan como catalizadores en la hidrólisis de la ampicilina. La ampicilina en concentraciones del 1% es incompatible con dextrosa. Una solución salina isotónica es el vehículo más apropiado para la administración intravenosa de ampicilina.

Gallelli⁽²⁴⁾ establece que la ampicilina sódica es estable a 5°C y 25°C en soluciones de NaCl al 1% que también contengan 5% de dextrosa. Simberhoff⁽²⁵⁾ observó que la ampicilina era inactivada por soluciones de sacarosa, dextrosa y dextransa a valores de pH alcalino.

La velocidad de descomposición de la ampicilina fué estudiada por Sacconi⁽²⁶⁾. El observa, que soluciones al 1% siguen una cinética de primer orden en presencia de iones H^+ , y una cinética de segundo orden en presencia de iones OH^- .

La degradación de ampicilina trihidratada en solución está grandemente influenciada no solo por el pH, sino también por el tipo de regulador usado^(27,28). El regulador tris [2-amino-2(hidroximetil)-2,3-propanodiol] a pH 7 deteriora rápidamente la estabilidad de la ampicilina, pero esto no sucede a pH 5. En presencia de citratos la ampicilina es relativamente estable a pH 7, pero no a pH 5. Los fosfatos tienen una acción inmediata, pero tienden a seguir el patrón de regulador tris.

Jacobson y Russo-alesi⁽²⁹⁾ prepararon soluciones de ampicilina th. a una concentración de 5 mg/ml en solución reguladora de pH 5.0 y pH 7.0 (preparado con acetato de so-

dio 0.1N y ácido acético) y en soluciones reguladoras de pH 8.0 y pH 8.8 (preparado con tris y ácido acético). Las soluciones fueron dejadas a temperatura ambiente y analizadas por titulación iodométrica. Los datos de estabilidad a los diferentes valores de pH y reguladores se dan en la Tabla V.

George⁽³⁰⁾ estudió la estabilidad de soluciones diluídas de ampicilina a pH 5.8 - 6.0 y almacenadas a 5°C. Los resultados del análisis microbiológico se reportan en la Tabla VI.

La estabilidad de la ampicilina th. en soluciones reguladoras preparadas con tris 0.1N y ácido acético en función del pH y la temperatura fué estudiada por Sherman⁽³¹⁾ y col. Para esto se prepararon soluciones conteniendo 5 mg/ml de ampicilina th. guardándose a temperatura ambiente y a 5°C por 29 días. Las soluciones fueron analizadas por el método colorimétrico de hidroxilamina y los resultados encontrados se reportan en las Tablas VII y VIII.

2.3.3. Estabilidad de ampicilina en polvo: Weiss y Palmer⁽³²⁾

observan que los polvos de ampicilina trihidratada son estables cuando se guardan en un sistema cerrado a 43% y 81% de humedad relativa a temperatura ambiente por 6 semanas. La ampicilina es también estable a 35°C en el mismo sistema cerrado por 9 semanas. La ampicilina sólo muestra pequeños cambios en su contenido de humedad o

Tabla V. Estabilidad de ampicilina en función del pH. (29)

Tiempo, horas	Porcentaje de ampicilina remanente			
	pH 5	pH 7	pH 8	pH 8.8
0.5	-	-	96.0	81.9
1	-	-	87.3	65.8
2	99.4	100.6	73.3	43.6
3	-	-	62.0	28.9
4	100.6	100.0	54.0	17.4
5	-	-	44.0	11.4
24	92.0	100.3	-	-
27	-	-	0	0
48	92.0	96.5	-	-
96	83.0	91	-	-

Tabla VI. Estabilidad de ampicilina en soluciones diluídas de fosfatos a 5°C, pH 5.8-6.0. (30)

Ampicilina, mcg/ml	Porcentaje de Ampicilina residual, Días		
	6	8	14
3	102	-	80
6	97	102	88
10	98	99	91
15	99	99	92
25	102	-	-
40	100	-	-

potencia después de este tipo de pruebas, lo cual indica que es bastante estable en forma de polvo.

2.4. Métodos de fabricación.

2.4.1. Microbiológico: La ampicilina puede ser preparada microbiológicamente por incubación de microorganismos.

Por ejemplo, *Pseudomonas*, de las especies, *Kluyveracitrophila*, *Rhodopseudomonas spheroides*, o *Micrococcus ureae* con ácido 6-aminopenicilánico y α -fenilglicina⁽³³⁾, vía acilación enzimática del ácido 6-aminopenicilánico.

2.4.2. La ampicilina se puede sintetizar por condensación del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) con una α -fenilglicina protegida^(34,35)

Posteriormente la ampicilina se regenera al remover los grupos protectores.

La ampicilina también puede ser obtenida por tratamiento del 6-APA con bromuro de α -bromofenilacetilo⁽³⁶⁾, vía azida penicilina e hidrogenación catalítica⁽³⁷⁾.

En la literatura están reportados por diversos autores otros métodos para la síntesis química de ampicilina^(38,39).

2.5. Métodos de Análisis:

2.5.1. Pruebas de Identidad: La ampicilina se identifica por espectroscopía de I.R.⁽⁴⁰⁾. El ácido cromatotrópico, ác. sulfúrico, ninhidrina y tartrato cúprico potásico

Tabla VII. Estabilidad de ampicilina en función del pH y la temperatura. ⁽³¹⁾

<u>Porcentaje de ampicilina remanente a temperatura ambiente</u>								
<u>Tiempo en días</u>	<u>pH 8.4</u>	<u>7.5</u>	<u>6.4</u>	<u>4.9</u>	<u>3.8</u>	<u>2.9</u>	<u>2.3</u>	<u>1.7</u>
1	0	16.5	53.1	90.6	89.4	73.1	47.9	24.7
2	0	1.8	32.2	82.1	88.7	54.2	26.7	8.0
6	0	0	4.8	60.1	67.6	21.7	3.5	0
9	0	0	0	45.2	54.4	10.7	1.1	0
15	0	0	0	26.5	39.5	3.9	0	0
29	0	0	0	11.4	13.9	1	0	0

<u>Porcentaje de ampicilina remanente a 5°C</u>								
<u>Tiempo en días</u>	<u>pH 8.4</u>	<u>7.5</u>	<u>6.4</u>	<u>4.9</u>	<u>3.8</u>	<u>2.9</u>	<u>2.3</u>	<u>1.7</u>
1	43.9	81.4	92.7	100	95.2	94.2	85.3	83.0
2	23.1	71.2	87.6	97.6	93.4	95.5	81.6	67.7
6	1	42.5	78.9	94.6	86.3	82.4	64.7	39.8
9	0	27.7	73.6	93.4	91.9	71.5	51.2	23.7
15	0	11.9	63.5	85.1	89.9	58.6	33.2	9.9
29	0	0	48.6	69.9	86.3	39.8	13.6	1.5

Tabla VIII. Estabilidad de ampicilina th. en solución de acetato de sodio y solución reguladora tris en función de pH⁽³¹⁾.

Ampicilina (2 mg/ml) Método de Hidroxilamina								
		<u>Porcentaje de actividad remanente</u>						
		5	24	48	120	216	312	
	<u>pH inicial</u>	<u>horas</u>	<u>horas</u>	<u>horas</u>	<u>horas</u>	<u>horas</u>	<u>horas</u>	<u>pH final</u>
Tris 0.1M	4.9	98.1	93.9	92.4	73.4	57.4	40.8	4.8
NaOAc 0.1M	4.9	98.3	94.3	94.7	78.9	65.0	49.9	4.9
Tris 0.1M	5.9	98.8	90.1	91.5	66.9	45.6	30.5	5.6
NaOAc 0.1M	6.0	102.4	96.7	102.1	90.8	86.7	77.9	5.8
Tris 0.1M	6.7	91.3	65.6	48.1	14.3	3.3	0	6.4
NaOAc 0.1M	6.5	99.9	96.9	98.2	90.7	86.9	75.7	6.3

se usan como reactivos en diferentes pruebas para identificación de ampicilina⁽¹¹⁾.

Thomas y Broadbridge⁽⁴¹⁾ describen un método para la rápida separación y detección de mezclas de penicilinas por electrofóresis a bajo voltaje, las penicilinas se identifican posteriormente por métodos microbiológicos. Diferentes métodos que usan cromatografía en capa fina y papel para la identificación de ampicilina se encuentran reportados en la literatura^(42,43,44,45,46).

2.5.2. Métodos Cuantitativos: Existe una gran variedad de métodos para la determinación cuantitativa de ampicilina; entre estos se encuentran métodos espectrofotométricos de U.V. y visible^(47,48,49,50,51), fluorométricos^(52,53,54,55), Polarográficos, de cromatografía en capa fina^(53,57,58,59), cromatografía en papel^(60,61), cromatografía gas-líquido^(62,63,64), cromatografía de líquidos a alta presión^(65,66), titulaciones iodométricas^(67,10), métodos microbiológicos^(68,69,70,71,72), etc.

La selección del método más adecuado dependerá de la naturaleza de la muestra a analizar (ej. tabletas, cápsulas, soluciones, fluidos biológicos, etc.) de la sensibilidad y especificidad requeridas y de los medios con que se cuenta para trabajar (reactivos, aparatos, laboratorio, personal capacitado, recursos económicos, etc.).

2.6. Consideraciones de interés biofarmacéutico.

2.6.1. Absorción: La ampicilina en virtud de su grupo amino es una de las penicilinas más estables a la destrucción gástrica, se absorbe bien, pero no completamente en el tracto gastrointestinal después de una administración oral, 30% de una dosis oral es recobable en orina, y del 60 al 70% se recupera en orina después de una administración intramuscular⁽⁷³⁾. Por esta razón se prefiere la ruta parenteral para lograr efectos máximos.

La absorción de la ampicilina usualmente ocurre dentro de las primeras 2 horas después de la administración oral de cápsulas y suspensiones, pero existen grandes variaciones (del 20-70%) en la cantidad absorbida⁽⁷⁴⁾. Los alimentos interfieren con la absorción de ampicilina, produciéndose niveles plasmáticos más bajos, por lo que este antibiótico debe administrarse de 30 minutos a 1 hora antes de las comidas.

La administración oral de 500 mg de ampicilina th. produce niveles plasmáticos máximos a las 2 horas, en un intervalo de 3 a 6 $\mu\text{g/ml}$. La inyección intramuscular de 500 mg de ampicilina sódica produce en el plasma valores máximos de 7 a 14 $\mu\text{g/ml}$, al cabo de 1 hora, estos valores declinan exponencialmente con el tiempo, pero después de 6 horas aún queda ampicilina en la circulación. Los niveles sanguíneos del antibiótico son más altos y más sostenidos en los niños prematuros y en las primeras semanas de los nacidos a término debido a su

funcion renal inmadura⁽⁷⁵⁾.

Si se administra ampicilina a la mujer embarazada antes del parto, aparece en la sangre del feto en 30 minutos, y en una hora alcanza la misma concentración que tiene el plasma de la madre, el fármaco es detectable en el líquido amniótico pocos minutos después de inyectado a la madre⁽⁷⁶⁾.

No se encuentran diferencias en la biodisponibilidad de ampicilina entre individuos sanos del sexo masculino y sexo femenino⁽¹⁰¹⁾

2.6.2. Distribución.

La ampicilina penetra en la mayoría de las cavidades del cuerpo, tejidos y fluidos biológicos exceptuando el fluido cerebrospinal (meninges no inflamadas), en el caso de administrar ampicilina en grandes cantidades se puede detectar en este fluido. La ampicilina atraviesa la placenta y es secretada en la leche materna.

El volumen de distribución es aproximadamente de 20 litros, pero en sujetos con cirrosis puede ser hasta de 60 litros. La unión a proteínas plasmáticas es aproximadamente del 120%⁽⁷⁷⁾.

2.6.3. Unión a proteínas.

Kunin⁽⁷⁸⁾ reporta que únicamente el 23% de la ampicilina se une a proteínas séricas humanas. El grado de unión fué establecido utilizando ultrafiltración y diálisis.

2.6.4. Metabolismo.

La ampicilina aparece en la bilis en forma activa, sufre recirculación enterohepática y es excretada en forma apreciable en heces. La concentración en bilis depende de la integridad de la vesícula biliar y de los conductos biliares. La ampicilina por ser excretada en altas concentraciones en la bilis puede ser usada en el tratamiento de infecciones de los conductos biliares.

Los principales metabolitos de la ampicilina son el ácido penicilóico y el ácido 6-amino penicilánico, se ha encontrado que después de la administración oral de 250 mg de ampicilina, se excreta en la orina $6.7 \pm 5.9\%$ de ácido penicilóico y trazas del ácido 6-amino penicilánico⁽¹⁰⁾.

2.6.5. Excreción.

La ampicilina se excreta rápidamente sin cambio a través de los riñones. Aproximadamente el 30% de una dosis oral es eliminada por el riñón en 12 horas (casi toda la cantidad en las primeras 6 horas). Aproximadamente el 70% de una dosis intramuscular es eliminada en orina en las primeras 6 horas.

El daño renal grave prolonga notablemente la permanencia de la ampicilina en plasma. La diálisis peritoneal tiene poco efecto para eliminar el fármaco. La administración de Probenecid promueve la persistencia del antibiótico en plasma, debido a que la excreción urinaria disminuye⁽⁷⁷⁾.

La ampicilina es excretada en la bilis en una concentración media de 4 µg/ml después de una dosis oral de 250 mg, la excreción biliar aumenta en sujetos con cirrosis hepática⁽⁷⁵⁾.

La ampicilina es excretada en la leche de madres lactantes⁽⁷⁶⁾.

El antibiótico es secretado en los esputos de los pacientes con lesiones inflamatorias del árbol bronquial⁽⁷⁵⁾.

2.6.6. Tiempo de vida media (t_{1/2}).

La ampicilina es rápidamente eliminada del cuerpo con un tiempo de vida media de aproximadamente 1.1. a 1.3 hs. en pacientes adultos con función renal normal, este tiempo aumenta en sujetos con función renal impedida⁽⁷⁴⁾.

2.6.7. Acción y usos.

La ampicilina fué introducida en 1961 como uno de los primeros derivados semisintéticos de la penicilina. Es un antibiótico de amplio espectro, ácido resistente y puede por lo tanto administrarse oralmente. La sal sódica o potásica puede darse parenteralmente.

Este antibiótico es degradado por las penicilinas bacterianas, pero es efectivo contra organismos no productores de penicilinasas. La ampicilina es empleada en el tratamiento de infecciones del tracto urinario debido a que actúa contra organismos Gram negativos, especialmente Escherichia coli, Proteus mirabilis y enterococos resistentes a las bencilpenicilinas. Es usada en la profilaxis y tratamiento de infecciones del tracto respiratorio

como son bronquitis crónica, neumonía y bronquitis.
Es particularmente efectiva contra infecciones causadas por Hemofilus influenzae.

Debido a que es excretada en altas concentraciones en la bilis, también es usada en el tratamiento de infecciones de los conductos biliares y del tracto gastrointestinal, causadas por E. coli, Salmonella y Shigella.

Debido a su baja toxicidad y amplio espectro antimicrobiano se usa en diálisis intraperitoneal para prevenir el desarrollo de peritonitis bacteriana⁽⁷³⁾.

La ampicilina es inapropiada para el tratamiento de infecciones estafilococcicas debido a que es degradada por la penicilinasasa estafilococcica.

La dosis oral usual es de 1 a 6 gramos diarios, divididos en dosis cada 6 horas. La dosis para niños menores de 1 año es la cuarta parte de la dosis del adulto y de 1 a 10 años es la mitad de la dosis del adulto⁽⁷⁷⁾.

2.6.8. Reacciones secundarias y tóxicas de las penicilinas.

Las reacciones adversas de la penicilina y sus derivados entre ellos la ampicilina, se encuentran descritas en el Apéndice I.

2.6.9. Datos de bioequivalencia.

La determinación de la bioequivalencia entre productos que contienen el mismo ingrediente activo esta adquiriendo día a día mayor importancia, tanto para la industria

farmacéutica, como para la profesión médica y los consumidores.

Existen en la literatura médica y farmacéutica un gran número de reportes en los que se presenta inequivalencia para diferentes fármacos, entre estos, se encuentra la ampicilina^(4,79,5). Los reportes presentados por "the ad Hoc Committee on Drug Product Selection of the Academy of General Practice of Pharmacy" y por "The Academy of Pharmaceutical Science of the American Pharmaceutical Association"⁽⁷⁾, catalogan a la ampicilina como un fármaco con fallas potenciales de biodisponibilidad. En julio de 1974 "The Drug Bioequivalence Panel of the office of Technology Assessment"⁽⁶⁾ incluye a la ampicilina en la lista de 24 fármacos que exhiben diferencias de biodisponibilidad entre productos químicamente equivalentes. MacLeod y Rabin⁽⁸⁰⁾ demuestran diferencias estadísticamente significativas en la biodisponibilidad biológica de tres formulaciones canadienses de cápsulas de ampicilina th. de 250 mg, pero contrastando con lo anterior Mayersohn y Endrenyi⁽⁸¹⁾ al estudiar en Canadá 3 productos comerciales de cápsulas de ampicilina reportaron la falta de diferencias significativas en cuanto a la biodisponibilidad entre los productos estudiados.

Otro estudio de productos canadienses fué hecho por Dugal y Col⁽⁸²⁾, ellos estudiaron dos formulaciones experimentales (granulación seca y encapsulación directa), compa-

parandó los niveles plasmáticos obtenidos en estas formulaciones con respecto a un producto de referencia; encontrando que no había diferencias significativas entre los productos.

Poole y Colaboradores⁽⁸³⁾ estudiaron la biodisponibilidad relativa de dos formas farmacéuticas (suspensiones y cápsulas) de ampicilina de 250 mg preparadas por 2 laboratorios diferentes. Los resultados obtenidos demuestran que existen diferencias significativas entre las dos formas farmacéuticas estudiadas.

Silverio y Poole⁽⁸⁴⁾ examinan concentraciones séricas de ampicilina en infantes recién nacidos, después de la administración de ampicilina en gotas, fabricadas por 2 laboratorios, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Un estudio de biodisponibilidad más extenso fué hecho por Whyatt y colaboradores⁽⁸⁵⁾. Ellos evaluaron la biodisponibilidad de 17 productos de ampicilina de 250 mg, los productos fueron administrados en series de 3 estudios con 14 sujetos en muestras plasmáticas colectadas a diferentes tiempos.

Se analizaron datos de área bajo la curva para los diferentes productos y se concluyó que no había diferencias estadísticamente significativas entre cualquiera de los 17 productos de ampicilina estudiados.

Analizando los artículos publicados referentes a la biodisponibilidad de ampicilina en cápsulas, se observa que

la falta de equivalencia entre las diferentes marcas comerciales en Canadá y Estados Unidos es más frecuente antes de 1973 que en los años posteriores, tal observación podría explicarse en base a la reformulación de los productos como consecuencia de los resultados obtenidos en los estudios de biodisponibilidad iniciales.

Sin embargo, en México no ha sucedido lo mismo, diferentes estudios preliminares con respecto a pruebas de disolución y biodisponibilidad indican la falta de equivalencia entre las diferentes marcas comerciales, asimismo se han reportado fallas terapéuticas de la ampicilina en pacientes atendidos en diferentes centros hospitalarios, estas fallas podrían ser explicadas en base a los problemas de biodisponibilidad causados por formulaciones inadecuadas.

2.6.10. Importancia Socioeconómica.

Las estadísticas sobre el mercado de productos farmacéuticos en México, precisan que el primer lugar en ventas lo ocupa el grupo terapéutico de los antibióticos, concentrando alrededor del 20% del grupo de ventas del sector. Dentro del grupo terapéutico de los antibióticos del subgrupo "Ampicilina" ocupa el primer lugar de ventas en México (30% de la venta total de grupo terapéutico)⁽⁸⁶⁾.

El gran consumo de ampicilina a nivel nacional se debe a diversos factores como son: En primer lugar las enfermedades respiratorias y gastrointestinales que representan

los dos principales problemas de salud pública en México.

En segundo lugar, un gran número de estas enfermedades son producidas por bacterias susceptibles a la ampicilina y los efectos secundarios producidos por este antibiótico en general son muy leves. En tercer lugar, la carencia de conocimientos farmacológicos y de ética profesional dentro del sector médico, determina que se prescriba un antibiótico de un espectro tan amplio como es la ampicilina, cuando sería más recomendable tanto desde el punto de vista clínico como económico, usar otros antibióticos de espectro más reducido, pero más específicos⁽⁸⁶⁾.

" CAPITULO III "

CAPITULO III

III. PARTE EXPERIMENTAL.

3.1. Control Farmacéutico.

Los productos farmacéuticos estudiados de ampicilina th, fueron donados por los laboratorios farmacéuticos nacionales. Se solicitaron 100 cápsulas del mismo lote, y el producto innovador (Pollycillin, Bristol Laboratories E.U.A., Lote No. H6M17, 100 cápsulas de un mismo lote) fué comprado en la ciudad de Tijuana, Baja California Norte, todos los medicamentos estudiados estipulaban en el marbete 250 mg de ampicilina trihidratada, como único principio activo por cápsula.

Los medicamentos estudiados se presentan en la Tabla IX a estos productos se les efectuaron las siguientes pruebas de control físico-químico en el Laboratorio de control farmacéutico, de la Facultad de Química, U.N.A.M., con el objeto de conocer la equivalencia farmacéutica de los mismos antes de empezar cualquier estudio.

Identificación	B.P. (11)
pH	B.P. (11)
Desintegración	Aparato USP-XIX ⁽⁸⁷⁾ en agua destilada a 37°C sin disco
Variación de peso	U.S.P. XIX ⁽⁸⁷⁾
Húmedad	B.P. (11)
Variación de contenido	B.P. (11) (se analizaron 3 unidades de dosificación de cada producto.

Tabla IX. Productos Farmacéuticos de ampicilina
th. estudiados (cápsulas de 250 mg).

Nombre	No. de Lote	Laboratorio
Pollycillin	H6M17	Bristol Laboratories, EUA
Ampicilina AMSA	25257	Antibióticos de México, S.A.
Amplina	71110	Laboratorios Huba, S.A.
Ampicilin	30	Andre Bigaus
Binota 1	R2315	Bayer de México, S.A.
Ampicilina Diba	37	Farmacéuticos Diba, S.A.
Diaciclin	197	Pediatría, S.A.
Ampicilina Harbin	A00073	Harbin Labs. de México, S.A.
Euplin	3-77	Euromex, S.A.
Flamicina	6158	Laboratorios Fustery, S.A.
Oracilina	77G04	Laboratorios Senosiain, S.A.
Septacín	118	Chinoín Productos Farmaceut.
Pentrexyl	EB920	Bristol de México, S.A.
Vinipen	AMP313	Laboratorios Wiener, S.A.

Contenido químico

B.P.⁽¹¹⁾ (Método espectrofotométrico).

3.2. Estudios in vitro; disolución de productos de ampicilina del mercado nacional.

Se realizó el estudio de disolución de 14 productos farmacéuticos comerciales de ampicilina trihidratada (th), cápsulas de 250 mg, de los cuales 13 productos eran mexicanos y un producto americano (producto innovador). Con el objeto de caracterizar mejor el comportamiento de disolución, la prueba se realizó en dos medios; solución de ácido clorhídrico 0.1N, pH 1.2 y agua destilada libre de CO₂ a 37°C a 100 rpm utilizando el equipo oficial No. 1 de la USP-XX⁽⁸⁸⁾. A cada medicamento de la Tabla IX se le asignó una clave, al producto innovador la letra N y diferentes letras a los demás medicamentos comerciales mexicanos.

A partir de los perfiles de disolución de los diferentes medicamentos estudiados se seleccionó un producto con velocidad de disolución baja, para utilizarlo en el estudio de biodisponibilidad (estudio in vivo) y así, posteriormente tratar de establecer una relación que pudiera ser de utilidad en la predicción del comportamiento in vivo de los medicamentos de ampicilina con solo pruebas de disolución.

3.2.1. Determinación cuantitativa de ampicilina en HCl 0.1N y agua destilada.

El método utilizado para la cuantificación de ampicilina th. en los medios de disolución; HCl 0.1N de pH 1.2 y agua desti

lada libre de CO_2 fué el método espectrofotométrico de la British Pharmacopeia⁽¹¹⁾.

3.2.1.1. Instrumentos.

Espectrofotómetro Varian, modelo 634; Balanza analítica Mettler, modelo H54AR; Balanza granataria Ohaus, modelo Harvard trip; Potenciómetro Corning, modelo 19; Registrador Farrand, modelo 100; Baño de temperatura controlada; Precision Scientific, modelo GCA 186.

3.2.1.2. Reactivos.

1. Ampicilina th. donada por los laboratorios Fermic, S.A. (lote No. FYS 1061 AT), potencia microbiológica 847.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

2. Solución de referencia de ampicilina; pesar 100 mg activos de ampicilina th. y aforar a 250 ml con agua destilada o HCl 0.1N (según el caso), se obtiene una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, esta solución se utiliza para preparar la curva patrón.

3. Solución de ácido clorhídrico 0.1N de pH 1.2 (jugo gástrico simulado sin enzimas).

4. Solución reguladora de sulfato cúprico de pH 5.2.

Procedimiento para la preparación de la solución reguladora pH 5.2.

Solución A: Disolver 15.2 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, grado reactivo (J.T. Baker) en 536 ml de agua destilada.

Solución B: Disolver 10.5 g de ácido cítrico, grado reactivo (J.T. Baker) en 500 ml de agua destilada.

Solución C: Disolver 0.393 g de sulfato cúprico grado reactivo (J.T. Baker) en 100 ml de agua destilada.

Añadir la solución B lentamente a la solución A hasta tener un pH de 6.2, tomar 985 ml de esta solución y añadir 15 ml de la solución C, agitar hasta homogenizar la solución.

Nota: La solución reguladora de sulfato cúprico pH 5.2 debe prepararse cada día de trabajo antes de su uso.

3.2.1.3. Método.

Curva patrón de ampicilina: De la solución de referencia de ampicilina (400 $\mu\text{g/ml}$) se transfieren alícuotas de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 ml a matraces volumétricos de 100 ml, aforando con la solución reguladora de sulfato cúprico pH 5.2 para obtener concentraciones de 2, 4, 8, 12, 16 y 20 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Valoración: En tubos con tapón de rosca de 50 ml de capacidad, se depositan 25 ml de las soluciones de la curva patrón, los tubos se colocan en un baño de temperatura controlada a $75 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de calentamiento llevar los tubos a temperatura ambiente y leer en el espectrofotómetro a 320 m μ , utilizando como blanco solución reguladora de sulfato cúprico pH 5.2, tratado en las mismas condiciones que la curva patrón, pero libre de ampicilina.

3.2.1.4. Linealidad y repetibilidad.

Con el fin de determinar si la relación entre las concentraciones de ampicilina y la absorbancia correspondiente era

lineal, se efectuó un estudio determinando las absorbancias de concentraciones conocidas de ampicilina, tanto en agua destilada como en HCl 0.1N en un intervalo de concentración de 2 a 24 $\mu\text{g/ml}$. Se obtuvo el promedio de 5 curvas de referencia realizadas al mismo tiempo, utilizando las siguientes concentraciones: 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 $\mu\text{g/ml}$.

Con objeto de determinar la repetibilidad del método espectrofotométrico de la B.P.⁽¹¹⁾, para la determinación de ampicilina, tanto en agua destilada como en HCl 0.1N, se determinó el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones utilizadas en las 5 curvas patrón mencionadas.

3.2.1.5. Reproducibilidad.

Con el objeto de determinar la reproducibilidad del método en diferentes días, bajo condiciones idénticas de operador, aparato espectrofotométrico, laboratorio, etc., se hicieron determinaciones de ampicilina th. a concentraciones de 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 y 24 $\mu\text{g/ml}$ en 10 ocasiones diferentes, tanto en HCl 0.1N como en agua destilada mediante el método descrito en 3.2.1.3.

3.2.2. Perfil de disolución de catorce productos farmacéuticos de ampicilina.

Se realizaron estudios del perfil de disolución de los diferentes productos de ampicilina th. cápsulas de 250 mg, incluyendo el producto innovador.

El estudio de disolución se realizó con el objeto de caracte

terizar el perfil de disolución de los productos nacionales, comparar su comportamiento con el del producto innovador y seleccionar posteriormente el producto farmacéutico del mercado nacional a estudiar in vivo.

3.2.2.1. Instrumentos.

Aparato de disolución de canasta rotatoria de 6 vasos USP-NF, modelo 72 5L (Hanson Research Corporation), además los instrumentos mencionados en 3.2.1.1.

3.2.2.2. Reactivos.

Los mencionados en 3.2.1.2.

3.2.2.3. Método.

El estudio de disolución se realizó en 6 cápsulas por cada lote estudiado, para esto, en cada vaso del aparato de disolución, se depositaron 900 ml del medio de disolución (HCl 0.1N de pH 1.2 o agua destilada libre de CO₂), estabilizando la temperatura del baño a $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y calibrando el aparato a 100 rpm. Se colocó una cápsula en cada una de las canastillas, las cuales se introdujeron al seno del líquido de disolución, e inmediatamente se accionó el motor de agitación del aparato, anotando el tiempo de inicio del estudio (tiempo cero).

Se tomaron alícuotas filtradas de 2 ml del medio de disolución a los siguientes tiempos: 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos. (Reponiendo el volumen extraído en cada ocasión con el medio de disolución a 37°C). Las alícuotas se aforan a 25 ml con la solución reguladora pH 5.2 y se determina cuantitativamente la

ampicilina en las muestras, al mismo tiempo que una curva patrón utilizando el método espectrofotométrico de la B.P.⁽¹¹⁾, descrito en la sección 3.2.1.3.

3.3. Estudios in vivo:

Biodisponibilidad de ampicilina en humanos.

Se diseñó un estudio de biodisponibilidad utilizando dosis únicas del fármaco en sujetos sanos, en estado de ayuno. No se permitió la ingestión de otros fármacos una semana antes del estudio ni durante el mismo. Los estudios se condujeron en sujetos ambulantes sanos con una actividad física normal, además se controló la cantidad y tipo de alimentos, así como el tiempo antes de su ingestión.

3.3.1. Determinación de ampicilina en plasma.

Para la cuantificación de ampicilina en plasma se empleó un método microbiológico de sensidisco-placa, en el cual se usó Bacillus subtilis como microorganismo de prueba.

3.3.1.1. Instrumentos.

Balanza analítica Mettler, modelo H 54 AR; Balanza granataria Ohaus, modelo Harvard trip; Potenciómetro Corning, Modelo 19; Halómetro Fisher-Lilly, Fisher Scientific Company, Modelo 290, Made in USA; Estufa de cultivo, J.M. Ortiz, aparatos eléctricos para bacteriología y química, serie No. 10107SE1002 SIC-DGE 774; Estufa de secado Felisa, Modelo 291.A, Fabricantes de equipo para laboratorio e industrias, S.A.; Baño de temperatura con-

trolada, Thelco, GCA Precisión Scientific Modelo 83; centrífuga Dynac, Cat. No. 0065, Clay Adams; Campana de Flujo laminar, Vecco, Fabricante de equipos para zonas estériles y control de contaminación, Unidad MFL G-18, Serie FL 444; Autoclave, CINDEN, Serie 1952, 2 1/2, 523, Patterpdam, Holland; Colorímetro, Spectronic 20, Bausch & Lomb; Refrigerador, Mabe, modelo Space line; Congelador, IEM, Friem, S.A. de C.V.

3.3.1.2. Material.

Cajas Petri estériles desechables, P.Q. Proquide, S.A.; cajas petri de cristal de 15 X 100 mm de fondo perfectamente plano; jeringa automática recargable de 10 ml, Becton Dickinson; Microjeringa automática, SMI Macro/Pettor, cat. No. 1075-1 50, 60, 75, 80 y 100 μ l, Scientific Manufacturing Industries; capilares de vidrio SMI, Scientific Manufacturing Industries; Equipo para filtración, Millipore; membranas de celulosa de 50 mm de diámetro, Millipore; discos de papel absorbente para la determinación de penicilina y otras sustancias antibacterianas, diámetro 1/2 de pulgada, Schlicher & Schnell Inc. Keene, N.H.; mesa nivelada; nivelador de burbuja; y material común de laboratorio.

3.3.1.3. Reactivos.

Ampicilina trihidratada (α -aminobencilpenicilina), Laboratorios Fermic de México, S.A., potencia microbiológica 847.7 μ g/mg; medio para antibióticos No. 1, Difco; medio para antibióticos No. 2, Difco; agua recientemente destilada estéril; solución salina isotónica estéril, Laboratorios Abbot; solución

germicida; hidróxido de sodio 0.1N; Betalactamasa^h, plasma humano libre de medicamentos, esterilizado por medio de filtración Millipore y congelado a -5°C.

3.3.1.4. Microorganismo utilizado.

Esporas de Bacillus subtilis cepa ATCC 6633 conservadas en suspensión acuosa a -5°C.

3.3.1.5. Preparación de la suspensión de esporas.

- a) Diluir 1.0 ml de la suspensión de esporas de Bacillus subtilis a 10 ml de agua destilada estéril.
- b) Homogenizar y sembrar 5.0 ml de esta suspensión diluída sobre una caja con agar simple.
- c) Incubar a 37°C durante 24 horas; efectuar algunos frotis de las colonias obtenidas, teñirlas con Gram y observar al microscopio no deben existir mezclas de microorganismos extraños.
- d) Las colonias obtenidas se suspenden en 10 ml de solución salina estéril, y se siembran en frascos de Roux que contengan medio para antibióticos No. 1, procurando cubrir toda la superficie; retirando el exceso. Incubar a 37°C durante una semana para provocar la formación de esporas. Suspende la cosecha de esporas en agua destilada estéril y eliminar microorganismos viables calentando a 60°C en baño de agua por 30 minutos.
- e) Centrifugar a 3,500 rpm por 10 minutos, eliminar el sobrenadante y lavar las esporas con agua destilada de esta manera. Ajustar la concentración de la suspensión de esporas hasta obtener una transmitancia del 20% a 650 μm usando como blanco solución

* Tipo I de Bacillus cereus, 1000 unidades Sigma, Chemical Company, Manufactures of the Finest Biochemicals available.

salina isotónica.

3.3.1.6. Preparación de las cajas Petri con el medio inoculado.

- a) Preparar una suspensión del medio para antibióticos No. 2 en agua, pesando 30.5 g/L en un matraz Erlenmeyer del doble de capacidad de lo que se va a preparar, tapar en forma adecuada y esterilizar en la autoclave a 120°C y 20 libras de presión, durante 30 minutos.
- b) Las cajas Petri que se van a preparar se extienden sobre una mesa perfectamente nivelada (las mesas utilizadas se diseñaron especialmente para este propósito), dentro de una campana de flujo laminar, se destapan y se van llenando con una capa de 12.0 ml de medio sin inocular, utilizando una jeringa automática recargable.
- c) De la suspensión de esporas (previamente preparada), se hace una dilución 1:10 con agua destilada estéril, adicionando 1 ml de la nueva suspensión por cada litro del medio nutriente cuya temperatura no debe ser superior a 60°C.
- d) Por medio de la jeringa automática recargable, añadir 4 ml del medio inoculado sobre la capa de 12 ml ya solidificada, procurando que se extienda uniformemente, una vez que está frío y solidificado el medio, tapar las cajas Petri e invertirlas para evitar que se acumule agua de condensación sobre el medio. Guardarlas en refrigeración hasta su uso (un tiempo no mayor de 2 o 3 días).
- e) A las cajas preparadas se les efectúan las siguientes pruebas: a) Por lote de 300 cajas, se escogen 6 al azar procu-

rando que sean representativas del comienzo intermedio y final del llenado, se incuban a 37°C durante 18-23 hs.; el crecimiento del microorganismo debe formar un velo continuo (no debe haber separación entre las colonias). b) En otras 2 cajas colocar 4 discos de papel filtro y aplicar 0.02 ml de plasma humano sin ampicilina u otro fármaco, el cual se utilizará en las diluciones de la curva patrón de ampicilina th. Después de incubar a 37°C durante 18 horas no debe existir halo de inhibición, comprobándose así que el plasma no presenta actividad antimicrobiana.

3.3.1.7. Método.

La preparación de la curva patrón de ampicilina en plasma se hace de la siguiente manera: En un matraz volumétrico de 50 ml, pesar con exactitud 50 mg activos de ampicilina th., añadir agua destilada estéril y agitar hasta dilución total; dejar reposar el matraz unos minutos y aforar. A esta solución se le asigna la letra A y tiene una concentración igual a 1000 µg/ml. A partir de la solución A preparar las diferentes concentraciones de la curva patrón en plasma humano sin fármacos en un intervalo de 0.25-50 µg/ml. efectuando las diluciones indicadas en la Tabla X, este intervalo de concentraciones es el mismo que se espera tener en plasma humano después de una administración de 250 mg de ampicilina th. La curva patrón se prepara de esa manera, con el objeto de utilizar la mínima cantidad de plasma o cualquier otro fluido biológico, que en el caso de muestras bio-

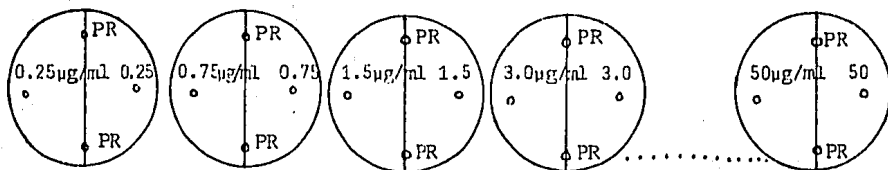
Tabla X . Diluciones de la curva patrón de ampicilina
th. en plasma manifestadas como ampicilina
base.

Dilución	Volumen diluciones conc.plasma + volumen plasma	Vol. inicial	Vol.Final	Conc. µg/ml
A	Solución Stock (1000 µg/ml)			
B	0.5 ml de la sol A + 9.5 ml de plasma	10 ml	5 ml	50
C	5.0 ml de la sol B + 5.0 ml de plasma	10 ml	4 ml	25
D	6 ml de la sol C + 4.0 ml de plasma	10 ml	5 ml	15
E	5.0 ml de la sol D + 5.0 ml de plasma	10 ml	2 ml	7.5
F	8.0 ml de la sol E + 12.0 ml de plasma	20 ml	2 ml	3.0
G	18 ml de la sol F + 18.0 ml de plasma	36 ml	35 ml	1.5 ^h PR
H	1 ml de la sol G + 1.0 ml de plasma	2 ml	1 ml	0.75
I	1 ml de la sol H + 2.0 ml de plasma	2 ml	2 ml	0.25

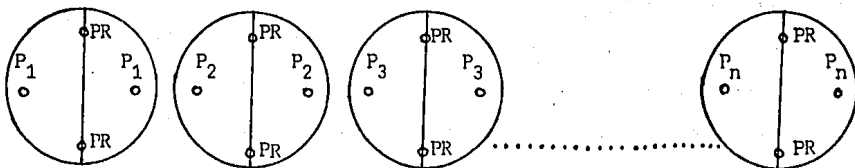
Nota: La dilución G con una concentración igual a 1.5 µg/ml se utiliza como punto de referencia (PR) tanto para la curva patrón como para las muestras problema.

lógicas es importante, debido a que son difíciles de conseguir. La curva patrón siempre debe prepararse justo antes de aplicarse, con el objeto de evitar degradación de la ampicilina.

Las cajas Petri que se van a utilizar (previamente preparadas) se identifican plenamente con un marbete de tela adhesiva. Se colocan en cada caja 4 sensidiscos de 1/2 de pulgada, en 2 de los sensidiscos de cada caja aplican con la microjeringa 80 μ l de la solución de referencia (1.5 μ g/ml) y en los otros 2 sensidiscos en forma cruzada 80 μ l de las diferentes diluciones de la curva patrón, tal como se indica en el esquema siguiente:



De cada dilución se siembran cuatro cajas o sea, que se obtienen 8 datos para cada concentración de la curva patrón. Los plasmas problemas se siembran de la misma forma, aplicando directamente junto con el punto de referencia (P R) utilizado en la curva patrón, esto se hace por duplicado, obteniéndose 4 datos para cada muestra problema.



Una vez que se han terminado de aplicar las diferentes muestras de la curva patrón y problemas, invertir las cajas Petri para evitar que se deposite agua de condensación sobre el medio de cultivo, refrigerar las cajas Petri por 30 minutos para que las muestras se difundan homogéneamente en el medio, y se introducen en la estufa de cultivo a 37°C durante 18 horas como mínimo y 24 horas como máximo; transcurrido ese tiempo se leen los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento del microorganismo de prueba por ampicilina, utilizando un halómetro. Es conveniente hacer notar que una misma persona debe leer tanto la curva patrón como los problemas para evitar errores en la apreciación de los diámetros de los halos de inhibición.

Al graficar el logaritmo natural de la concentración contra el halo de inhibición en mm, se obtiene una línea recta cuya ecuación general es:

$$C_p = A e^{md}$$

donde A es el intercepto a la ordenada, m la pendiente y d el diámetro del halo de inhibición; la cantidad de esporas puede variar de placa a placa, debido a una distribución heterogénea

de las esporas del microorganismo en el medio de cultivo o este crecimiento puede ser irregular debido a zonas frías en la temperatura de la estufa de incubación o bien pueden existir otro tipo de factores que hacen necesaria la aplicación del punto de referencia en todas las cajas como factor de corrección. Para esto, se determina el valor promedio de todas las lecturas de los halos de inhibición del punto de referencia, para cada placa en particular se tiene el promedio del patrón y la lectura promedio del problema en cuestión, el primero se resta al promedio total del punto de referencia. El resultado puede ser una cantidad positiva en el caso de que el punto de referencia en consideración sea menor que el promedio total o negativo cuando sea mayor, se suma esta cantidad a la lectura del problema y por medio de la ecuación, se determina el valor del plasma problema.

Otra forma de obtener la concentración, es graficar el logaritmo natural de la concentración del patrón, contra el diámetro en mm. del halo de inhibición e interpolar los halos de inhibición de los desconocidos en la gráfica.

3.3.1.8. Linealidad.

Con el fin de determinar si la relación existente entre el logaritmo natural de las concentraciones de ampicilina trihidratada y los halos de inhibición de crecimiento correspondientes era lineal, se efectuó el estudio de la linealidad del método, determinando cantidades conocidas de ampicilina en plasma. Se efectuaron determinaciones por octuplicado de cada concentra--

ción: (0.25, 0.75, 1.5, 3.0, 7.5, 15 y 25 $\mu\text{g/ml}$).

3.3.1.9. Reproducibilidad y repetibilidad.

Con el objeto de conocer la variación del método micro biológico de ampicilina en plasma, bajo las mismas condiciones de tiempo, reactivos, operador, instrumentos y laboratorio, se determinó el coeficiente de variación de la curva patrón utilizada en 3.3.1.8.

Para determinar la reproducibilidad del método en plasma, se analizaron 5 curvas en días diferentes por el método descrito en 3.3.1.7. Las diferentes concentraciones de estas curvas patrón se prepararon el mismo día de la determinación en condiciones idénticas de operador, instrumentos y laboratorio.

3.3.1.10. Estabilidad de ampicilina th. en plasma.

Con el objeto de observar la estabilidad de las muestras de ampicilina en plasma humano con respecto al tiempo, se prepararon 2 soluciones de ampicilina en plasma, cuyas concentraciones fueron 15 $\mu\text{g/ml}$ y 30 $\mu\text{g/ml}$. Estas soluciones se dividieron en 10 alícuotas de 1 ml y se colocaron en diferentes tubos, de los cuales una parte permaneció a temperatura ambiente y la otra en congelación a -10°C ; en el primer caso se muestrearon los tubos a los 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 horas, utilizando en todas las ocasiones la misma solución patrón de referencia guardada en refrigeración. En el segundo caso o sea las muestras guardadas a -10°C , se analizaron cada semana durante 21 días, comparándolos con una solución de referencia pre-

parada recientemente en cada ocasión.

3.3.1.11. Actividad de los metabolitos (especificidad).

Para determinar si los metabolitos eran biológicamente activos, o sea si interferían en la determinación cuantitativa de ampicilina, presentando actividad contra el microorganismo de prueba (B. subtilis), se efectuó el análisis microbiológico de los metabolitos; ácido penicilánico y ácido penicilóico. Para esto se preparó una solución de 50 µg/ml de ampicilina base en plasma, una parte de la misma se degradó con NaOH 0.1N para formar el ácido penicilánico y otra con β-lactamasa para obtener el ácido penicilóico; en el primer caso se neutralizó el exceso de NaOH con HCl 0.1N hasta obtener un pH neutro al papel; en el segundo caso se agregó la misma cantidad de enzima y se incubó a 37°C durante 30 minutos; posteriormente se sembraron estas preparaciones junto con la solución original de ampicilina en las mismas condiciones que describe la sección 3.3.1.7. y se observó si había o no inhibición de crecimiento del B. subtilis.

3.3.2. Determinación de ampicilina en orina.

Para la cuantificación de ampicilina en orina se empleó un método microbiológico de sensidisco-placa en el cual se usó Bacillus subtilis como microorganismo de prueba.

3.3.2.1. Instrumentos.

Los instrumentos utilizados para la determinación de ampicilina en orina, son los mismos que se mencionan para la determinación en plasma en la sección 3.3.1.1.

3.3.2.2. Material.

Además del descrito en la sección 3.3.2.1., se utilizó una microjeringa automática, SMI, micro/pettor 10, 15, 20, 25 y 30 μ l, Scientific Manufacturin Industries (en lugar de la SMI, micro/pettor 50, 60, 75, 80 y 100 μ l) y discos de papel absorbente para la determinación de penicilina de 1/4 de pulgada, Schlicher Schneel Inc. Keene, N.H. (en substitución a los discos de 1/2 de pulgada, utilizados en la determinación de ampicilina en plasma).

3.3.2.3. Reactivos.

Orina libre de fármacos, esterilizada por medio de filtración Millipore y congelada a -5°C y los reactivos descritos en la sección 3.3.1.3. exceptuando el plasma humano.

3.3.2.4. Microorganismo utilizado.

Esporas de Bacillus subtilis cepa ATCC 6633 conservadas en suspensión acuosa a -5°C .

3.3.2.5. Preparación de la suspensión de esporas.

Descrita en la sección 3.3.1.5.

3.3.2.6. Preparación de las cajas Petri con el medio inoculado.

La preparación de las cajas esta descrita en la sección 3.3.1.6.

3.3.2.7. Método.

La preparación de la curva patrón en orina se presenta en la tabla XI y se hace de manera similar a la descrita en la

Tabla XI . Diluciones de la curva patrón de ampicilina th. en orina expresadas como ampicilina base.

Dilución	Vol. de la dilución + Vol. orina	Vol.inicial	Vol.final	Conc. $\mu\text{g/ml}$
A	Solución Stock (1000 $\mu\text{g/ml}$)			
B	0.5 ml de la sol A + 9.5 ml de orina	10 ml	5 ml	50
C	5.0 ml de la sol B + 5.0 ml de orina	10 ml	4 ml	25
D	6 ml de la sol C + 4.0 ml de orina	10 ml	5 ml	15
E	5 ml de la sol D + 5.0 ml de orina	10 ml	2 ml	7.5
F	8 ml de la sol E + 12.0 ml de orina	20 ml	2 ml	3.0
G	18 ml de la sol. F + 18.0 ml de orina	26 ml	35 ml	1.5 PR*
H	1 ml de la sol G + 1.0 ml de orina	2 ml	1 ml	0.75
I	1 ml de la sol H + 2.0 ml de orina	2 ml	2 ml	0.25

*Nota: La dilución G con una concentración igual a 1.5 $\mu\text{g/ml}$ se utiliza como punto de referencia (PR) tanto para la curva patrón como para las muestras problema.

sección 3.3.17. pero sustituyendo el plasma por orina humana (esta orina no debe presentar actividad inhibitoria, lo cual se determina previamente), y los discos de 1/2 de pulgada por los discos de 1/4 pulgada, en los cuales se aplica sólo 20 μ l de las muestras patrones y problemas con ayuda de la microjeringa.

3.3.2.8. Linealidad.

Con el fin de determinar si la relación entre las concentraciones de ampicilina y los halos de inhibición resultantes era lineal, se efectuó el estudio de la linealidad del método, determinando cantidades conocidas adicionadas al plasma. Se efectuaron determinaciones por ocho veces de cada concentración (0.25, 0.75, 1.5, 3.0, 7.5, 15.0 y 25 μ g/ml.).

3.3.2.9. Repetibilidad y reproducibilidad.

Con el objeto de determinar la repetibilidad del método bajo las mismas condiciones de tiempo, reactivos, operador, instrumentos y laboratorio; se efectuó por ocho veces una curva patrón de ampicilina th. en orina humana y se determinó el coeficiente de variación para cada concentración.

Para determinar la reproducibilidad del método en orina en diferentes días, se analizaron los resultados obtenidos para las 5 curvas patrón preparadas en condiciones idénticas de operador, instrumentos y laboratorio.

3.3.2.10. Estabilidad de ampicilina th. en orina.

Se efectuó de manera similar a la descrita en la sección 3.3.1.10., pero utilizando orina en lugar de plasma.

3.3.2.11. Actividad de los metabolitos. (Especificidad).

Para determinar si los metabolitos interferían con la determinación de ampicilina th. se efectuó la valoración microbiológica del ácido penicilánico y penicilóico, de manera similar a la descrita en la sección 3.3.1.11., pero utilizando orina en vez de plasma. Se analizó la respuesta de los metabolitos con respecto a la ampicilina th.

3.3.3. Estudios preliminares de Biodisponibilidad.

Los estudios efectuados en el desarrollo de este trabajo tuvieron por objeto:

- a) Conocer los tiempos y concentraciones más adecuados para llevar a cabo un estudio de biodisponibilidad.
- b) Estudiar la bioequivalencia de un producto de baja disolución y calcular el número de voluntarios necesario para obtener una validez estadística, debido a la variación biológica.

Se seleccionaron voluntarios sanos, [sin manifestaciones clínicas de padecimientos renales o hepáticos y con pruebas de laboratorio de química sanguínea (glucosa, urea y creatinina), biometría hemática completa (leucocitos, linfocitos, hemoglobina y hematocrito) y análisis general de orina (densidad, pH, glucosa, albumina y leucocitos), dentro de parámetros normales.]

Después de informar a cada voluntario sobre las características de la ampicilina (Apéndice I) así como los objetivos del estudio, procedimientos y riesgos involucrados, se les pidió su consentimiento por escrito para participar en esta investigación (Apéndice II).

3.3.3.1. Estudio Preliminar I.

Administración oral del producto innovador.

Se administró por vía oral una dosis de 250 mg del producto innovador de ampicilina th. (Polycillin U.S.P., Lab. Bristol, Lote No. H6M17) a 2 voluntarios sanos, uno del sexo masculino y uno del sexo femenino seleccionados de acuerdo a la sección 3.3.3.

En el apéndice III se mencionan las características físicas y edad de los voluntarios.

El protocolo del experimento fué el siguiente:

1. Voluntarios sanos sin antecedentes de hipersensibilidad o idiosincracia a penicilinas y sus derivados.
2. Los sujetos no deberán tomar ningún medicamento o alcohol por lo menor una semana antes del estudio ni durante el mismo. No tificarán al responsable del estudio en caso contrario.
3. Permanecerán en ayunas desde las 23 horas del día anterior al estudio, hasta 4 horas después de la administración del medicamento. Tiempo en el cual el sujeto podrá tomar un desayuno ligero que consistirá en fruta, gelatina, emparedado y ensalada.

4. Deberán tomar 250 ml de agua a los tiempos siguientes: -2, -1, 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 hs., después la ingestión de agua será ad libitum.

La hora cero es el tiempo al cuál se ingiere el fármaco.

5. Se instruirá a los voluntarios sobre la importancia de vaciar completamente la vejiga antes de la administración del fármaco, así como en cada toma de muestra de orina en los diferentes intervalos de tiempo.
6. Se tomarán muestras de orina a los tiempos siguientes: blanco, 0.0-0.5, 0.5-1.0, 1.0-1.5, 1.5-2.0, 2.0-2.5, 2.5-3.0, 3.0-3.5, 3.5-4.0, 4.0-4.5, 4.5-5.0, 5.0-6.0, 6.0-8.0, 8.0-10.0, 10.0-12.0 y 12-24 horas.
7. Se medirá cuidadosamente el volumen de las muestras excretado en cada intervalo en una probeta. En caso de que la escala de la probeta no pueda medir el volumen de orina, se aforará hasta la medida inmediata superior con agua destilada (si el volumen excretado es menor de 100 ml., se aforará la muestra a ese volumen con agua destilada y se mezclará su contenido antes de tomar las alícuotas).
8. De cada período de colección se tomarán 2 alícuotas de aproximadamente 6 ml, estas muestras debidamente tapadas y etiquetadas (la etiqueta deberá tener número y nombre del voluntario, día de estudio, período de colección, número de muestra y volumen excretado) se colocarán en el congelador a -10 C hasta el momento de su análisis.(antes de 72 hs.).

El análisis cuantitativo de las muestras se hizo por cuadruplicado usando el método microbiológico de placa descrito en la sección 3.3.2.7., realizando al mismo tiempo una curva patrón de ampicilina th. en orina.

3.3.3.2. Estudio Preliminar II.

Estudio de Bioequivalencia; producto innovador, solución oral y producto del mercado nacional.

Se efectuó un diseño cruzado incompleto doble ciego controlado, en el que participaron 6 sujetos voluntarios, 3 del sexo masculino y 3 del sexo femenino, seleccionados en base a resultados normales de biometría hemática, química sanguínea, análisis general de orina y pruebas de funcionamiento renal y hepático. En el apéndice IV se indican las iniciales y características físicas de los voluntarios. A los voluntarios se les asignó un número secuencial del 1 al 6 y se distribuyeron de acuerdo a la Tabla XII.

El diseño fué de dosis únicas de ampicilina th. en sus tres presentaciones a las que se designó con las letras A, B y C (A= solución de 250 mg activos de ampicilina, B = producto innovador, Policyllin de Bristol de 250 mg, Lote No. H6M17 y C = producto mexicano) clave AM,

El producto mexicano fué seleccionado en base al perfil de disolución y los datos de control de calidad. Se seleccionó un producto farmacécticamente equivalente, pero con un comportamiento de disolución significativamente inferior al producto innovador.

Los productos fueron administrados en base al diseño presentado en la Tabla XII para muestras plasmáticas y urinarias.

Tabla XII . Diseño cruzado de 3 vías para el estudio de biodisponibilidad de ampicilina th.

Muestras Plasmáticas

Período de tiempo					
1a. Semana		2a. Semana		3a. Semana	
Sujeto	Producto	Sujeto	Producto	Sujeto	Producto
1,2	A	1,2	B	1,2	C
3,4	B	3,4	C	3,4	A
5	C	5	A	5,6	B

Muestras Urinarias

Período de tiempo					
1a. Semana		2a. Semana		3a. Semana	
Sujeto	Producto	Sujeto	Producto	Sujeto	Producto
1,2	A	1	B	1,2	C
4	B	3,4	C	3,4	A
5	C	5	A	5	B

El protocolo que se siguió en este estudio fué semejante al descrito en la sección 3.3.3.1., pero en esta ocasión se tomaron simultáneamente muestras de sangre ^{y de orina} ↓ de acuerdo al horario presentado en la Tabla XIII. Además se siguieron los puntos indicados a continuación:

1. Para la toma de muestras sanguíneas, se introducirá un catéter del No. 17 en la vena cefálica media, este catéter permanecerá en la vena durante las primeras 8 horas del estudio.
2. Se tomará un volumen de 5 ml de sangre en cada tiempo de muestreo. Para evitar que se coagule la sangre en el catéter se introducen inmediatamente después 0.05 ml de una solución estéril de 1000 unidades de heparina por mililitro con una jeringa de de 1 ml.
3. La sangre extraída se colocará en tubos previamente heparinizados estériles, después se procederá a separar el plasma por centrifugación dentro de los 30 minutos posteriores a la toma de muestras.
4. Una vez separado el plasma de las diferentes muestras sanguíneas, se colocará por partes iguales en dos tubos, los cuales se tapanán perfectamente con para-film con el objeto de evitar cualquier tipo de contaminación y se colocarán estas muestras en el congelador a -10°C hasta el momento de su valoración.
5. Se debe tener precaución que los tubos estén adecuadamente

Tabla XIII. Horario para la toma de muestras biológicas del estudio de biodisponibilidad de 3 vías.

Sangre		Orina	
Tiempo (min)	muestra	Intervalo (hs)	Muestra
0.0	0-P1	<0.0	0-Or
20.0	1-P1	0.0-0.5	1-Or
35.0	2-P1	0.5-1.0	2-Or
45.0	3-P1	1.0-1.5	3-Or
65.0	4-P1	1.5-2.0	4-Or
75.0	5-P1	2.0-2.5	5-Or
95.0	6-P1	2.5-3.0	6-Or
135.0	7-P1	3.0-3.5	7-Or
175.0	8-P1	3.5-4.0	8-Or
235.0	9-P1	4.0-4.5	9-Or
285.0	10-P1	4.5-5.0	10-Or
330.0	11-P1	5.0-6.0	11-Or
390.0	12-P1	6.0-8.0	12-Or
		8.0-10.0	13-Or
		10.0-12.0	14-Or
		12.0-24.0	15-Or

Nota: Las semanas 1, 2 y 3 de estudio se siguió el mismo horario.

etiquetados (número y nombre del voluntario, número de muestra, día de estudio y tiempo de muestreo en minutos), para evitar cualquier tipo de confusión ya sea horario o muestras de otro voluntario.

Las muestras de plasma y orina obtenidas durante el estudio se analizaron por cuadruplicado al mismo tiempo que sus respectivas curvas patrón, utilizando el método microbiológico de placa, descrito en las secciones 3.3.1.7 y 3.3.2.7 respectivamente.

" CAPITULO IV "

CAPITULO IV

4. RESULTADOS.

4.1. Control Farmacéutico.

En la Tabla XIV se presentan los resultados de las pruebas de control realizadas en los catorce productos farmacéuticos de ampicilina th. cápsulas de 250 mg.

Se siguieron los lineamientos explicados en la sección 3.1. Las pruebas efectuadas fueron; identificación, pH, desintegración, humedad, variación de peso, variación de contenido y contenido químico.

4.2. Estudios in vitro.

4.2.1. Determinación cuantitativa de ampicilina th. en HCl 0.1N y agua destilada.

La ampicilina th. fué cuantificada en base al método espectrofotométrico de la B.P.⁽¹¹⁾ descrito en la sección 3.2.1. El método fué validado y los resultados obtenidos se presentan a continuación.

4.2.1.1. Linealidad y repetibilidad.

Para determinar la linealidad del método de valoración de la B.P.⁽¹¹⁾ utilizado, se siguieron los lineamientos descritos en la sección 3.2.1. En las Figuras 8, y 9 se presentan las gráficas promedio de cinco curvas patrón de ampicilina th. en un intervalo de concentración de 4 a 24 mcg/ml, en HCl 0.1N

Tabla XIV. Resultados del análisis de Control de Calidad de catorce productos comerciales de ampicilina th. cápsulas de 250 mg.

Producto (clave)	Identificación	pH	Tiempo de desintegración min (n = 3) ***	Variación de contenido % (n = 3) ****	Contenido % (n = 1) ****
AM	positiva	5.3	1.90 - 10.58	93.57 - 98.80	96.06
BM	positiva	4.6	1.50 - 5.58	93.04 - 98.20	99.05
CM	positiva	5.0	1.37 - 9.45	67.59 - 97.05**	82.5**
DM	positiva	4.19	1.0 - 8.33	84.00 - 98.40**	91.16**
EM	positiva	5.2	1.15 - 13.30	96.20 - 99.60	100.3
FM	positiva	4.0	1.50 - 9.10	86.48 - 95.70**	87.1**
GM	positiva	4.05	2.0 - 14.40	96.60 - 102.60	99.56
HM	positiva	3.65	0.40 - 7.40	85.70 - 94.10	93.54
IM	positiva	5.71	1.0 - 9.29	89.54 - 108.08**	94.58
JM	positiva	3.69	0.40 - 10.5	89.86 - 102.6**	93.64
KM	positiva	3.92	1.10 - 7.48	82.50 - 98.50	88.48
LM	positiva	4.31	0.42 - 7.44	82.20 - 101.30**	95.0
MM	positiva	4.2	1.55 - 12.15	88.28 - 92.09**	90.13**
N*	positiva	4.49	1.25 - 12.26	96.60 - 98.40	95.9

* Producto innovador (Pollicillin, Bristol Lab. U.S.A., Lote H6M17).

** No cumple las especificaciones de la B.P. (92.5-107.5%).

*** Agua destilada a 37°C.

**** Método espectrofotométrico de la B.P. (11)

Figura 8.27 Curva patrón de ampicilina th. en HCl 0.1N
Método Espectofotométrico, ($r=0.999$, $\pi=0.38$,
 $b=0.04$, $n=5$)

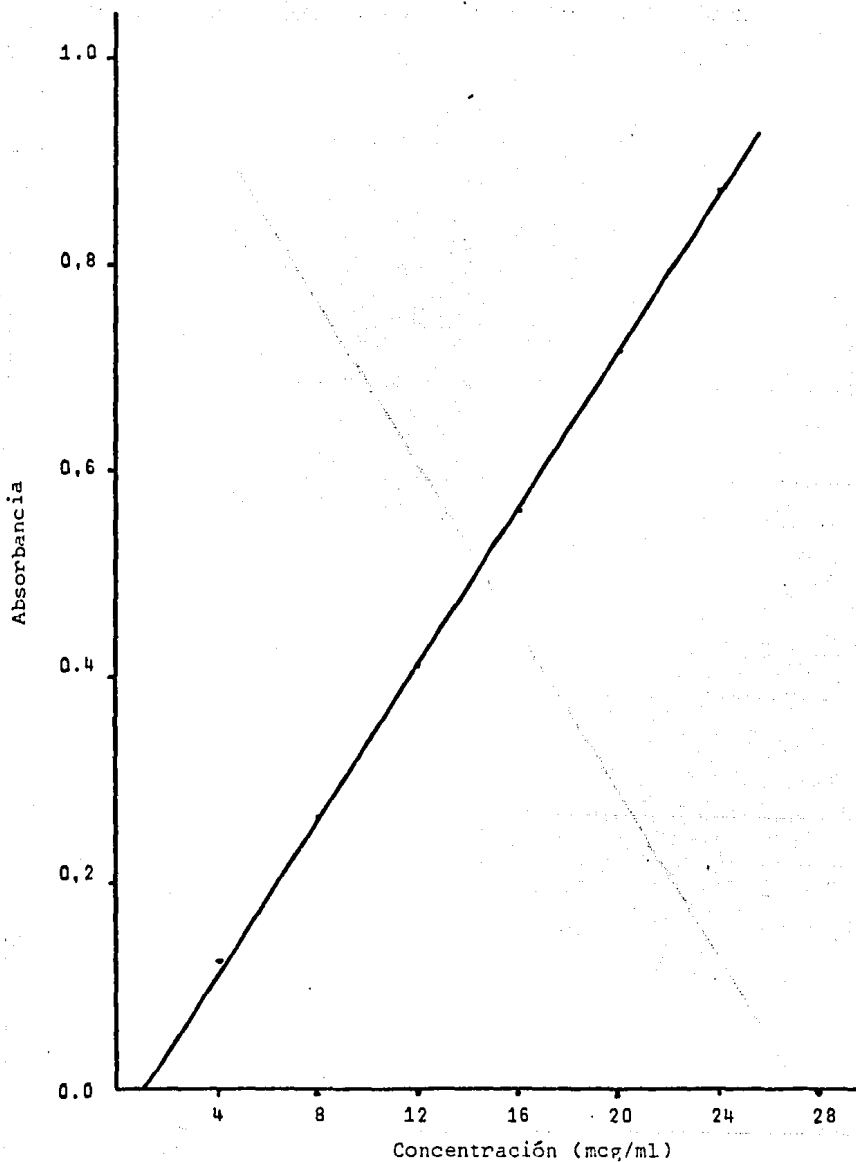


Figura 9.- Curva patrón de ampicilina th. en agua destilada.

Método Espectrofotométrico ($r = 0.999$, $\pi = 0.38$, $b = 0.05$
 $n = 5$)

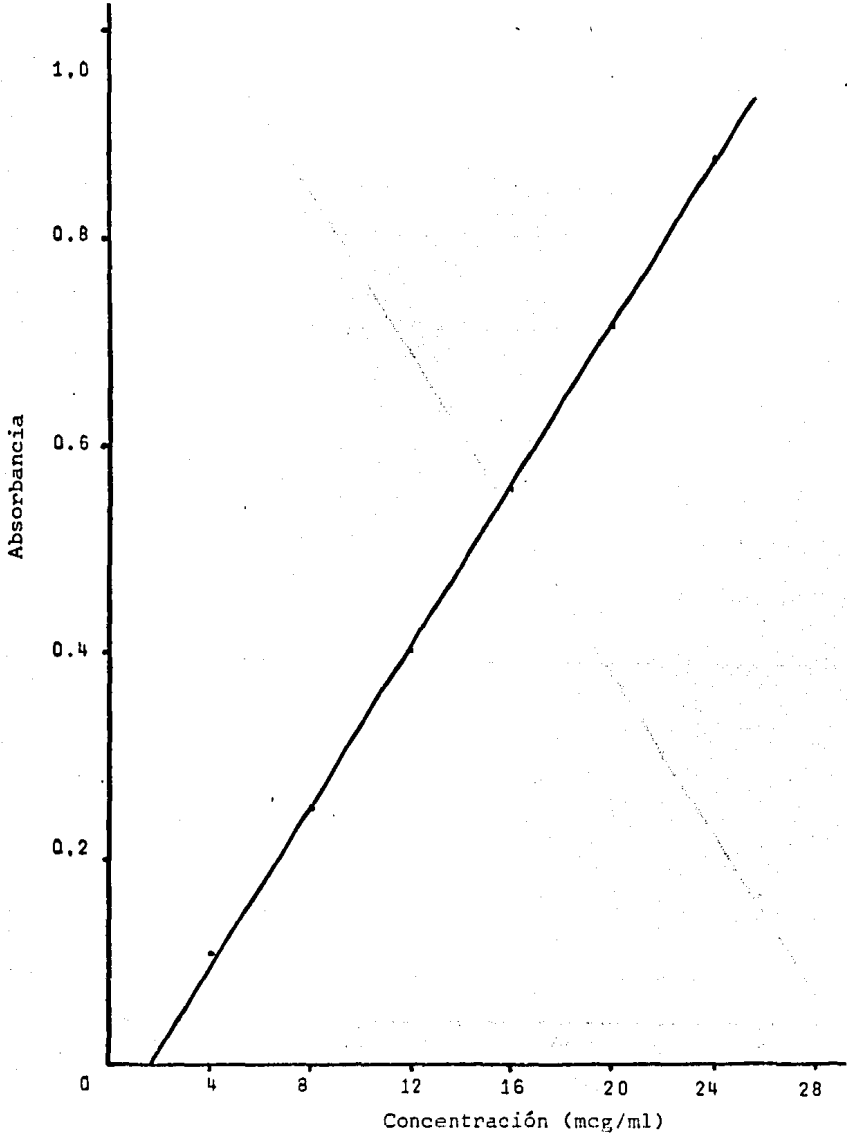


Tabla XV. Repetibilidad del método de valoración de ampicilina th. en HCl 0.1N y agua destilada por el método espectrofotométrico de la B.P.

Concentración de ampicilina th. (mcg/ml)	HCl 0.1N			agua destilada		
	\bar{X} (n=5)	S	C.V.%	\bar{X} (n=5)	S	C.V.%
4	0.116	0.0019	1.6	0.104	0.002	1.9
8	0.260	0.0016	0.61	0.252	0.0015	0.59
12	0.417	0.0017	0.40	0.399	0.0018	0.45
16	0.576	0.0013	0.22	0.556	0.0019	0.34
20	0.725	0.0018	0.24	0.706	0.0021	0.29
24	0.886	0.0011	0.12	0.866	0.0022	0.25

\bar{X} = valor promedio

S = desviación estándar

C.V.% = coeficiente de variación en porcentaje.

y agua destilada respectivamente. En ambas gráficas se observa una relación lineal entre la concentración y la absorbancia.

Mediante un análisis de regresión lineal del promedio de las absorbancias, por el método de mínimos cuadrados, se obtiene la ecuación de una línea recta en base a la cual se calcula la pendiente, intercepto y coeficiente de correlación de las curvas patrón de ampicilina th. en los dos medios de disolución.

En la Tabla XV se presentan los resultados del análisis estadístico efectuado en la determinación de la repetibilidad del método de valoración de ampicilina th. en HCl 0.1N y agua destilada.

4.2.1.2. Reproducibilidad.

En la Tabla XVI se presentan los resultados de reproducibilidad obtenidos al seguir los lineamientos explicados en la sección 3.2.1.5., a partir de estos datos se calcula el coeficiente de variación diario, en porciento para el método de valoración de ampicilina th., tanto en HCl 0.1N como en agua destilada.

Mediante un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados de los valores experimentales de concentración y el promedio de las absorbancias en los diferentes días, se obtiene la ecuación de una línea recta con $m = 0.038$, $b = 0.04$ y $r = 0.999$ ($p < 0.001$) para HCl 0.1N y $m = 0.038$, $b = 0.05$ y $r = 0.999$ ($p < 0.001$) para agua destilada. En la tabla XVI también se presentan los parámetros: m , b y r , obtenidos del aná-

Tabla XVI. Reproducibilidad del método de valoración espectrofotométrico⁽¹¹⁾, para ampicilina th. en HCl 0.1N y agua destilada en diferentes días.

Concentración de amp. th. (mg/ml)	Absorbancia en HCl 0.1N									Absorbancia de agua destilada						
	Días					\bar{X}	S	CV %	Días					\bar{X}	S	CV %
	I	II	III	IV	V				I	II	III	IV	V			
4	0.125	0.127	0.116	0.122	0.124	0.122	0.004	3.4	0.102	0.120	0.111	0.104	0.114	0.110	0.007	6.8
8	0.276	0.260	0.260	0.260	0.270	0.265	0.007	2.8	0.246	0.260	0.252	0.252	0.252	0.252	0.004	1.9
12	0.430	0.425	0.417	0.422	0.425	0.423	0.004	1.1	0.396	0.407	0.405	0.399	0.406	0.402	0.004	1.2
16	0.587	0.576	0.575	0.565	0.574	0.575	0.007	1.3	0.560	0.565	0.561	0.556	0.560	0.560	0.003	0.58
20	0.750	0.736	0.725	0.741	0.735	0.737	0.009	1.2	0.737	0.720	0.716	0.706	0.716	0.719	0.011	1.5
24	0.912	0.896	0.886	0.892	0.892	0.895	0.009	1.0	0.877	0.875	0.875	0.866	0.876	0.873	0.004	0.5
r,	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999			0.999	0.995	0.999	0.999	0.999	0.999		
m	0.039	0.39	0.038	0.038	0.038	0.038			0.039	0.038	0.038	0.039	0.038	0.038		
b	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04			0.06	0.040	0.05	0.05	0.04	0.05		

r = coeficiente de correlación

m = pendiente

b = intercepto

lisis de regresión por mínimos cuadrados para las curvas patrón realizadas en diferentes días.

4.2.2. Perfil de disolución de catorce productos de ampicilina th. cápsulas de 250 mg.

Se determinó la cantidad disuelta a los diferentes tiempos de muestreo, para cada producto estudiado de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 3.2.2. Para esto, las absorbancias de las muestras en estudio se interpolaron en sus respectivas curvas patrón, obteniéndose datos de concentración. Cada concentración fué corregida por el factor de disolución, calculándose así, la cantidad disuelta individual.

Los resultados obtenidos para los datos promedio ($n = 6$) de cantidad disuelta en porciento contra tiempo: (5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 min) en los dos medios de disolución se presentan en la tabla XVII.

En las Figuras 10 y 11 se presentan las gráficas promedio de porciento disuelto contra tiempo para los catorce productos estudiados de ampicilina th., en HCl 0.1 N y agua destilada respectivamente.

4.3. Estudios in vivo: Biodisponibilidad de ampicilina th. en humanos.

4.3.1. Determinación de ampicilina th. en plasma.

para la determinación de ampicilina th. en plasma se empleo un método microbiológico de sensidisco-placa, en el cual

Tabla XVII. Resultados promedio del estudio de perfil de disolución de catorce productos comerciales de ampicilina th. cápsulas de 250 mg, en dos medio de disolución (HCl 0.1 N y agua destilada)

Producto estudiado (clave)	Porcentaje Disuelto (n = 6)													
	HCl 0,1 N							agua destilada						
	5	10	15	20	30	45	60	1	10	15	20	30	45	60
AM	0.574	5.01	8.98	11.45	51.12	53.18	51.99	3.77	5.8	10.3	14.6	43.6	50.6	55.0
BM	90.4	101.9	99.1	98.8	98.0	97.7	95.9	43.01	85.7	95.5	99.3	103.4	104.6	105.4
CM	82.4	98.4	95.4	93.1	93.1	92.4	91.1	53.9	61.9	71.1	76.8	82.5	86.3	89.1
DM	90.8	101.3	97.9	97.0	97.0	95.9	92.4	75.6	88.3	97.7	101.1	103.5	104.1	105.5
EM	64.35	102.4	104.0	103.4	101.4	97.6	92.9	33.71	60.7	82.7	96.8	104.0	107.2	106.7
FM	75.8	96.1	95.6	95.1	93.3	91.6	90.2	41.22	55.16	62.73	65.95	67.71	67.81	64.44
GM	55.2	99.1	106.0	104.8	104.6	100.6	100.6	29.5	46.4	80.3	93.9	105.2	106.5	106.3
HM	84.3	93.7	96.3	100.0	95.2	95.1	95.2	34.6	64.0	79.3	86.9	94.3	96.4	96.1
IM	99.4	104.9	105.1	104.0	102.4	100.9	98.7	24.9	58.5	85.2	99.3	105.6	106.7	104.3
JM	74.3	92.1	99.0	98.6	98.6	96.3	94.5	51.8	79.5	88.0	92.2	94.3	96.1	94.6
KM	89.0	94.0	94.4	93.4	91.0	89.2	85.4	29.2	70.4	83.6	88.5	95.6	96.7	95.4
LM	55.3	73.6	79.8	82.6	86.2	88.5	86.8	38.7	61.6	78.3	87.0	94.9	100.5	102.8
MM	75.9	95.4	97.7	97.1	95.4	90.9	84.5	22.6	37.0	86.7	97.5	99.8	99.6	97.5
N *	63.9	92.3	97.5	98.8	95.8	93.15	90.77	47.3	75.5	83.4	88.9	95.2	99.6	102.1

Figura No. 10. Perfil de disolución de productos comerciales de ampicilina th. en HCl 0.1N.

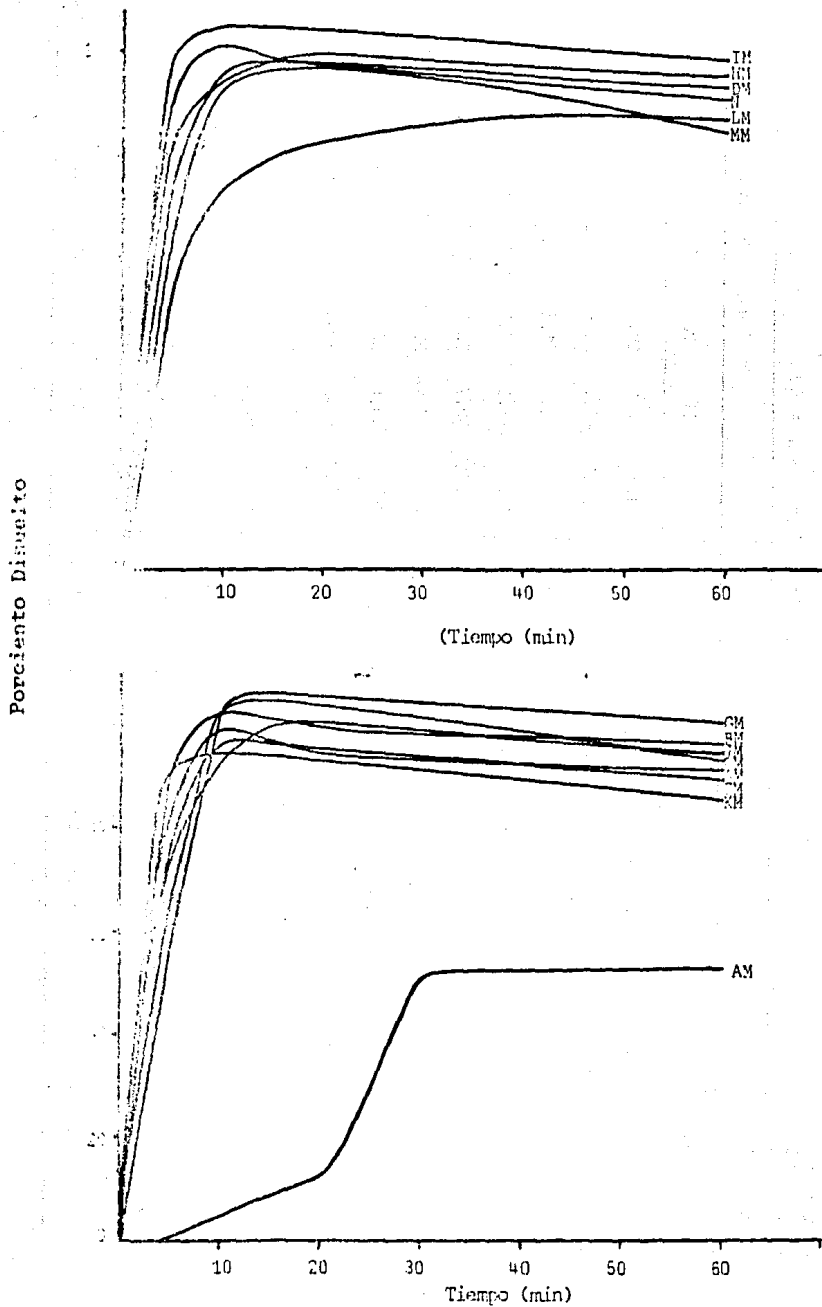
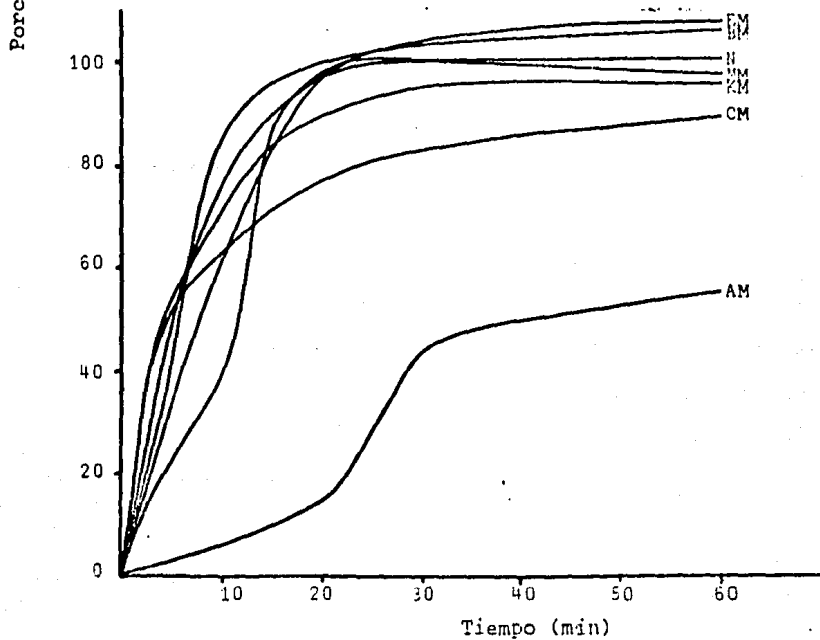
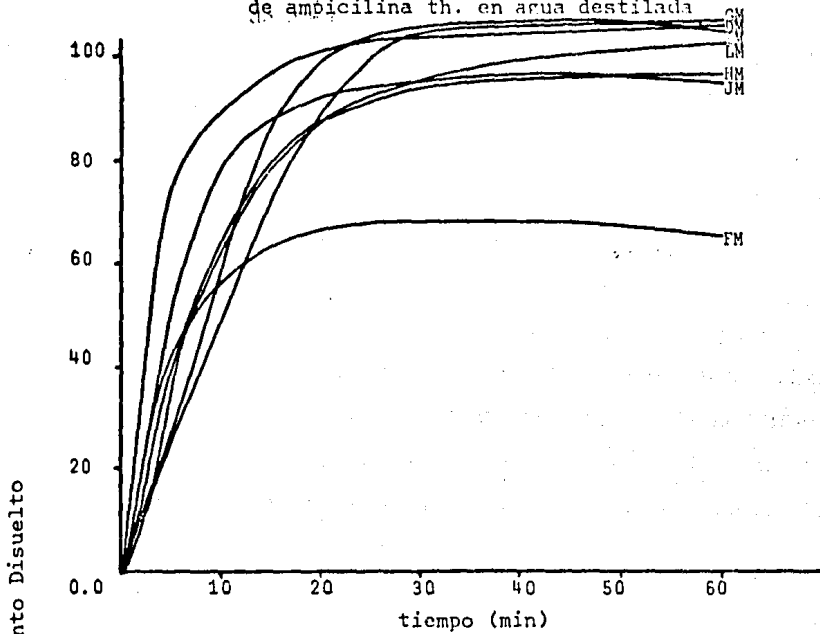


Figura . Perfil de disolución de catorce productos comerciales de ampicilina th. en agua destilada



se utilizó B. subtilis como microorganismo de prueba. Este método fué validado como se describe a continuación.

4.3.1.1. Linealidad.

Para determinar la linealidad del método microbiológico en plasma, se siguieron los lineamientos indicados en la sección 3.3.1.8. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 1'2, aquí se observa que al graficar el logaritmo de la concentración vs el promedio de los halos de inhibición se obtiene una relación lineal adecuada de 0.25 a 50 $\mu\text{g/ml}$, cuyo coeficiente de determinación, pendiente e intercepto son: $r^2 = 0.9977$ ($p < 0.0005$), $m = 0.2779$ y $b = 0.002$ respectivamente.

Las concentraciones que se observaron en los plasmas de los estudios, no excedieron la concentración de 50.0 $\mu\text{g/ml}$, por lo que el ^{intervalo} de linealidad establecido, fué adecuado para interpolar los halos de inhibición de los plasmas problemas en la curva patrón de ampicilina th.

4.3.1.2. Reproducibilidad y repetibilidad.

Para establecer la repetibilidad del método se siguieron las indicaciones del inciso 3.3.1.9. Se determinó por octuplicado la concentración de ampicilina th. en plasma en una curva patrón cuyas concentraciones fueron 50, 25, 15, 7.5, 3.0, 1.5, 0.75 y 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados del análisis estadístico de los datos se muestran en la Tabla XVIII en la columna 4 se encuentra el coeficiente de variación en por ciento (C.V.%), el cual determina la repetibilidad del método microbiológico de sensidisco-

Figura No. 12.- Curva patrón de ampicilina th. en plasma
Método Microbiológico

($r = 0.999$, $m = 0.278$, $b = 0.002$, $n = 8$)

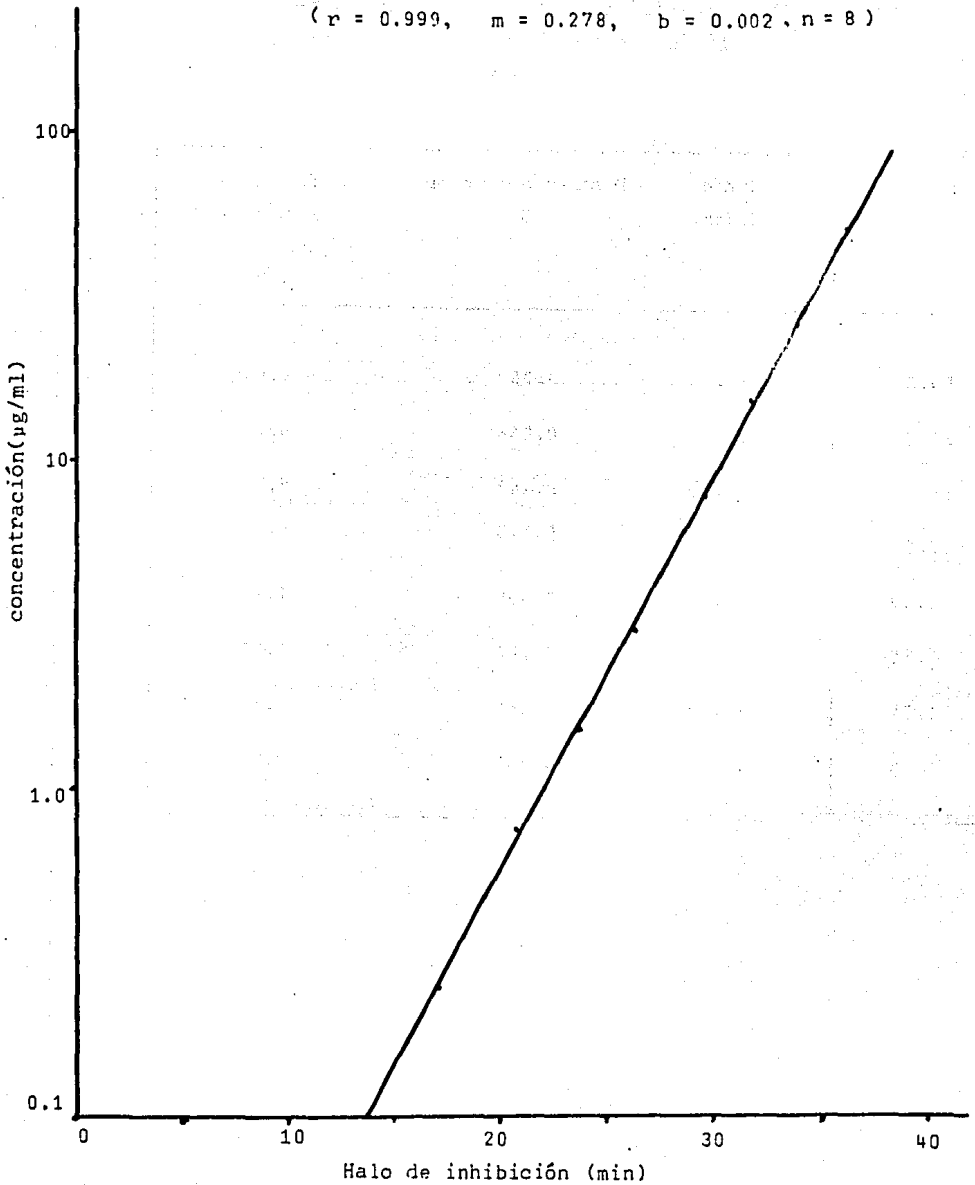


Tabla XVIII. Repetibilidad del método microbiológico de sensidisco-placa en plasma
(n = 8)

Concentración µg/ml	Media \bar{X} (mm)	Desviación estándar S	Coficiente de variación en por- ciento C.V.%
50.0	36.29	0.252	0.694
25.0	33.79	0.236	0.710
15.0	31.50	0.242	0.772
7.5	29.84	0.178	0.613
3.00	26.37	0.394	1.49
1.50	23.85	0.240	1.01
0.75	20.95	0.350	1.67
0.25	17.2	0.440	2.5

placa en plasma.

En la Tabla XIX, se muestra la reproducibilidad del método microbiológico, para esto se siguieron los lineamientos indicados en la sección 3.3.1.9. En esta Tabla se presentan los valores de los halos de inhibición (mm), los datos de desviación estándar (S) y el coeficiente de variación promedio (C.V.), obtenidos en las determinaciones de las curvas patrón de ampicilina th. en plasma analizadas en diferentes días, pero bajo condiciones idénticas de operador, instrumento y laboratorio.

El coeficiente de variación indica la reproducibilidad del método microbiológico de sensidisco-placa en muestras plasmáticas.

El coeficiente de determinación de las curvas patrón estudiadas, varió entre 0.994 a 0.998.

4.3.1.3. Estabilidad de ampicilina th. en plasma.

Para determinar la estabilidad de ampicilina th. en plasma se siguieron los lineamientos descritos en la sección 3.3.1.10. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 13 y en las Tablas XX y XXI en dichas tablas se observa; primero, que a temperatura ambiente ninguna de las muestras sufre una degradación mayor al 4% en las 4 horas de exposición y segundo, que las muestras guardadas en congelación a -10°C y analizadas a los 7, 14 y 21 días, no sufren una degradación mayor al 10% para las dos concentraciones (15 y 30 $\mu\text{g/ml}$).

Tabla XIX. Reproducibilidad del método microbiológico de sensidisco-placa en plasma en diferentes días.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	I		II		III		IV		V		Datos Promedio de las curvas		
	n=8		n=8		n=8		n=8		n=8		\bar{X}	S	C.V. %
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S	C.V. %
50	31.98(0.542)		33.10(0.281)		36.29(0.252)		30.21(0.698)		31.72(0.326)		32.66	2.27	6.95
25	29.50(0.461)		30.11(0.216)		33.79(0.236)		28.70(0.689)		29.33(0.296)		30.28	2.02	6.67
15	27.12(0.317)		28.75(0.651)		31.50(0.242)		27.30(0.228)		27.65(0.226)		28.46	1.81	6.35
7.5	25.22(0.299)		26.23(0.398)		29.84(0.178)		24.75(0.369)		26.00(0.451)		26.4	2.00	7.57
3.0	22.31(0.43)		23.91(0.451)		26.37(0.394)		21.82(0.532)		23.03(0.389)		23.48	1.79	7.62
1.5	20.47(0.362)		21.51(0.322)		23.85(0.240)		19.53(0.419)		21.63(0.426)		21.39	1.61	7.52
0.75	17.55(0.534)		18.75(0.348)		20.95(0.350)		17.24(0.456)		19.66(0.448)		18.83	1.52	8.07
0.25	12.60(0.186)		14.64(0.16)		17.20(0.141)		13.70(0.132)		14.68(0.210)		14.56	1.70	11.67
r	0.995		0.996		0.999		0.999		0.994				
m	0.284		0.282		0.278		0.3123		0.326				
b	0.005		0.004		0.002		0.003		0.001				

Figura 13.- Gráfica de estabilidad de ampicilina th. en plasma a temperatura ambiente y a -10°C .

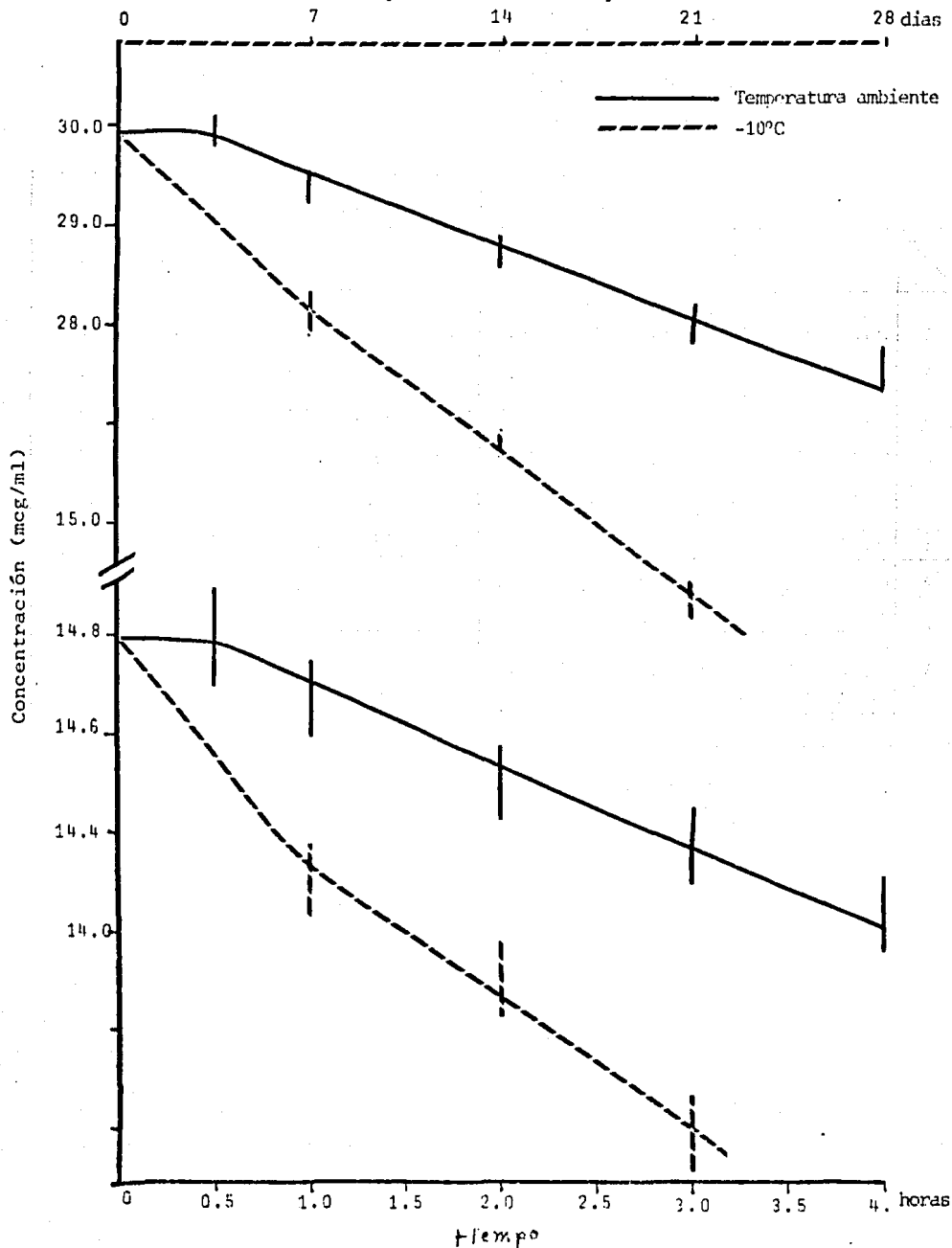


Tabla XX. Datos de estabilidad de ampicilina th. en plasma a temperatura ambiente.

Tiempo n	15 µg/ml						30 µg/ml					
	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
1	15.1	15.0	14.8	14.7	14.6	14.4	30.0	29.9	29.8	29.4	29.0	28.8
2	15.0	15.0	14.9	14.8	14.5	14.5	30.2	29.8	29.6	29.5	29.1	28.7
3	14.9	14.8	15.0	14.6	14.5	14.3	30.0	30.0	29.7	29.4	29.1	28.7
4	15.0	15.1	14.9	14.7	14.6	14.4	30.0	29.9	29.7	29.3	29.2	28.9
5	14.9	15.1	14.8	14.7	14.6	14.5	29.9	30.0	29.8	29.4	29.0	28.8
6	15.1	15.0	14.9	14.8	14.7	14.4	29.9	29.9	29.7	29.3	29.2	28.9
\bar{X}	15.0	15.0	14.88	14.71	14.58	14.41	30.0	29.91	29.71	29.38	29.1	28.8
σ	0.089	0.109	0.075	0.075	0.075	0.075	0.109	0.075	0.075	0.075	0.089	0.089
%	0.00	0.00	0.78	1.89	2.78	3.89	0.0	0.28	0.95	2.06	3.0	4.0
C.V. %	0.59	0.72	0.50	0.50	0.51	0.52	0.36	0.25	0.30	0.25	0.30	0.31

Tiempo = horas.

Tabla XXI. Datos de estabilidad de ampicilina th. en plasma a temperatura de -10°C .

		15 $\mu\text{g/ml}$				30 $\mu\text{g/ml}$			
		Tiempo (días)				Tiempo (días)			
n		0	7	14	21	0	7	14	21
1		15.1	14.6	14.0	14.0	30.0	29.0	28.4	27.7
2		15.0	14.5	14.3	13.9	30.2	29.1	28.5	27.7
3		14.9	14.6	14.3	14.1	30.0	29.1	28.4	27.6
4		15.0	14.7	14.4	14.0	30.0	29.2	28.3	27.5
5		14.9	14.7	14.3	14.0	29.9	29.0	28.4	27.7
6		15.1	14.6	14.4	14.1	29.9	29.0	28.4	27.7
\bar{X}		15.0	14.51	14.31	14.01	30.0	29.06	28.4	27.65
σ		0.089	0.075	0.075	0.075	0.109	0.081	0.063	0.083
%		0.0	2.56	4.56	6.56	0.0	3.12	5.34	7.84
C V %		0.59	0.51	0.52	0.53	0.36	0.27	0.22	0.30

Debe hacerse referencia al hecho que las muestras plasmáticas obtenidas durante el estudio de Biodisponibilidad fueron analizadas de 24 a 48 hs. después de su obtención, estas muestras no estuvieron expuestas más de 4 horas a temperatura ambiente, mientras se llevaban a cabo los estudios de biodisponibilidad, lo que asegura una pérdida de potencia, menor al 5% en todos los casos.

4.3.1.4. Actividad de los metabolitos (Especificidad).

Para determinar si los metabolitos de ampicilina; ácido penicilánico y ácido penicilóico eran biológicamente activos se siguieron los lineamientos indicados en la sección 3.3.1.11.

Los resultados obtenidos indican que ninguna de las preparaciones degradadas produce halo de inhibición al probarse contra el microorganismo (B. subtilis) en las mismas condiciones de la solución original.

Lo cual demuestra que tanto el ácido penicilánico como el ácido penicilóico en las condiciones experimentales utilizadas son biológicamente inactivos y que el método microbiológico de sensidisco-placa puede utilizarse con la seguridad de que estos metabolitos no interfieren en el análisis cuantitativo de ampicilina th. en plasma.

4.3.2. Determinación de ampicilina th. en orina.

Para la determinación de ampicilina th. en orina se empleo un método microbiológico de sensidisco-placa, en el cual, el microorganismo de prueba utilizado fué B. subtilis. Este método fué validado, obteniéndose los resultados descritos a

continuación.

4.3.2.1. Linealidad.

Para determinar la linealidad del método microbiológico en orina, se siguieron los lineamientos indicados en la sección 3.3.2.8. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 14. Aquí se observa que al efectuar un análisis de regresión lineal utilizando el método de mínimos cuadrados, en la gráfica de datos de concentración contra el valor promedio de los halos de inhibición, se obtiene un coeficiente de correlación de 0.999 .

Los intervalos de lectura que se obtienen en las orinas problemas no exceden la concentración de 50.0 $\mu\text{g/ml}$, por lo que el intervalo de linealidad establecido es adecuado para la interpolación de los halos de inhibición de las orinas problemas en la curva patrón de ampicilina th. en orina.

4.3.2.2. Repetibilidad y reproducibilidad.

Para establecer la repetibilidad del método se siguieron las indicaciones del inciso 3.3.2.9. Se determinó por octuplicado la concentración de ampicilina th. en una curva patrón hecha en orina, cuyas concentraciones fueron: 50, 24, 15, 7.5, 3.0, 1.5, 0.75 y 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados y análisis estadístico se muestran en la Tabla XXII, en la última columna se encuentra el coeficiente de variación en por ciento (C.V.%), el cual determina la repetibilidad del método de sensidisco-placa en orina.

Figura No. 14.- Curva patrón de ampicilina th. en orina

Método Microbiológico

90.

($r = 0.999$, $m = 0.329$, $b = 0.02$, $n = 8$)

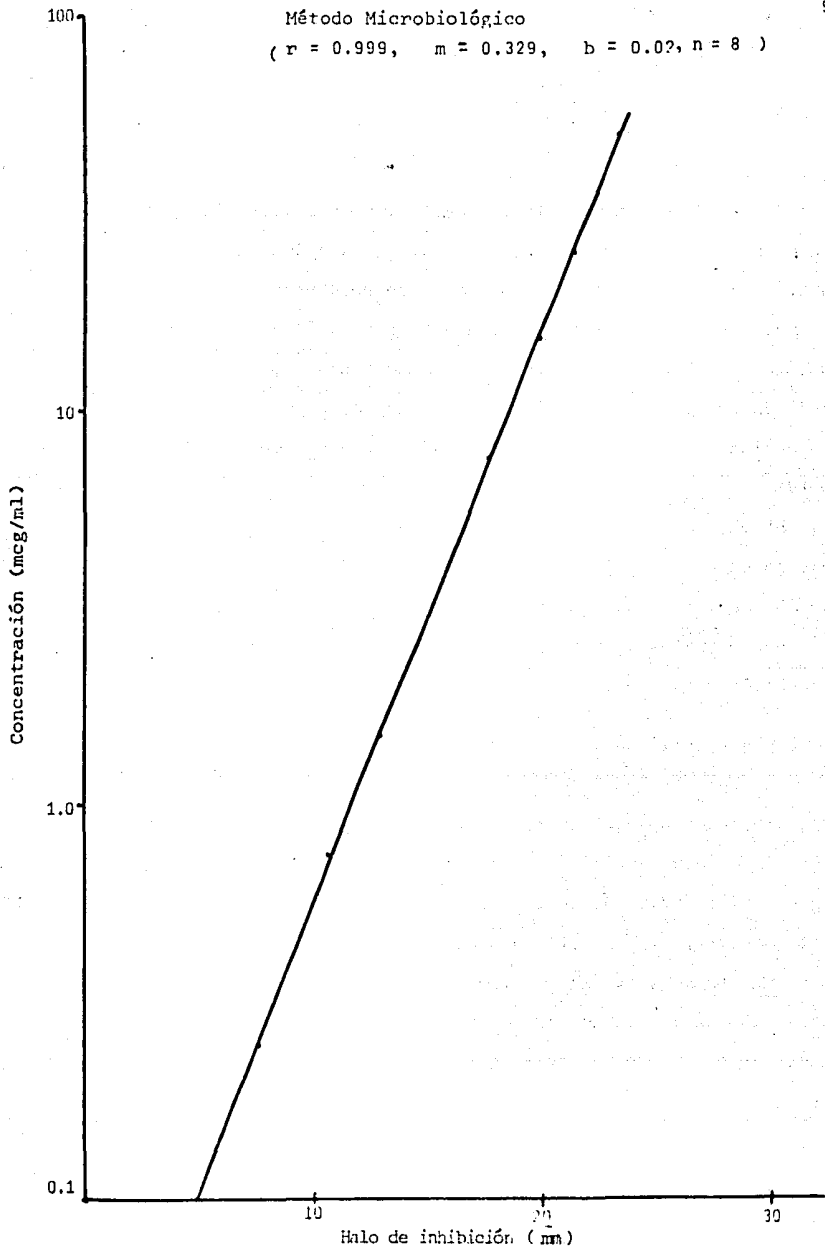


Tabla XXII. Repetibilidad del método microbiológico de sensidisco-placa en orina.

Concentración µg/ml	Media \bar{X} (n=8)	Desviación estándar S	Coefficiente de variación en porciento C.V. %
50.0	23.43	0.164	0.699
25.0	21.59	0.122	0.565
15.0	19.84	0.132	0.681
7.5	17.77	0.301	0.72
3.0	15.34	0.307	2.00
1.5	12.55	0.054	0.436
0.75	10.65	0.320	3.01
0.25	7.85	0.266	3.39

Para la reproducibilidad del método microbiológico se siguieron los lineamientos descritos en la sección 3.3.2.9. En la Tabla XXIII se presentan los valores de los halos de inhibición (mm), los datos de desviación estándar (S) y el coeficiente de variación promedio (C.V.), obtenidos en las determinaciones de las curvas patrón de ampicilina th. en orina, analizadas en diferentes días, bajo condiciones idénticas de operador, instrumentos y laboratorio. El coeficiente de variación indica la reproducibilidad del método microbiológico de sensidisco-placa en muestras urinarias.

El coeficiente de determinación de las curvas patrón estudiadas en orina varió entre 0.993 a 0.99.

4.3.2.3. Estabilidad de ampicilina th. en orina.

Para determinar la estabilidad de ampicilina th. en orina, se siguió el procedimiento descrito en la sección 3.3.2.10. Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas XXIV y XXV. En las Tablas se observa; primero que a temperatura ambiente ninguna muestra sufre una degradación mayor al 5% durante las 4 hs. de exposición y segundo que las muestras guardadas a una temperatura de -10°C no sufren una degradación mayor al 10% en los 21 días que dura el estudio de estabilidad.

Los datos de estabilidad fueron sometidos a un análisis de varianza. Es necesario mencionar que las muestras urinarias colectadas durante los estudios, fueron guardadas inmediatamente después de su obtención a -10°C en el congelador y el análisis cuantitativo se efectuó de 12 a 24 hs. después de cada estudio lo que asegura

Tabla XXIII. Reproducibilidad del método micro--
biológico de sensidisco-placa en ori-
na en diferentes días.

Concentra- ción ($\mu\text{g/ml}$)	I		II		III		IV		V		Datos promedio		
	n=8		n=8		n=8		n=8		n=8		\bar{X}	S	C.V.%
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S			
50	25.43(0.432)	25.85(0.256)	23.43(0.164)	25.47(0.641)	24.63(0.833)	24.96	0.964	3.86					
25	23.61(0.357)	23.53(0.273)	21.59(0.122)	23.32(0.321)	23.88(0.530)	23.19	0.916	3.94					
15	22.42(0.258)	22.37(0.314)	19.84(0.132)	21.93(0.482)	22.79(0.372)	21.87	1.17	5.34					
7.5	20.71(0.335)	20.45(0.233)	17.77(0.301)	19.53(0.397)	20.71(0.408)	19.83	1.25	6.30					
3.0	17.87(0.437)	17.72(0.074)	15.34(0.307)	16.82(0.249)	17.72(0.657)	17.09	1.06	6.20					
1.5	15.26(0.112)	15.34(0.082)	12.55(0.054)	14.42(0.163)	15.5 (0.190)	14.61	1.22	8.35					
0.75	12.99(0.212)	13.01(0.104)	10.65(0.320)	12.62(0.184)	13.21(0.169)	12.49	1.053	8.43					
0.25	9.01(0.205)	9.24(0.012)	7.85(0.266)	8.94(0.129)	8.86(0.195)	8.78	0.538	6.12					

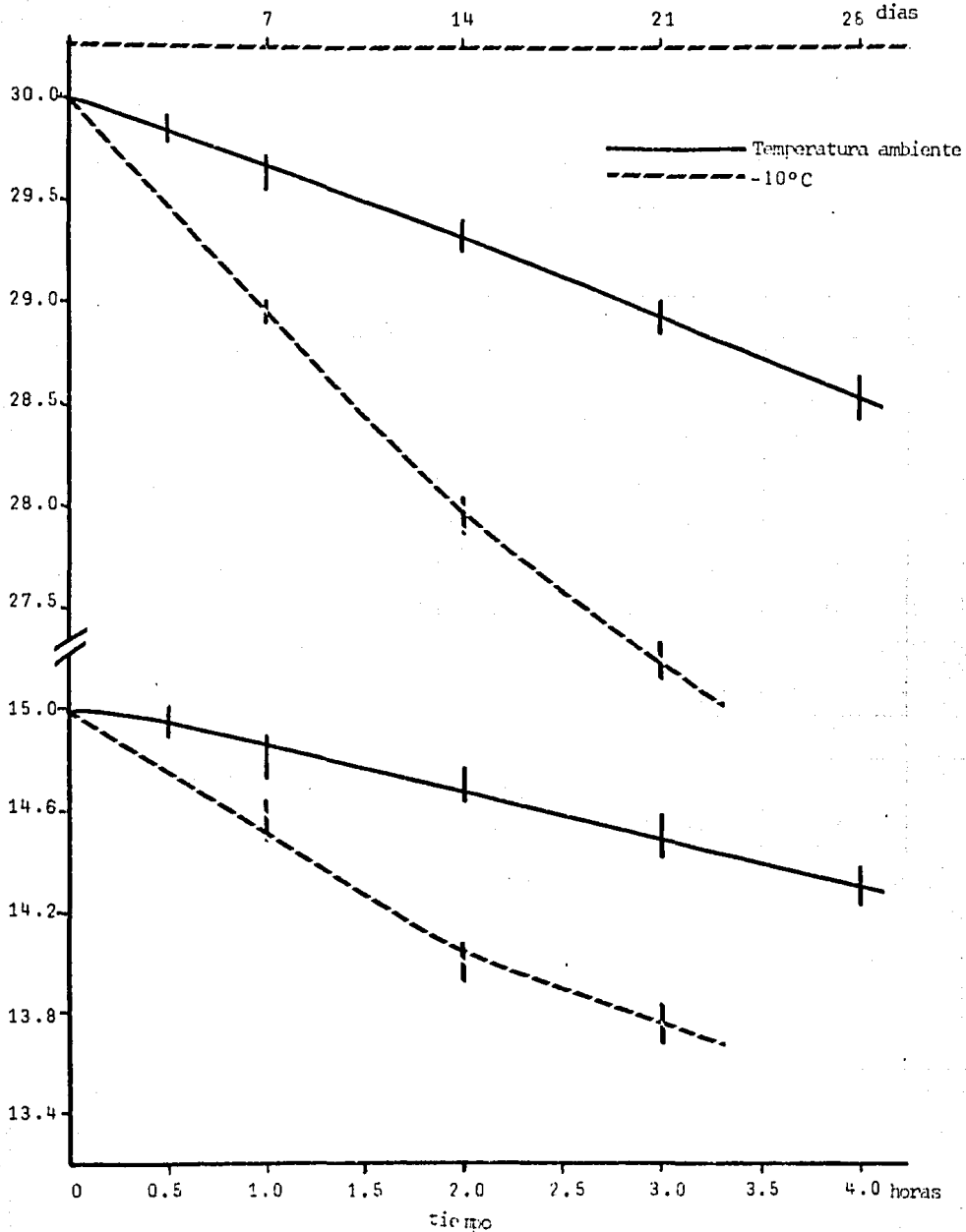
$r^2 = 0,993$	0,997	0,996	0,999	0,994
$m = 0,320$	0,322	0,329	0,032	0,311
$b = 0,01$	0,01	0,02	0,01	0,01

Tabla XXIV. Datos de estabilidad de ampicilina th.
en orina a temperatura ambiente.

Concentración	15 µg/ml						30 µg/ml					
Tiempo hr. n	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
1	15.1	15.0	14.9	14.7	14.4	14.3	30.1	29.9	29.7	29.4	28.9	28.5
2	15.0	14.9	14.8	14.8	14.5	14.2	30.1	29.8	29.7	29.4	29.0	28.6
3	15.0	14.9	14.8	14.7	14.6	14.4	30.0	29.8	29.6	29.3	29.0	28.7
4	15.0	15.0	14.9	14.7	14.5	14.3	30.0	29.9	29.6	29.3	28.9	28.6
5	14.9	15.0	14.7	14.6	14.5	14.4	29.9	29.8	29.6	29.3	28.9	28.5
6	15.0	14.9	14.8	14.7	14.6	14.3	30.0	29.8	29.6	29.3	28.9	28.6
\bar{X}	15.0	14.95	14.81	14.7	14.51	14.31	30.0	29.86	29.65	29.33	28.93	28.58
σ	0.063	0.054	0.075	0.063	0.075	0.075	0.075	0.081	0.054	0.051	0.051	0.075
%	0.0	0.34	1.23	2.0	3.23	4.56	0.0	0.45	1.17	2.23	3.56	4.73
C V %	0.42	0.36	0.50	0.42	0.51	0.52	0.25	0.27	0.18	0.17	0.17	0.26

Tabla XXV. Datos de estabilidad de ampicilina th.
en orina a temperatura de -10°C .

Concentración	5 $\mu\text{g/ml}$				30 $\mu\text{g/ml}$			
tiempo días n	0	7	14	21	0	7	14	21
1	15.1	14.6	14.1	13.8	30.1	29.9	28.0	27.3
2	15.0	14.7	14.0	13.7	30.1	29.0	27.9	27.3
3	15.0	14.5	14.0	13.9	30.0	29.0	28.0	27.1
4	15.0	14.6	14.1	13.7	30.0	28.9	28.0	27.3
5	14.9	14.5	13.9	13.7	29.9	29.0	28.1	27.2
6	15.0	14.5	14.0	13.8	30.0	29.0	27.9	27.2
\bar{X}	15.0	14.56	14.01	13.76	30.01	28.96	27.98	27.23
σ	0.070	0.081	0.075	0.081	0.075	0.051	0.075	0.081
%	0.0	2.89	6.56	8.23	0.0	3.45	6.73	9.23
C V %	0.46	0.55	0.53	0.98	0.25	0.17	0.27	0.29

Figura 15.- Estabilidad de ampicilina th. en orina a temperatura ambiente y a temperatura de -10°C .

una pérdida de potencia menor al 5% en todos los casos.

4.3.2.4. Actividad de los metabolitos (Especificidad).

Para determinar si los metabolitos de ampicilina; ácido penicilánico y ácido penicilóico eran biológicamente activos se siguieron los lineamientos indicados en la sección 3.3.2.11.

Los resultados obtenidos indican que tanto el ac. penicilánico como el ac. penicilóico son inactivos. Esto es debido a que no se produce halo de inhibición al probarse ambos metabolitos contra el microorganismo (B. subtilis), en las mismas condiciones de la solución original.

Lo cual demuestra que el método microbiológico de sensi-disco-placa puede utilizarse con la seguridad de que estos metabolitos no interfieren en el análisis cuantitativo de ampicilina th. en orina.

4.3.3. Estudios Preliminares de Biodisponibilidad.

4.3.3.1. Estudio Preliminar I.

Administración oral de ampicilina th.

Con el objeto de diseñar un horario adecuado para la toma de muestras plasmáticas y urinarias a obtener en un estudio de biodisponibilidad de ampicilina th. y determinar si las concentraciones urinarias de las muestras obtenidas durante dicho estudio estarían dentro del intervalo de concentraciones establecida para la curva patrón (0.25 a 50 mcg/ml), se administró por vía oral una dosis de 250 mg de producto innovador (Polycilín de Bristol, Lote H6M17) a dos voluntarios sanos, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.3.1.

Las concentraciones urinarias obtenidas para los dos voluntarios estuvieron en el intervalo establecido para la curva patrón, por lo cual no fué necesario modificar dicho intervalo. Los datos urinarios fueron tratados de acuerdo a los métodos de velocidad de excreción ($\Delta A_{ex}/\Delta t$) y sigma menos (Σ -) asumiendo modelo abierto de un compartimiento (89,90). En base a estos métodos se calcularon los parámetros farmacocinéticos; K_d (constante de eliminación), $t_{1/2kd}$ (tiempo de vida media de eliminación), K_a (constante de absorción) y $t_{1/2Ka}$ (tiempo de vida media de absorción) por el primer método y K_d y $t_{1/2Kd}$ por el segundo.

En la Tabla XXVI se encuentran los datos de cantidad acumulada excretada (A_{ex}) hasta las 24 hr., cantidad remanente por ser excretada y velocidad de excreción de ampicilina th. para los dos voluntarios que participan en el estudio.

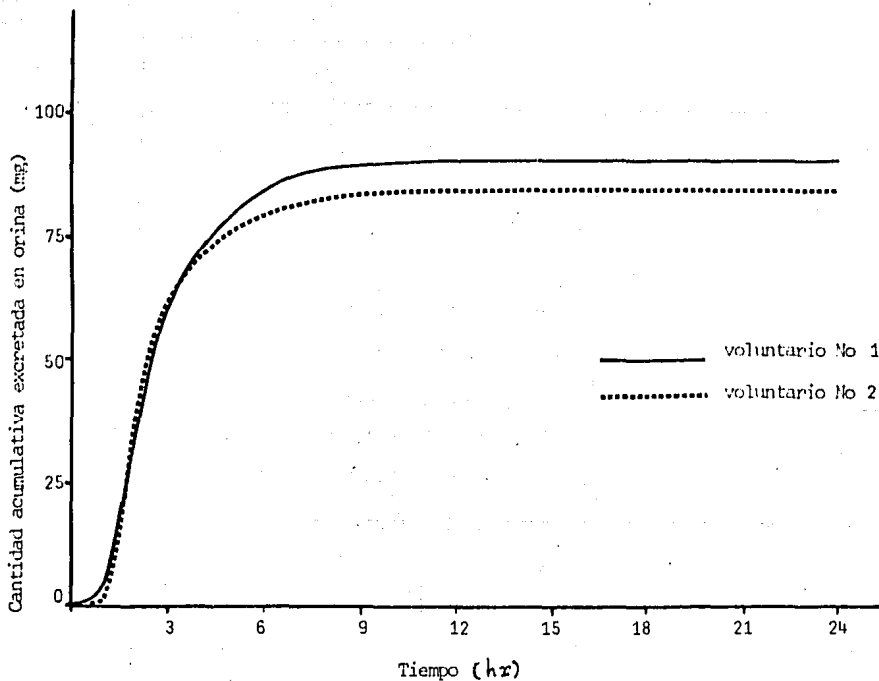
En la Figura 1'6 se muestra la gráfica de la cantidad acu

Tabla XXVI. Cantidad de ampicilina excretada en orina después de la administración oral de 250 mg del producto innovador a dos voluntarios sanos.

Tiempo (hr)	1			2			
	A _{ex} (mg)	Σ	ΔA _{ex} /Δt	A _{ex} (mg)	Σ	ΔA _{ex} /Δt	t _{mid}
0.0	0.0	90.90	1.524	0.0	84.21	0.42	0.25
0.5	0.762	90.138	5.33	0.201	84.00	2.56	0.75
1.0	3.43	87.47	30.82	1.487	82.72	42.62	1.25
1.5	18.84	72.06	37.3	22.80	61.41	32.44	2.25
2.0	37.49	53.41	26.66	38.98	45.23	32.44	2.25
2.5	50.82	40.08	23.62	55.20	29.01	11.08	2.75
3.0	62.63	28.27	9.58	60.74	23.47	14.7	3.25
3.5	66.99	23.91	14.56	68.09	16.12	5.0	3.75
4.0	74.27	16.63	5.57	70.59	13.62	4.57	5.0
6.0	85.42	5.48	1.83	79.73	4.48	1.635	7.0
8.0	89.08	1.82	0.674	83.0	1.21	0.423	9.0
10.0	90.42	0.471	0.140	83.84	0.365	0.118	11.0
12.0	90.71	0.190	0.015	84.08	0.130	0.011	18.0
24.0	90.90	0.0	0.0	84.21	0.0	0.0	0.0

t_{mid} = tiempo medio

Figura No. XVI. Gráfica de cantidad acumulativa excretada de ampicilina th. después de la administración oral del producto innovador a 2 voluntarios sanos.



mulada de ampicilina excretada en orina contra el tiempo para los dos sujetos participantes.

Las Figuras 17 y 18 muestran las gráficas de velocidad de excreción contra tiempo y de cantidad remanente para ser excretada contra el tiempo para cada voluntario, después de la administración oral de 250 mg del producto innovador de ampicilina th. En ambas gráficas se calcula por el método de regresión lineal de mínimos cuadrados, la constante de eliminación, el coeficiente de correlación y el tiempo de vida media. La constante de absorción (K_a) se calcula por el método de los residuos o de "Feathering" a partir de la gráfica de velocidad de excreción.

Los resultados obtenidos al calcular los parámetros farmacocinéticos por ambos métodos se encuentran descritos en la Tabla XXVII, en dicha Tabla se observa que los parámetros farmacocinéticos como el porcentaje de la cantidad excretada en orina, K_d , K_a , $t_{1/2 K_d}$ y $t_{1/2 K_a}$, están de acuerdo a lo reportado en la literatura (74,75,92,92)

No es conveniente calcular K_a para el voluntario No. 2 debido a que sólo se tienen dos datos (0.5 y 1.0 hs.) en la fase de absorción, por lo cual para determinar adecuadamente la K_a para ampicilina th., es necesario ampliar el horario en la toma de muestras iniciales por lo menos 4 observaciones antes de una hora, lo cual no es posible para muestras urinarias, pero para muestras plasmáticas si es factible.

Figura 17.- Gráfica de velocidad de excreción contra el tiempo después de la administración oral de 250mg. de ampicilina th. (producto innovador) a dos voluntarios sanos.

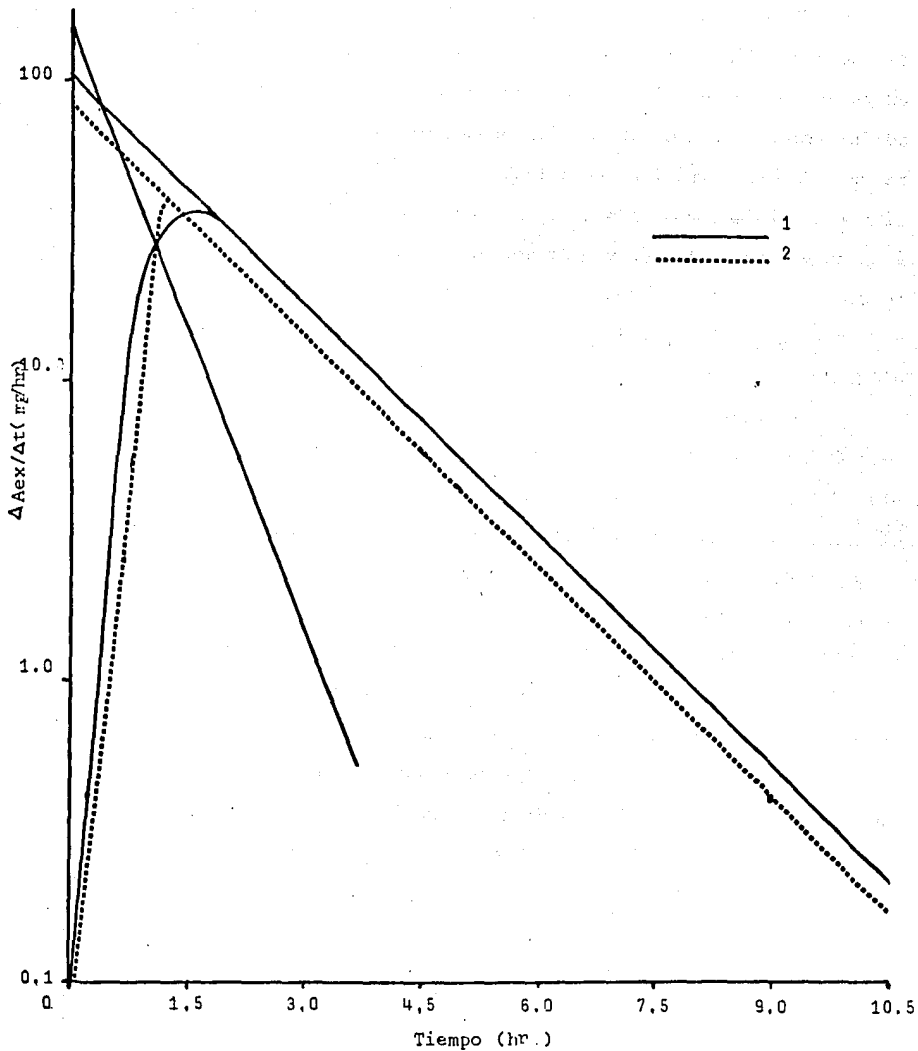


Figura 18.- Gráfica de cantidad remanente por ser excretada contra el tiempo después de la administración oral de 250mg.- de ampicilina th. (producto innovador) a dos voluntarios sanos.

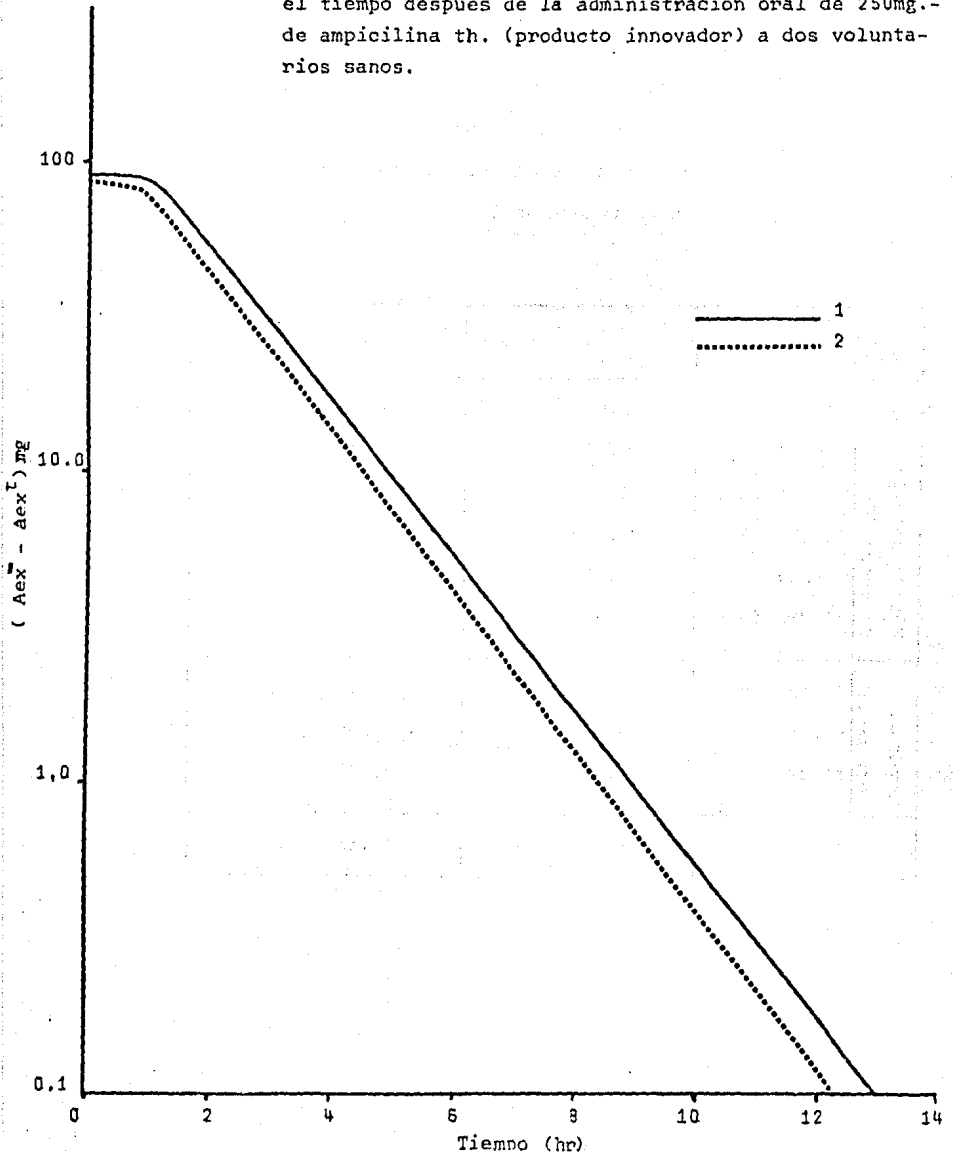


Tabla XXVII. Parámetros Farmacocinéticos obtenidos a partir de datos urinarios, después de la administración oral de 250 mg de ampicilina th. (producto innovador).

Voluntario		1	2
Parámetro F.			
Método de velocidad de excreción	Kd (hr^{-1})	0.580	0.592
	r (Kd)	0.993	0.989
	t1/2Kd (h)	1.19	1.16
	Ka (hr^{-1})	1.528	-
	r (Ka)	0.953	-
	t1/2Ka (hr)	0.453	-
Método de sigma menos	Kd (hr^{-1})	0.569	0.588
	r (Kd)	0.99	0.99
	t1/2Kd (hr.)	1.21	1.17
A_{ex}^{∞}		36.36	33.68

4.3.3.2. Estudio Preliminar II.

Estudio de Bioequivalencia: producto innovador, solución oral y producto del mercado nacional.

Se estudió la biodisponibilidad de ampicilina th., en 6 voluntarios sanos, 3 del sexo masculino y 3 del sexo femenino, seleccionados en base a pruebas clínicas. Los voluntarios recibieron una dosis de ampicilina th. en las presentaciones: (A = solución de 250 mg de ampicilina, B = producto innovador (Polycillin, Bristol Laboratories, Lote H6M17 y C = producto mexicano). El diseño experimental, protocolo y lineamientos seguidos durante el estudio se encuentran descritos en la sección 3.3.3.2.

Las muestras plasmáticas y urinarias colectadas durante el mismo, fueron analizadas de acuerdo al método microbiológico descrito en las secciones 3.3.1.7 y 3.3.2.7 respectivamente.

Los resultados encontrados al seguir el curso temporal de la concentración plasmática de ampicilina contra el tiempo, muestran que tanto la absorción como la eliminación son procesos que pueden ser descritos por una cinética aparente de primer orden.

En las Tablas XXVIII, XXIX y XXX se presentan los datos de concentración plasmática en $\mu\text{g/ml}$, obtenidos a diferentes intervalos de tiempo, para los productos A, B y C de ampicilina th. estudiados. Así como el promedio y desviaciones estándar de los mismos.

En las Figuras 2 0, 2 1, 2 2 y 2 3 se presentan las gráficas

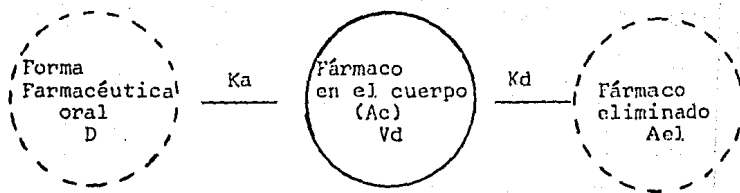
ficas del logaritmo de la concentración plasmática promedio \pm E.S. contra tiempo para los productos A, B y C respectivamente. Se puede observar que estas gráficas presentan un proceso biexponencial, caracterizado por un Modelo Abierto de Un Compartimiento administración de primer orden (Figura 19) en donde la eliminación del fármaco del organismo se lleva a cabo con una constante de eliminación global K_d (la cual se calcula por el método de regresión lineal de mínimos cuadrados) y el fármaco aparece en sangre con una constante de absorción K_a , la cual es calculada por el método denominado "de los residuos" o de "feathering" (80,90).

En base al modelo farmacocinético asumido de un compartimiento (MAUC) se calculan los siguientes parámetros:

- K_d (constante de eliminación)
- K_a (constante de absorción)
- $t_{1/2Kd}$ (tiempo de vida media de eliminación)
- $t_{1/2Ka}$ (tiempo de vida media de absorción)
- C_{pmax} (concentración plasmática máxima)
- t_{max} (tiempo en el que se llega a C_{pmax})
- ABC_0^∞ (area bajo la curva de cero a infinito)
- F (Biodisponibilidad relativa).

En la Tabla XXXI se encuentran los parámetros individua-

Figura 19.- Representación Esquemática del Modelo Abierto de un Compartimiento administración oral.



$$C_p = \frac{K_a F D}{V_d(K_a - K_d)} (e^{-k_d t} - e^{-k_a t})$$

K_a = Constante de absorción de primer orden.

K_d = Constante de eliminación de primer orden.

Tabla XXVIII. Datos de concentración plasmática (mcg/ml) obtenidos después de la administración oral de una solución de ampicilina th. (250 mg) a 5 voluntarios sanos.

Sujeto Tiempo (min)	Concentración plasmática (mcg/ml)					\bar{X}	S	E.S.
	1	2	3	4	5			
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20	1.02	1.01	0.856	0.0	1.76	0.93	0.63	0.28
35	1.52	1.56	1.32	1.07	2.53	1.60	0.55	0.25
45	1.90	1.57	1.33	1.10	2.85	1.75	0.68	0.30
65	2.51	1.58	1.38	1.28	3.07	1.97	0.78	0.35
75	2.50	2.13	1.54	1.99	3.45	2.32	0.72	0.32
95	3.09	1.53	1.98	2.17	3.45	2.43	0.81	0.36
135	2.44	0.84	1.58	1.91	1.98	1.75	0.59	0.26
175	1.07	0.47	1.03	1.65	1.05	1.05	0.48	0.21
235	0.44	0.15	0.40	0.52	0.34	0.37	0.14	0.06
285	0.0	0.0	0.161	0.170	0.0	0.07	0.09	0.04
330	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

\bar{X} = media

S = desv. estándar

E.S. = error estándar

tiempo = minutos

Figura 20.- Gráfica de concentración plasmática promedio vs tiempo después de la administración oral de una solución de ampicilina th. (250 mg) a 4 voluntarios sanos.

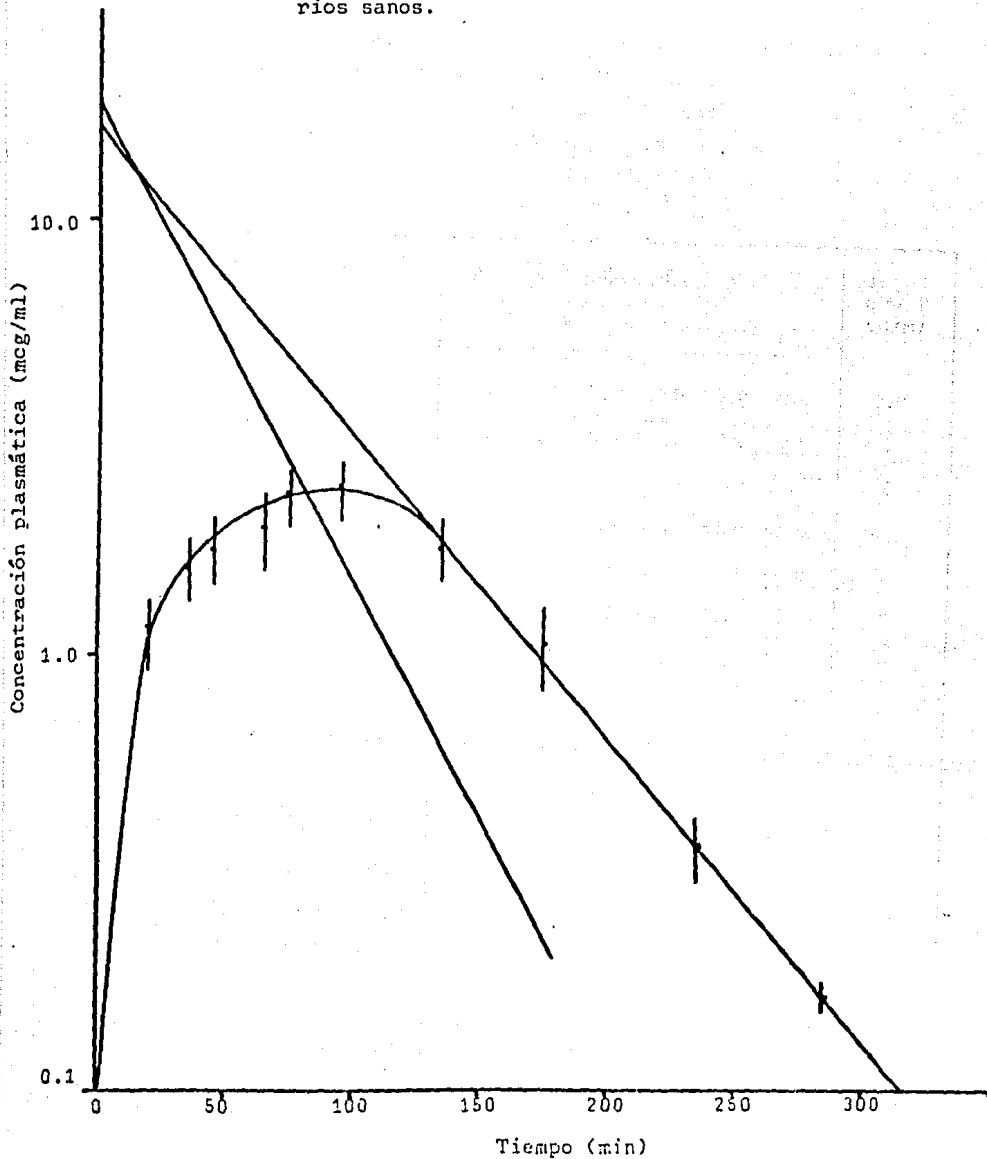


Tabla XXIX. Datos de concentración plasmática obtenidos después de la administración oral de 250 mg del producto innovador de ampicilina th. a 6 voluntarios sanos.

Sujeto Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	\bar{X}	S	E.S.
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	-
20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
35	0.13	0.96	0.0	0.0	0.08	0.58	0.29	0.39	0.16
45	0.19	0.68	0.32	0.33	0.52	NO	0.60	0.61	0.27
65	0.49	1.88	1.32	1.04	2.00	1.65	1.40	0.57	0.23
75	0.57	1.39	1.60	1.04	2.46	1.75	1.53	0.61	0.25
95	0.86	2.57	1.78	2.09	2.34	1.37	1.83	0.67	0.26
135	1.59	1.98	NO	2.85	1.97	1.61	2.00	0.51	0.23
175	1.05	0.39	1.52	2.00	1.08	1.98	1.44	0.47	0.19
235	0.32	0.28	0.72	1.39	0.24	1.54	0.75	0.58	0.24
285	0.16	0.0	0.43	NO	NO	0.75	0.34	0.33	0.16
330	0.11	0.0	0.0	0.48	0.11	0.24	0.16	0.18	0.07
390	0.0	0.0	0.0	0.23	0.0	0.0	0.04	0.09	0.04

\bar{X} = media

S = desv. estándar

E.S. = error estándar

NO = no se tomo muestra.

Figura 2 1.- Gráfica de concentración plasmática vs tiempo después de la administración oral de 250 mg del producto innovador de ampicilina th. a 6 voluntarios sanos.

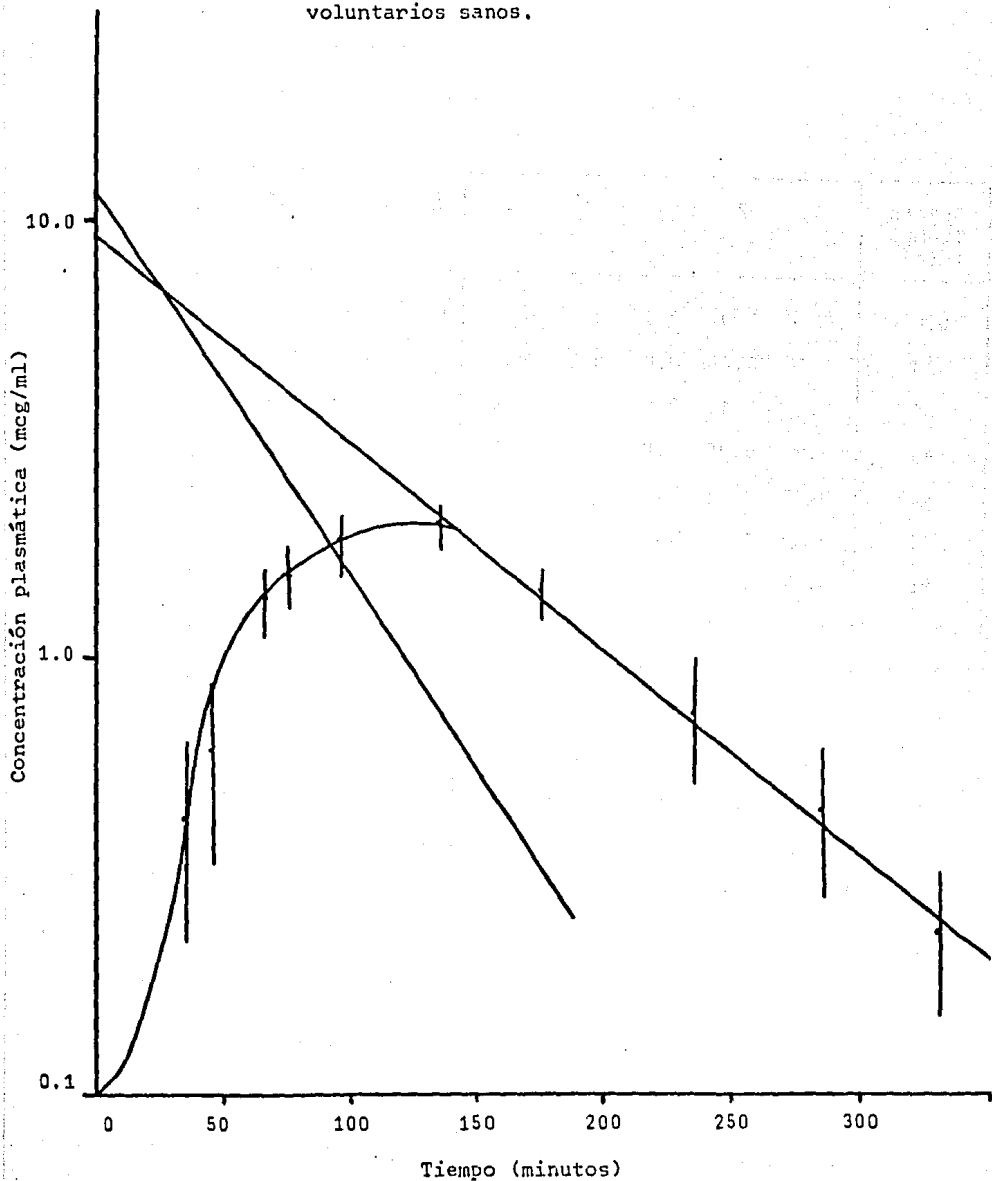


Tabla XXX. Datos de concentración plasmática, obtenidos después de la administración oral de 250 mg del producto mexicano de ampicilina th. a 5 voluntarios sanos.

Sujeto Tiempo (min)	1	2	3	4	5	\bar{X}	S	E.S.
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
35	0.0	0.14	0.0	0.0	0.0	0.03	0.06	0.03
45	0.0	0.25	0.0	0.0	0.34	0.12	0.17	0.07
65	0.36	0.78	0.67	0.033	1.001	0.62	0.30	0.13
75	0.33	1.0	0.86	0.82	1.30	0.86	0.35	0.16
95	0.54	1.31	1.86	1.02	1.04	1.02	0.29	0.13
135	1.29	1.04	1.75	1.46	1.57	1.42	0.27	0.12
175	2.42	1.01	1.46	1.02	1.26	1.43	0.58	0.26
235	1.42	0.78	0.97	0.66	0.30	0.83	0.41	0.18
285	0.73	0.49	NO	0.16	0.10	0.37	0.29	0.15
330	0.18	NO	0.47	0.04	0.0	0.17	0.21	0.11
390	0.0	0.13	0.29	0.0	0.0	0.08	0.13	0.06

\bar{X} = media

X = desv. estándar

E.S. = error estándar

tiempo = minutos

NO = no se tomo muestra

Figura 2 2.- Gráfica de la concentración plasmática vs tiempo después de la administración oral de 250 mg de un producto mexicano de ampicilina th. a 5 voluntarios sanos.

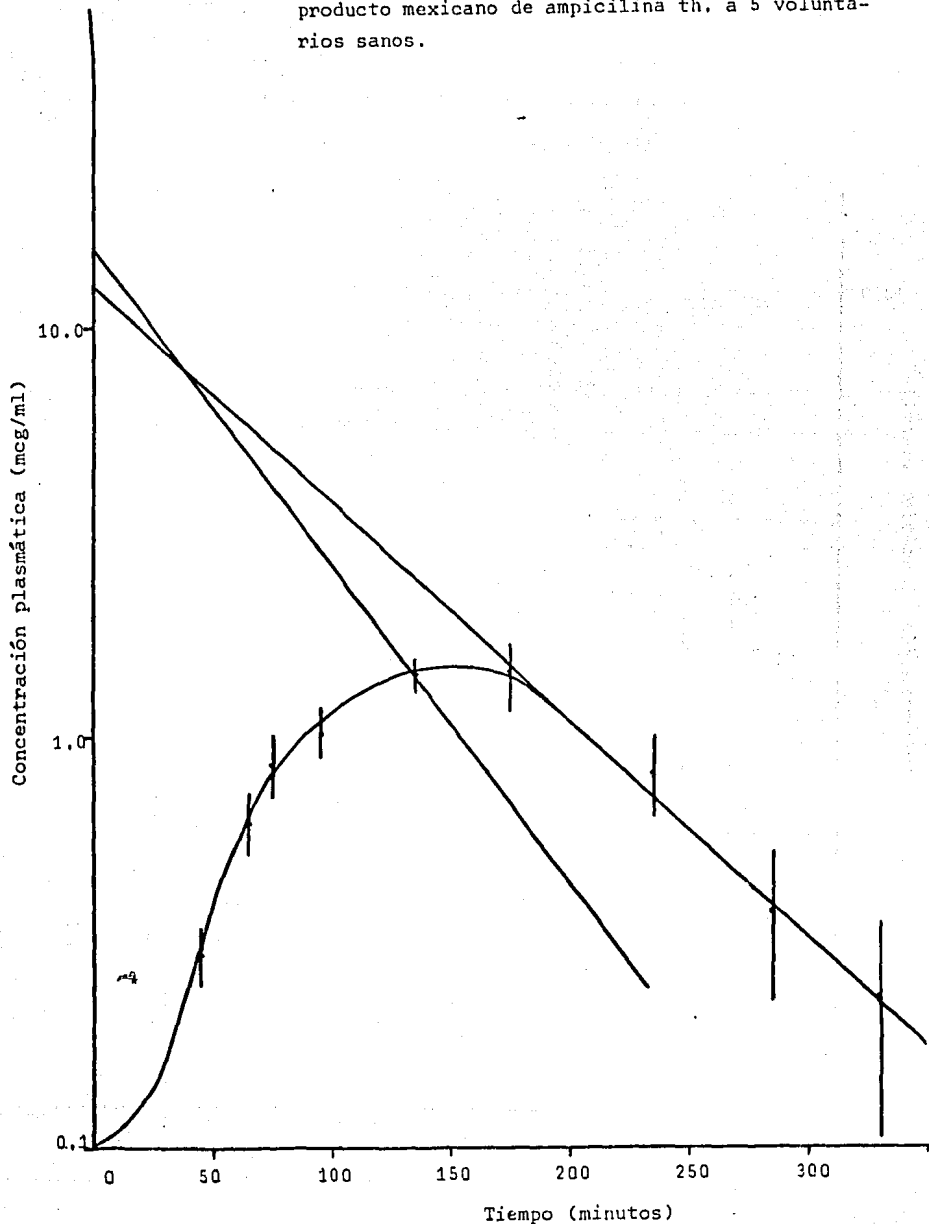


Figura 23.- Gráfica de concentración plasmática promedio \pm ES vs tiempo después de la administración oral de los productos A, B y C de ampicilina th.

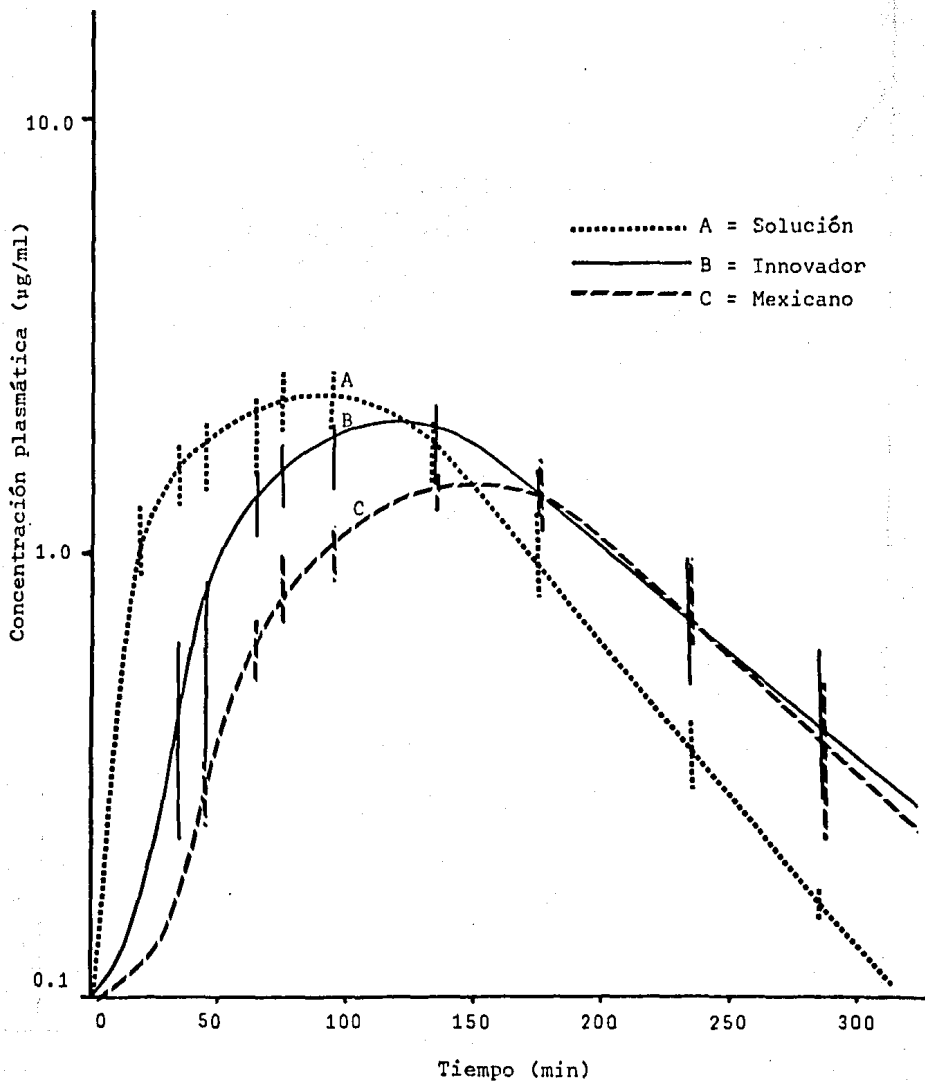


Tabla XXXI. Parámetros Farmacocinéticos obtenidos a partir de datos plasmáticos, asumiendo MAUC administración de primer orden después de la administración de los productos A, B y C. de ampicilina th.

	Solución (A)						P. innovador (B)						P. mexicano (C)						
	1	2	3	4	5	\bar{X} (ES)	1	2	3	4	5	6	\bar{X} (ES)	1	2	3	4	5	\bar{X} (ES)
$K_a \text{ min}^{-1}$	0.030	0.032	0.021	0.025	0.033	0.028 (0.002)	0.019	0.027	0.023	0.019	0.039	0.017	0.024 (0.003)	0.019	0.027	0.020	0.021	0.024	0.022 (0.0014)
$k_d \text{ min}^{-1}$	0.017	0.016	0.015	0.013	0.016	0.015 (0.0025)	0.014	0.016	0.011	0.008	0.015	0.013	0.013 (0.001)	0.014	0.0081	0.0071	0.013	0.018	0.012 (0.0021)
$t_{1/2k_a}(\text{min})$	23.1	21.65	33.0	27.72	21.0	25.29 (2.25)	36.47	25.66	35.47	36.47	17.76	40.76	32.26 (3.55)	36.47	25.66	34.65	33.0	28.87	31.25 (1.83)
$t_{1/2k_d}(\text{min})$	40.76	43.31	46.2	53.30	43.31	45.37 (2.15)	49.5	43.31	63.0	74.51	46.2	53.30	54.97 (4.80)	43.31	85.55	97.60	53.3	28.5	63.65 (11.79)
$C_p \text{ max}$	3.09	2.13	1.98	2.17	3.45	2.56 (0.295)	1.58	2.57	1.77	1.754	2.46	2.85	2.16 (0.214)	2.42	1.31	1.75	1.45	1.56	1.698 (0.194)
$t_{\text{min}}^{\text{max}}$ (min)	95	75	95	75	75	83 (4.89)	135	95	95	75	75	135	101.66 (11.15)	175	95	135	135	135	135.0 (12.64)
ABC_o^{∞}	423.3	233.3	321.0	364.0	470.5	362.5 (41.09)	198.7	327.8	339.5	525.3	328.4	428.4	358.0 (44.88)	370.4	269.5	363.6	211.3	227.8	288.5 (33.42)
ABC_o^{∞}/Kg	7.058	3.58	4.58	5.065	8.71	5.79 (0.92)	3.31	5.04	4.85	7.26	6.08	8.23	5.79 (0.725)	6.17	4.14	5.19	4.06	4.21	4.75 (0.409)

\bar{X} = Promedio

ES = Estándar.

les obtenidos a partir de datos plasmáticos para los voluntarios que participaron en el estudio (asumiendo MAUC, administración oral), después de la administración de los productos A, B y C de ampicilina th.

Los datos urinarios obtenidos en el estudio, son tratados por los métodos de velocidad de excreción ($\Delta A_{ex}/\Delta t$) y Sigma Menos (Σ^-) asumiendo (MAUC). En base a estos métodos se calculan para datos individuales y promedio los parámetros farmacocinéticos: K_a , K_d , $t_{1/2}$ de K_a y $T_{1/2}$ de K_d por el primero y K_d y $t_{1/2}$ de K_d por el segundo.

En las Tablas XXXII, XXXIII y XXXIV se encuentran los datos de cantidad acumulada excretada hasta 24 h. para cada voluntario el valor promedio y la desviación estándar, así como los datos promedio de velocidad de excreción y cantidad remanente para ser excretada para los productos estudiados A, B y C respectivamente.

En las Figuras 24, 25, 26 y 27 se encuentran en papel semilogarítmico, las gráficas de velocidad de excreción urinaria promedio \pm E.S. de los productos A, B y C de ampicilina th. contra el tiempo. A partir de estas gráficas se calculan las constantes de absorción y eliminación, los coeficientes de correlación y tiempo de vida media para datos individuales y promedio.

En la Figura 28 se encuentra la gráfica de cantidad acumulada promedio \pm E.S. de ampicilina excretada en orina para los productos A, B y C estudiados.

Tabla XXXII . Cantidad acumulativa excretada en orina después de la administración oral de una solución de ampicilina th. (250 mg) a 5 voluntarios sanos.

Cantidad acumulativa excretada en orina (mg)

Sujeto Tiempo (hr.)	1	2	3	4	5	\bar{X}	S	E.S.	Σ	$\frac{\Delta A_{ex}}{\Delta t}$	t mid
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	83.83	-	-
0.5	0.0	1.292	8.31	1.759	5.57	3.38	3.44	1.54	80.00	6.76	0.25
1.0	12.46	10.146	29.52	NO	19.03	17.79	8.679	4.33	65.59	27.11	0.75
1.5	24.79	20.08	40.06	20.47	48.09	30.70	12.67	5.66	52.68	25.82	1.25
2.0	38.77	30.35	50.79	27.31	71.05	43.65	17.81	7.96	39.73	25.9	1.75
2.5	57.76	39.40	58.81	38.78	87.36	56.42	19.78	8.84	26.96	25.54	2.25
3.0	65.89	47.36	64.00	53.15	93.43	64.76	17.75	7.93	18.62	16.68	2.75
3.5	75.11	51.14	66.47	61.96	98.48	70.63	17.80	7.96	12.75	11.74	3.25
4.0	81.42	54.07	67.64	64.66	100.86	73.73	18.03	8.06	9.65	6.2	3.75
4.5	84.37	54.37	68.52	65.45	101.25	74.79	18.27	8.17	8.59	2.12	4.25
5.0	86.45	57.79	69.25	68.25	102.07	76.76	17.27	7.81	6.62	3.94	4.75
6.0	88.33	72.11	70.06	70.12	102.44	80.54	14.26	6.37	2.84	3.78	5.5
8.0	90.75	73.80	70.73	73.18	103.45	82.38	14.21	6.35	1.0	0.92	7.0
10.0	91.52	74.42	71.00	74.28	103.91	82.99	14.19	6.34	0.39	0.305	9.0
12.0	91.77	74.54	71.11	75.06	103.91	83.25	14.06	6.52	0.13	0.13	11.0
24.0	91.89	74.54	71.25	75.06	104.15	83.38	14.13	6.30	0.0	0.0	18.0

\bar{X} = media

S = desviación estándar

E.S. = error estándar

Tiempo = horas

NO = no se tomo muestra

Figura 24. Gráfica de velocidad de excreción promedio contra ¹¹⁸ el tiempo después de la administración oral de una solución de ampicilina th (250 mg) a 5 voluntarios sanos.

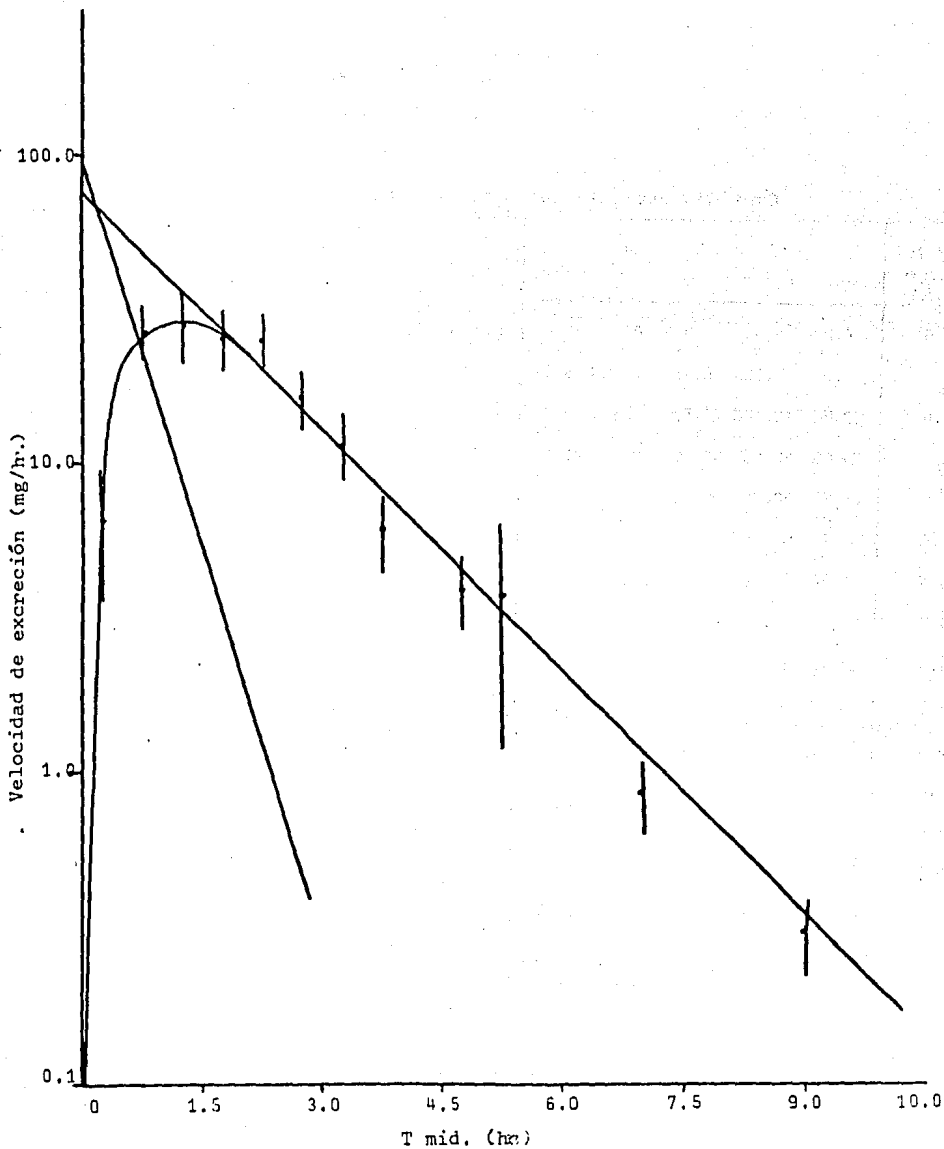


Tabla XXXIII. Cantidad acumulativa excretada en orina después de la administración oral de 250 mg del producto innovador de ampicilina th. a 4 voluntarios sanos.

Cantidad acumulada excretada en orina (mg)

Sujeto tiempo (hr)	1	3	4	5	\bar{X}	S	E.S.	Σ -	$\frac{\Delta A_{ex}}{\Delta t}$	t mid
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	83.53	-	-
0.5	0.0799	0.466	0.065	0.0265	0.159	0.205	0.102	82.37	0.318	0.25
1.0	3.348	5.263	3.055	5.817	4.370	1.374	0.687	78.162	8.42	0.75
1.5	12.18	18.09	11.94	12.54	13.69	2.943	1.471	68.84	18.64	1.25
2.0	26.47	36.04	47.28	25.94	33.93	10.03	5.01	48.59	48.49	1.75
2.5	41.47	53.78	63.01	35.43	48.42	12.36	5.32	34.10	28.97	2.25
3.0	53.31	60.42	72.88	41.68	57.07	13.06	6.53	25.45	17.30	2.75
3.5	63.50	69.00	80.57	48.34	65.35	13.39	6.69	17.17	16.55	3.25
4.0	69.78	73.55	86.31	74.71	71.09	13.00	6.5	11.439	11.47	3.75
4.5	72.96	75.18	90.74	58.72	74.40	13.10	6.55	8.129	6.62	4.25
5.0	75.68	77.11	95.71	62.63	77.78	13.61	6.80	4.74	6.76	4.75
6.0	77.48	79.69	95.89	66.19	79.81	12.24	6.12	2.71	2.03	5.5
8.0	79.47	81.79	96.17	68.64	81.52	11.32	5.66	1.009	0.854	7.0
10.0	80.18	82.66	96.17	69.59	82.15	10.93	5.46	0.378	0.315	9.0
12.0	80.46	82.87	96.17	69.98	82.37	10.77	5.38	0.158	0.110	11.0
24.0	80.46	83.5	96.17	70.49	82.53	10.57	5.28	0.0	0.013	18.0

\bar{X} = Media

S = Desviación estándar

ES = Error estándar

Figura 2 5.- Gráfica de velocidad de excreción promedio contra el tiempo después de la administración oral de 250 mg del producto innovador de ampicilina th. a 4 voluntarios sanos.

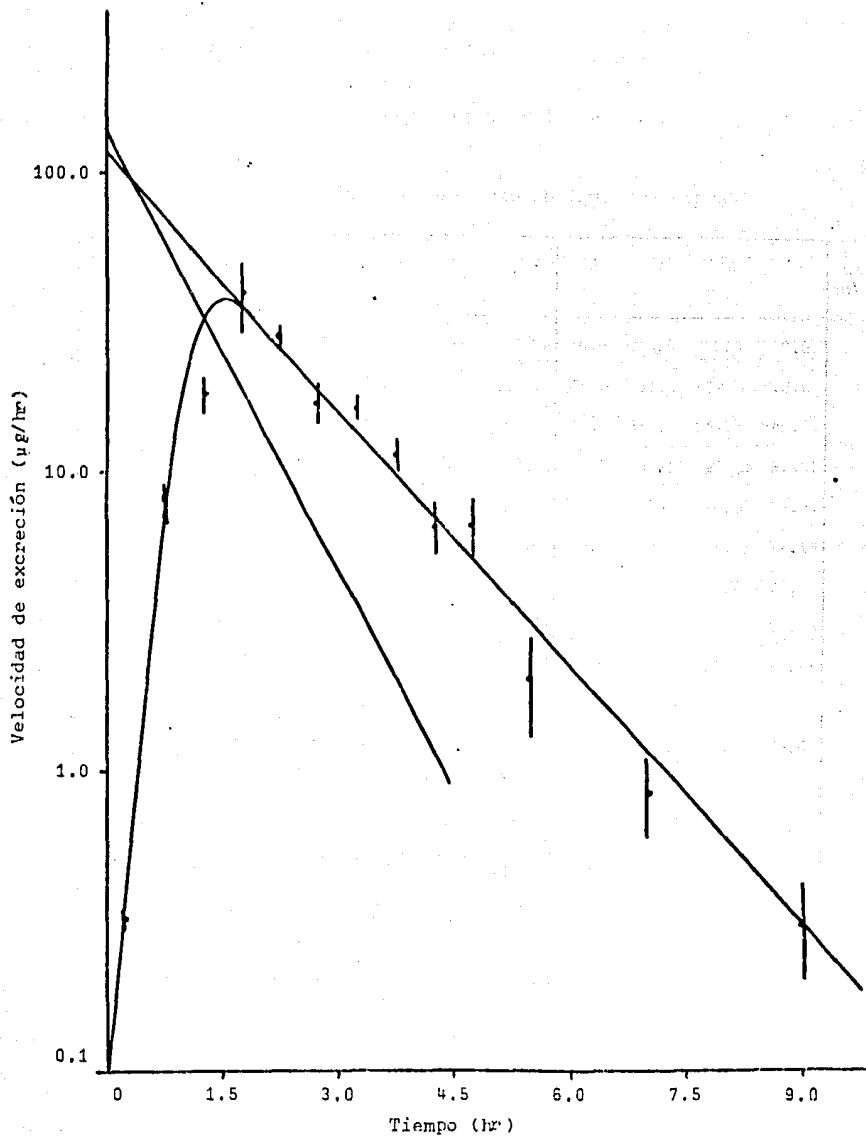


Tabla XXXIV. Cantidad acumulativa excretada en orina después de la administración oral de un producto mexicano de ampicilina th. a 5 voluntarios sanos.

Sujeto tiempo (hr)	1	2	3	4	5	\bar{X}	S	E.S.	t-	$\frac{\Delta A_{ex}}{\Delta t}$	t mid
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	-	57.22		
0.5	-	-	0.168		0.016	0.036	0.073	0.05	57.18	0.073	0.25
1.0	0.116	0.206	1.867	0.311	2.19	0.939	1.00	0.449	56.28	1.80	0.75
1.5	6.02	4.849	7.37	5.57	9.02	5.95	1.06	0.475	51.26	10.03	1.25
2.0	10.33	22.509	11.66	18.90	16.12	15.90	5.03	2.25	41.31	19.90	1.75
2.5	16.95	29.506	13.17	32.13	29.27	24.20	8.52	3.81	33.01	16.60	2.25
3.0	34.55	34.59	23.00	35.24	36.84	32.84	5.58	2.49	24.37	17.28	2.75
3.5	48.25	39.54	30.83	39.90	41.55	40.01	6.21	2.78	17.20	14.34	3.25
4.0	59.37	43.76	35.29	42.79	45.72	45.38	8.76	3.91	11.83	10.73	3.75
4.5	64.20	47.40	40.95	44.22	47.07	48.77	9.00	4.02	8.45	6.76	4.25
5.0	67.68	47.98	45.09	56.02	48.33	53.02	9.14	4.08	4.199	8.50	4.75
6.0	68.37	49.42	49.10	56.93	49.49	54.66	8.34	3.73	2.556	1.64	5.5
8.0	69.03	51.14	53.27	57.45	50.41	56.26	7.64	3.41	0.973	0.80	7.0
10.0	69.22	51.59	54.73	57.52	50.66	56.74	7.47	3.34	0.473	0.241	9.0
12.0	69.34	51.73	54.99	57.52	50.75	56.88	7.50	3.35	0.232	0.070	11.0
24.0	69.88	52.20	55.62	57.52	50.86	57.22	7.56	3.38	0.0	0.027	

\bar{X} = media

S = desv. estándar

E.S. = error estándar.

Figura 2 6.- Gráfica de velocidad de excreción promedio contra el tiempo, después de la administración oral de 250 mg del producto mexicano de ampicilina th. a 4 voluntarios sanos.

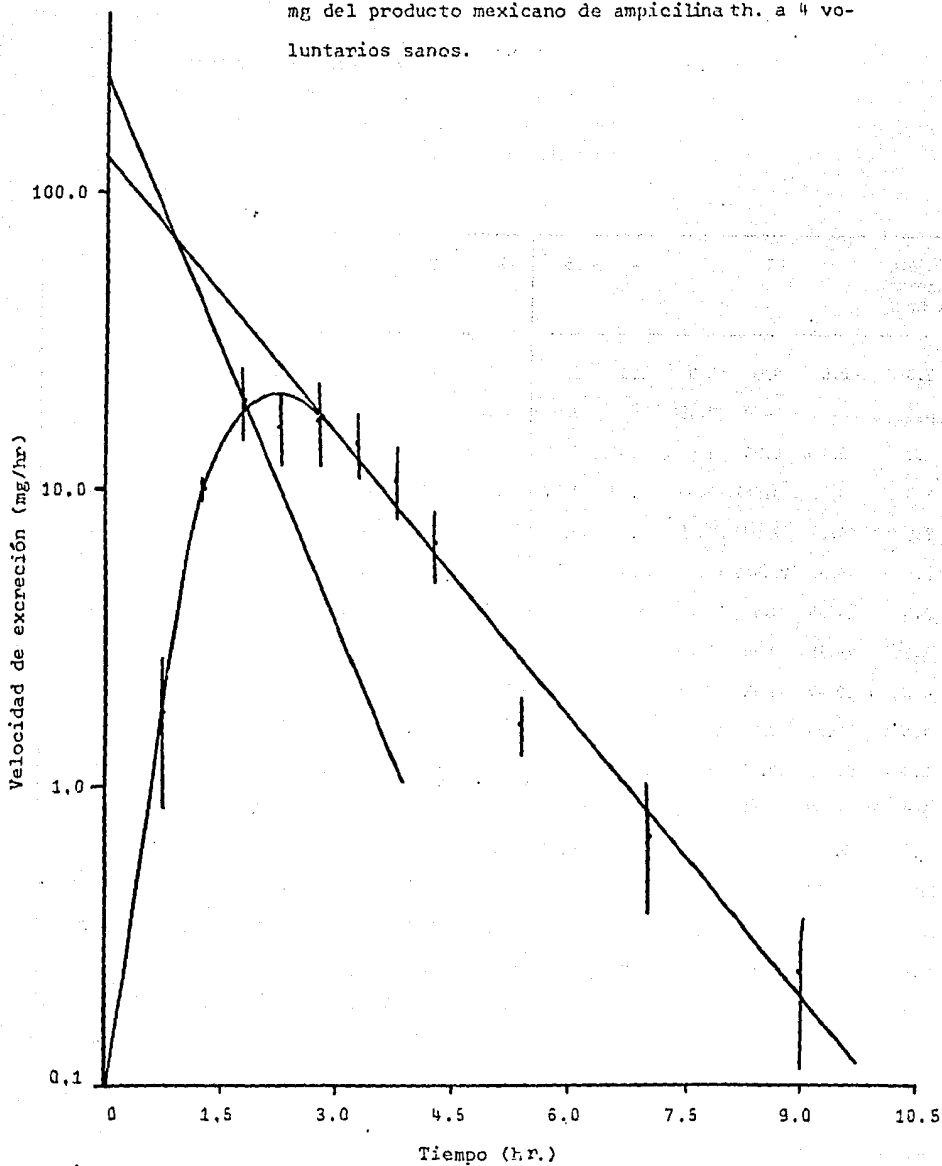


Figura 27.- Gráfica de velocidad de excreción promedio
contra tiempo, obtenida después de la ad-
ministración oral de los productos A, B y C
de ampicilina th.

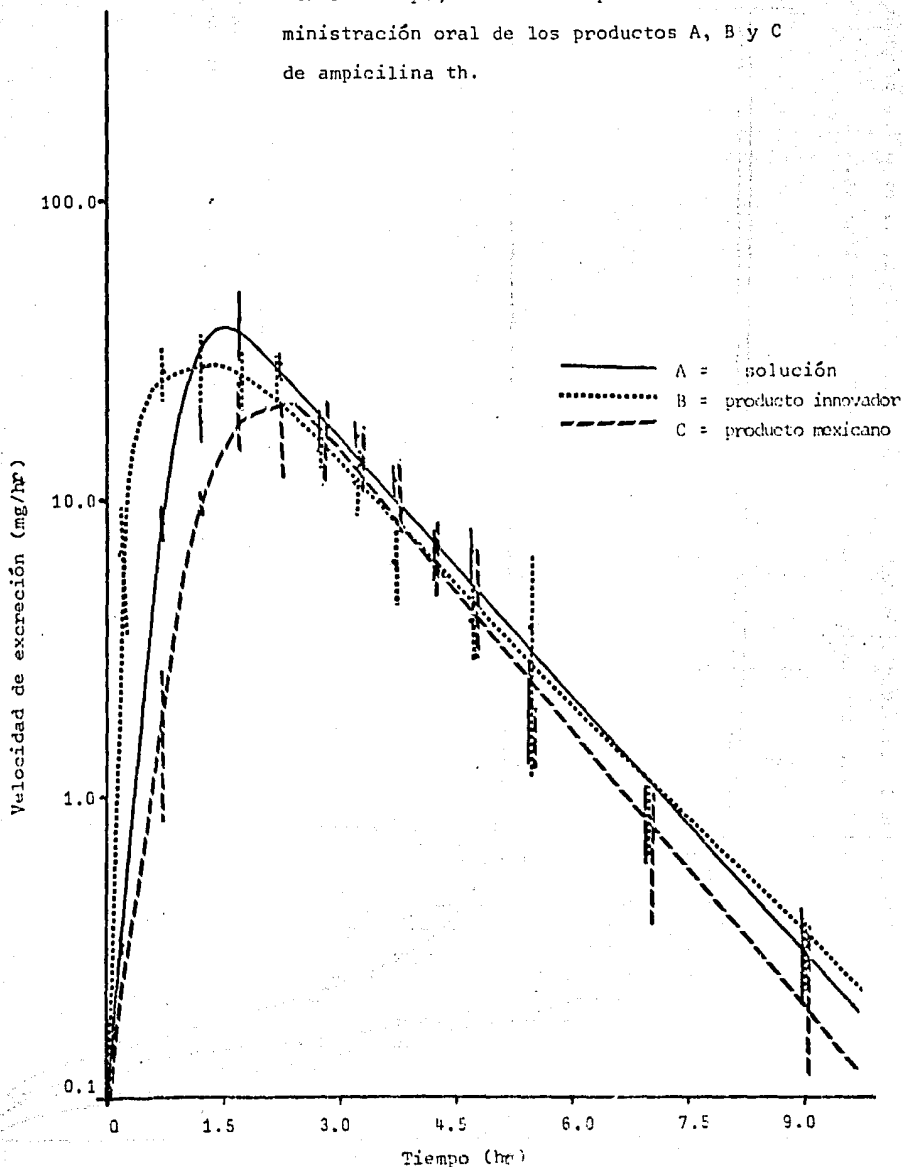
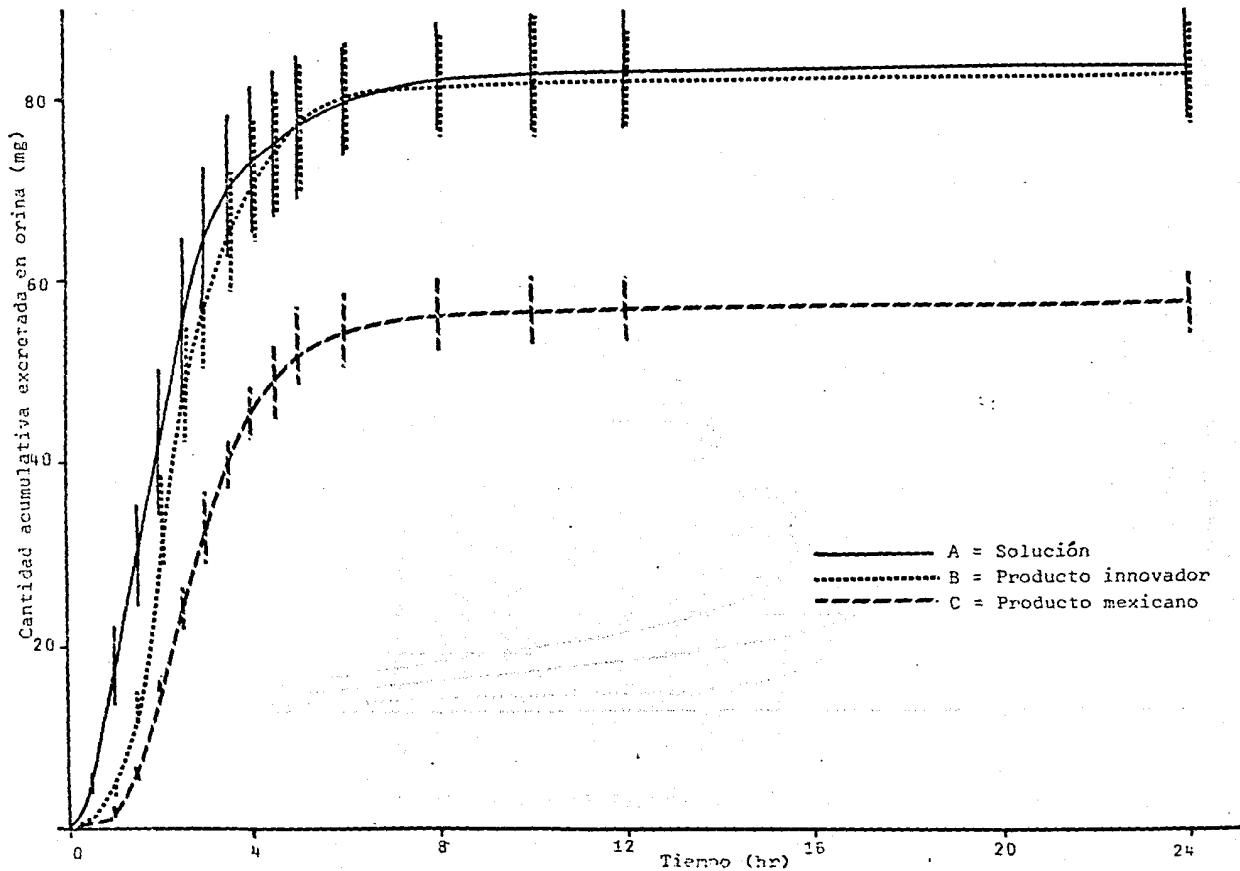


Figura 2 B.- . Gráfica de la cantidad acumulada excretada promedio (\pm E.S.) en orina después de la administración de los productos A, B y C de ampicilina th.



En la Figura 29 se grafica la cantidad remanente promedio \pm E.S. de ampicilina th. (productos A, B y C) por ser excretada contra el tiempo. En esta gráfica se calcula por el método de regresión lineal de mínimos cuadrados la constante de eliminación (K_d) el coeficiente de correlación y la vida media, tanto para datos individuales como promedio. En los apéndices VI y VII se encuentran los datos individuales de velocidad de excreción y sigma menos, así como el promedio y error estándar de los mismos, después de la administración oral de los productos A, B y C de ampicilina th.

Los resultados obtenidos al calcular estos parámetros, utilizando tanto el método de velocidad de excreción como de sigma menos, se encuentran reportados en la Tabla XXXV para datos promedio y XXXVI para datos individuales.

Se observa en estas Tablas que por los dos métodos se obtienen datos Farmacocinéticos semejantes para los productos de ampicilina th. estudiados, los cuales están de acuerdo a los parámetros reportados en la literatura

Figura 29.- Gráfica de la cantidad remanente por ser excretada promedio vs tiempo después de la administración oral de los productos A, B y C de ampicilina th.

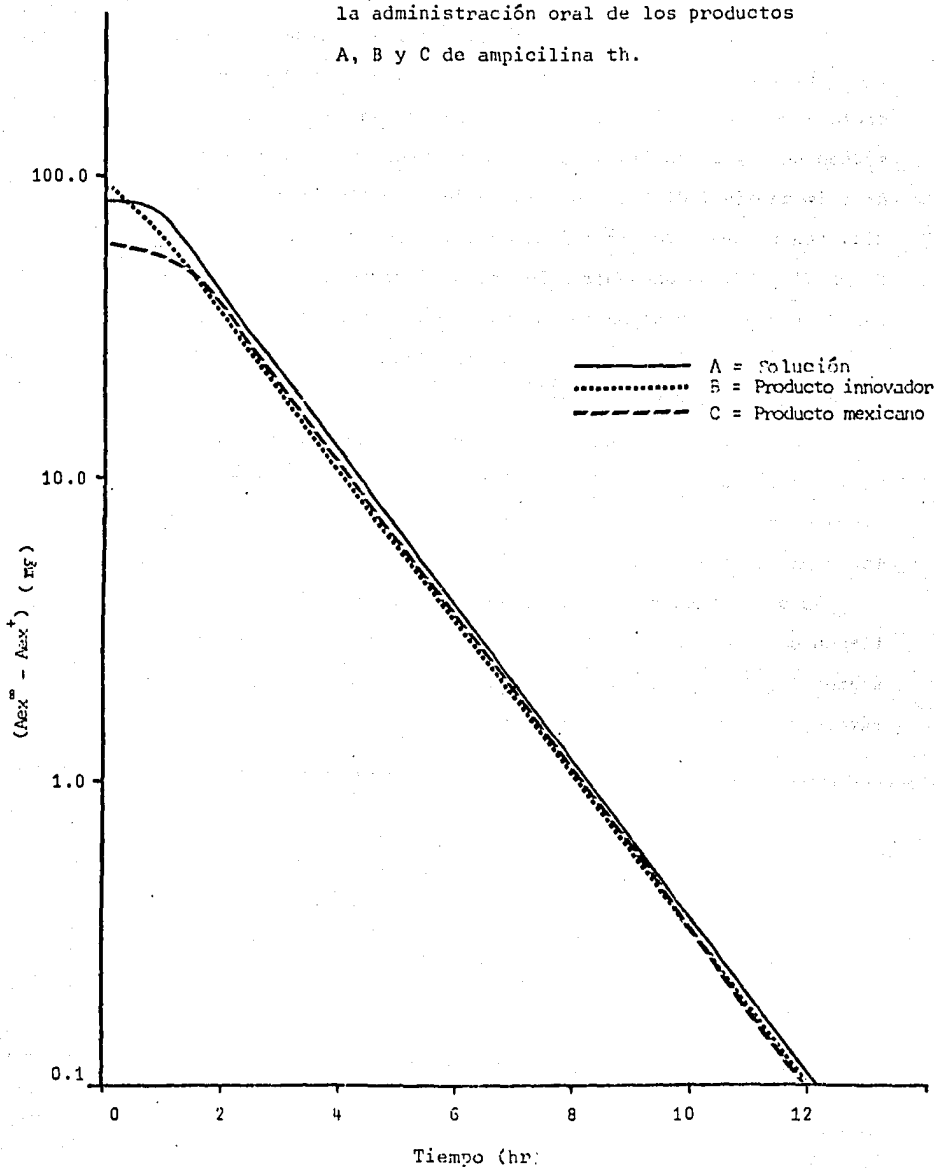


Tabla XXXV. Parámetros Farmacocinéticos obtenidos a partir de datos urinarios promedio después de la administración de los productos A, B y C. de ampicilina th.

Producto Parámetros		Solución A	Innovador B	Mexicano C
Método de velocidad de excreción	Pendiente de la recta final (β hr ⁻¹)	0.601	0.658	0.721
	Coefficiente de correlación de β	0.994	0.993	0.991
	Tiempo de vida media ($t_{1/2}^{\beta}$ min)	1.15	1.05	0.961
	Constante de ab- sorción K_a , hr ⁻¹)	1.859	1.106	1.436
	Coefficiente de corre- lación de K_a	0.999	0.994	0.990
	Tiempo de vida media de K_a ($t_{1/2}^{K_a}$, min)	0.374	0.626	0.482
Método de Sigma menos	Pendiente de la recta (β , hr ⁻¹)	0.581	0.591	0.584
	Coefficiente de correlación de β	0.997	0.994	0.990
	Tiempo de vida media ($t_{1/2}^{\beta}$ hr ⁻¹)	1.19	1.17	1.18

Tabla XXXVI. Parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de datos urinarios individuales, después de la administración oral de 250 mg de los productos A, B y C de ampicilina th.

Parámetros Farmacocinéticos	Solución (A)						P. innovador (B)					P. mexicano (C)						
	1	2	3	4	5	\bar{X} (ES)	1	3	4	5	\bar{X} (ES)	1	2	3	5	6	\bar{X} (ES)	
Método de Velocidad de excreción	r(Kd)	0.986	0.902	0.995	0.889	0.955	0.021	0.986	0.982	0.936	0.991	0.012	0.941	0.974	0.991	0.989	0.982	0.009
	Kd(hr ⁻¹)	0.635	0.738	0.800	0.466	0.717	0.300	0.644	0.616	0.640	0.547	0.022	0.816	0.644	0.585	0.731	0.898	0.056
	t1/2Kd(hr)	1.091	0.939	0.866	1.487	0.966	1.110	1.07	1.12	1.08	1.26	0.043	0.848	1.076	1.18	0.948	0.771	0.074
	r(Ka)	0.989	0.988	-	0.937	-	0.017	0.967	0.974	0.994	0.993	0.491	0.997	0.981	0.996	0.995	0.992	0.002
	Ka(hr ⁻¹)	1.60	1.878	-	1.43	-	0.133	1.53	1.62	0.954	0.984	0.636	1.002	0.995	0.768	1.262	1.16	0.083
	t1/2Ka(hr)	0.433	0.369	-	0.488	-	0.43	0.452	0.427	0.726	0.704	0.079	0.691	0.696	0.881	0.548	0.594	0.057
	r(Kd)	0.997	0.966	0.980	0.987	0.964	0.006	0.995	0.987	0.993	0.995	0.001	0.942	0.980	0.999	0.988	0.915	0.015
Método de Sigma menos	Kd(hr ⁻¹)	0.598	0.670	0.60	0.605	0.639	0.014	0.652	0.523	0.819	0.508	0.072	0.636	0.523	0.519	0.660	0.859	0.061
	t1/2Kd(hr)	1.15	1.03	1.15	1.14	1.08	0.023	1.062	1.325	0.846	1.36	0.120	1.08	1.17	1.35	1.05	0.806	0.088
	Aex ^o (%)	36.75	29.81	28.5	30.02	41.66	32.49	31.1	33.4	38.4	28.1	33	27.95	20.88	22.24	20.34	23.0	22.88
							1.22					2.12						1.35

" CAPITULO V "

CAPITULO V

V. Discusión.

A continuación se discutirán los resultados obtenidos en cada una de las secciones anteriormente presentadas.

5.1. Pruebas de Control Farmacéutico.

Las pruebas de control farmacéutico realizadas en los catorce productos de ampicilina th., previas al estudio de bio-equivalencia fueron para establecer si estos medicamentos eran farmacéuticamente equivalentes, al cumplir con las especificaciones de las pruebas de control establecidas por la B.P. (1).

La B.P. especifica que las cápsulas de ampicilina deben contener no menos del 92.5% ni más del 107.5% de la cantidad indicada en el marbete de ampicilina th, consecuentemente los productos CM, DM, FM, KM y MM no cumplen con las especificaciones, ya que el contenido determinado fué de 82.5, 91.16, 87.1, 88.48 y 90.13% de ampicilina th. respectivamente (Tabla VIII). Para confirmar lo anterior, se realizó un análisis individual de contenido, en tres cápsulas de cada producto, observándose un valor inferior al 92.5% en los productos CM, DM, FM, HM, IM, JM, KM, LM y MM, en donde el porcentaje mínimo fué de 67.59, 84.0, 86.48, 85.7, 89.5, 89.86, 88.48, 82.2 y 88.28 respectivamente. Respecto a la prueba de desintegración para cápsulas de ampicilina th. La USP-XX y B.P. no estipulan ningún tipo de límite, por lo que no es posible establecer cuales productos es-

tán fuera de los límites oficiales. Sin embargo al hacer una comparación entre los datos, se observa que no hay diferencias significativas en el tiempo de desintegración de los trece productos de ampicilina th. estudiados respecto al producto innovador.

De esta manera, de trece productos farmacéuticos estudiados del mercado nacional, los productos AM, EM, FM, GM y KM cumplen satisfactoriamente con las especificaciones de la B.P., por lo que estos medicamentos son farmacéuticamente equivalentes. Los productos HM, IM, JM y LM oficialmente pueden considerarse como equivalentes farmacéuticos, aunque en su variación de contenido ^{cápsula presentó} alguna ↓ un valor inferior al límite especificado del 92.5%. Los productos restantes CM, DM, FM, KM y MM no cumplen con el requisito de contenido especificado por la B.P. por lo tanto no son medicamentos farmacéuticamente equivalentes, lo cual se confirma al realizar el análisis de contenido en tres cápsulas en forma individual, el resultado indica que los lotes de estos productos deberían ser retirados del mercado nacional.

5.2. Estudios in vitro.

5.2.1. Determinación cuantitativa de ampicilina th. en HCl

0.1N y agua destilada.

La determinación de ampicilina th. en HCl 0.1N y agua destilada por el método espectrofotométrico de la B.P., mostró una linealidad satisfactoria entre las concentraciones de 4 a 24 mcg/ml con un coeficiente de correlación de 0.999 ($p <$

0.001) para los dos medios de disolución (ver Figuras 8 y 9) y un coeficiente de variación entre 0.12 a 1.6% para HCl 0.1N y 0.25 a 1.9% para agua destilada en el intervalo de concentración estudiado (Tabla XVI).

El método se evaluó considerando la reproducibilidad de las determinaciones de diferentes concentraciones de ampicilina th. preparadas el día de la determinación y en diferentes días. Se efectuó un análisis estadístico de varianza, que indica que no existe variación significativa en las determinaciones en diferentes días para las concentraciones de 4, 8, 12, 16, 20 y 24 mcg/ml. Mediante una prueba de T entre pendientes se encontró que no hay diferencias significativas entre ellos, a un nivel de significancia de $p < 0.05$, tanto en HCl 0.1N como en agua destilada.

Lo cual indica que el método de la B.P. es confiable, reproducible y aplicable a pruebas de disolución de ampicilina en las condiciones aquí propuestas.

5.2.2. Perfil de disolución de catorce productos de ampicilina th. cápsulas de 250 mg.

Actualmente la prueba de disolución para cápsulas de ampicilina th. no está considerada como una prueba oficial por la USP-XX⁽⁸⁸⁾ a la B.P. ⁽¹¹⁾, por lo que no existen especificaciones al respecto. Sin embargo se puede efectuar un análisis estadístico y establecer si el comportamiento de disolución varía significativamente o no entre los productos

de ampicilina th. estudiados.

En la Tabla XXXVII se presentan los resultados obtenidos al efectuar un análisis de varianza con respecto a la cantidad disuelta a todos los tiempos (5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 min) para los catorce productos estudiados en los 2 medios de disolución.

En el análisis de varianza se observa que hay diferencias estadísticamente significativas a todos los tiempos de muestreo entre los productos en los dos medios de disolución, y que estas diferencias a 30, 45 y 60 minutos son mayores en agua, lo cual sugiere que en agua destilada se puede discernir mejor el comportamiento de disolución para cápsulas de ampicilina th.

La diferencia en la disolución del producto AM, resultó en una diferencia biodisponibilidad, existiendo también en la posibilidad de encontrar diferencias en la biodisponibilidad del producto FM.

En base a los datos mostrados en la Tabla XVIII se calculan las constantes de disolución a partir de la gráfica del logaritmo de la cantidad remanente por disolverse (para los primeros 5 tiempos de muestreo, 5, 10, 15, 20 y 30 min) contra el tiempo. En estas gráficas (Figura 30) se observa claramente que existe variación en el comportamiento de disolución. En la Tabla XXXVIII se reportan las constantes de disolución y el coeficiente de correlación para cada producto estudiado de ampicilina th. en agua destilada. Los productos JM y AM presentan las constantes de disolución máxima y mínima de 0.19 y 0.019 min^{-1} respectivamente.

Tabla XXXVII . Análisis estadístico de varianza de la cantidad disuelta de ampicilina th. (cápsulas de 250 mg) a diferentes intervalos de tiempo en dos medios de disolución.

Dato estadístico	TSS	TrSS	ESS	DF ₁	DF ₂	DF ₃	TrMS	FMS	Fcal	Nivel de Significancia	
HCl 0.1 N	5	351521.9	283706.7	67815.2	13	70	83	21823.6	968.8	22.53	p<0.05 [*]
	10	284627.3	268251.9	16375.3	13	70	83	20634.7	233.9	88.21	p<0.05 [*]
	15	233616.7	220482.6	13134.1	13	70	83	16960.2	187.6	90.39	p<0.05 [*]
	20	189551.2	176758.6	12792.6	13	70	83	13595.8	182.7	74.4	p<0.05 [*]
	30	90128.5	78996.3	11132.2	13	70	83	6076.64	159.0	38.21	p<0.05 [*]
	45	76029.7	65667.4	10362.2	13	70	83	5051.3	148.0	34.12	p<0.05 [*]
	60	72460.2	63313.7	9146.5	13	70	83	4870.3	130.6	37.27	p<0.05 [*]
Agua Destilada	5	179243.8	122595.1	56648.7	13	70	83	9430.4	845.5	11.15	p<0.05 [*]
	10	239301.0	144612.4	94688.7	13	70	83	11124.0	1352.7	8.22	p<0.05 [*]
	15	192004.9	148931.1	43073.8	13	70	83	11456.2	615.34	18.62	p<0.05 [*]
	20	165653.3	143106.2	22547.1	13	70	83	11008.2	322.1	34.18	p<0.05 [*]
	30	177530.7	164933.6	12697.1	13	70	83	12679.51	181.39	69.90	p<0.05 [*]
	45	136299.4	125587.3	10712.3	13	70	83	9650.6	153.0	63.13	p<0.05 [*]
	60	134358.5	123414.7	10943.7	13	70	83	9493.4	156.3	60.42	p<0.05 [*]

TSS = Suma total de cuadrados

TrSS= Tratamiento de la suma de cuadrados

ESS = Error de suma de cuadrados

DF₁ = Tratamiento de los grados de libertad

DF₂ = Error de los grados de libertad

DF₃ = Total de los grados de libertad

TrMS = tratamiento cuadrático medio

FMS = Error cuadrático medio

Fcal = Relación de F calculada

* = Si hay diferencias significativas

Figura No. 3 0.- Cantidad remanente para disolverse de los catorce productos de ampicilina th. en agua destilada.

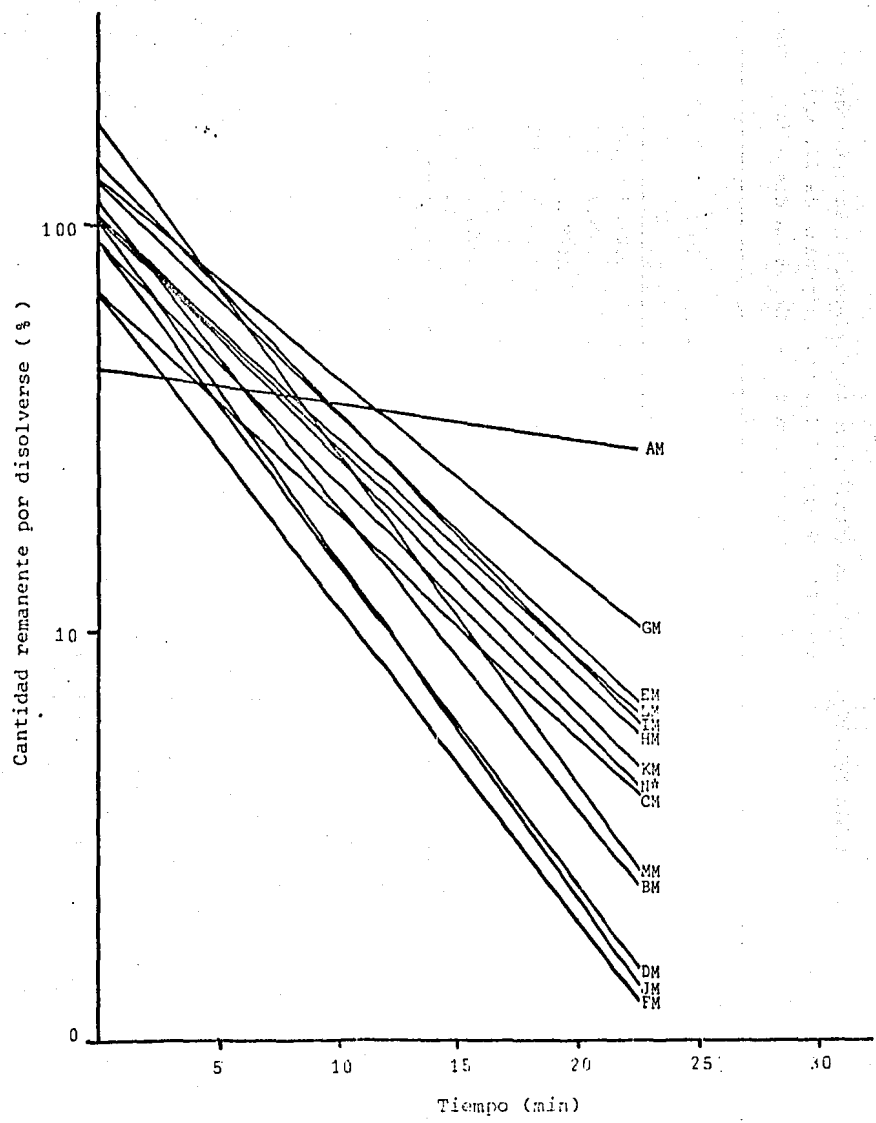


Tabla XXXVIII. Constante de velocidad de disolución
de los catorce productos de ampicilina
th. en agua destilada.

Método de cantidad remanente por disolverse		
Producto	K (1er. orden)	r
AM	0.019	0.986
BM	0.170	0.992
CM	0.125	0.986
DM	0.181	0.994
EM	0.130	0.978
FM	0.179	0.998
GM	0.111	0.970
HM	0.129	0.996
IM	0.140	0.969
JM	0.190	0.998
KM	0.138	0.991
LM	0.123	0.996
MM	0.186	0.926
N*	0.136	0.996

K = constante de disolución (min^{-1})

r = coeficiente de correlación

* = producto innovador

No se encontró correlación entre las pruebas de disolución y desintegración en los productos estudiados.

5.3. Estudios in vivo: Biodisponibilidad de ampicilina th. en humanos.

5.3.1. Determinación de ampicilina th. en plasma y orina.

La determinación de ampicilina th. en plasma y orina se realizó empleando un método microbiológico de sensidisco-placa, en el cual se utilizo B. subtilis como microorganismo de prueba.

El método mostró una linealidad satisfactoria entre las concentraciones de 0.25 a 50 mcg/ml con un coeficiente de correlación de 0.998 ($p < 0.01$) tanto en plasma como en orina (ver Figuras 12 y 14) y el coeficiente de variación en la repetibilidad del método fué de 2.5 a 0.694 por ciento para plasma y de 3.39 a 0.699 por ciento para orina, para las concentraciones de 0.25 y 50 mcg/ml respectivamente (Tablas XIX y XXIII).

La reproducibilidad del método se evaluó con los datos de las Tablas XX y XXIV, encontrándose un coeficiente de variación de 11.67 a 6.95 por ciento para plasma y de 3.86 a 6.12 por ciento para orina en el intervalo de concentraciones de 0.25 a 50.0 mcg/ml. La reproducibilidad y la repetibilidad son de magnitud diferente debida a que los valores del coeficiente de variación en determinaciones realizadas en diferentes días son mayores a los valores de determinaciones realizadas el mismo días. Por lo que es aconsejable hacer una curva patrón cada día de trabajo para aumentar la precisión del método ana

lítico.

El método demostró ser específico para ampicilina th. siempre y cuando no se administre otro antibiótico durante el estudio, que es el caso de la presente investigación, debido a que los metabolitos de la ampicilina, el ácido penicilánico y el ácido penicilóico resultaron ser biológicamente inactivos, por lo que el método microbiológico puede utilizarse con la seguridad de que estos metabolitos no interfieren en el análisis cuantitativo de ampicilina th. en plasma y orina.

El estudio de estabilidad mostró que la ampicilina en fluidos biológicos (plasma y orina), a una concentración de 30 mcg/ml, se degrada un 4% en plasma y un 5% en orina en cuatro horas a temperatura ambiente y a una temperatura de -10°C se degrada un 8% en plasma y un 10% en orina en 21 días (ver Figuras 13 y 14). En este estudio no se determinó el orden de la reacción debido a que no se cuantificó la ampicilina hasta el 75% de degradación, que es el porcentaje necesario para calcular adecuadamente el orden de ^{una} reacción, ya que el propósito de este estudio no fué establecer el orden de reacción sino observar el porcentaje de degradación en el tiempo de trabajo, evitando de esta manera error en la determinación de ampicilina por almacenamiento prolongado de las muestras plasmáticas y urinarias.

Las muestras colectadas durante los estudios fueron analizadas de 24 a 48 horas después de su obtención y no estuvieron expuestas más de 4 horas a temperatura ambiente mientras se llevaba a cabo el análisis de las mismas, lo que asegura una pérdida de potencia, menor al 5% en todos los casos.

5.3.2. Estudios Preliminares de Biodisponibilidad.

5.3.2.1. Estudio Preliminar I: Administración oral de ampicilina th.

Con el objeto de establecer un horario adecuado para la toma de muestras y conocer si la concentración de las muestras urinarias desconocidas caían dentro del intervalo de concentraciones de la curva patrón, se administró una dosis oral de 250 mg del producto innovador (Pollicylin de Bristol, Lote HGM17) a dos voluntarios sanos. Los datos obtenidos de la cantidad excretada de ampicilina th. en orina (Tabla XXVII), fueron tratados por los métodos de velocidad de excreción y sigma menos^(89,90), asumiéndose modelo abierto de un compartimiento (MAUC) para la administración oral de ampicilina th. En la literatura se encuentra reportado^(89,90,91) que la ampicilina después de una administración intravenosa, se comporta de acuerdo a un modelo abierto de dos compartimientos (MADC), sin embargo debido a que la fase de distribución a termina antes de una hora no es posible caracterizar dicha fase cuando la administración es de tipo oral y menos con datos urinarios, razón por la cual, es más adecuado hacer los calculos farmacocinéticos asumiendo MAUC en lugar del correspondiente MADC, después de la administración oral de ampicilina th.^(89,90).

Los datos encontrados en las muestras urinarias estuvieron dentro del intervalo de la curva patrón y concuerdan con los datos reportados en la literatura para muestras plasmáticas obte-

nidas después de una administración oral de 250 mg de ampicilina th. (74,85,92,93,94). Por esta razón no fué necesario modificar el intervalo establecido (0.25 - 50 mcg/ml) en las curvas patrón de ampicilina th. en plasma y orina.

Al revisar en la literatura los horarios propuestos para en los estudios de biodisponibilidad la toma de muestras biológicas después de la administración oral de ampicilina th. encontramos que para la toma de muestras sanguíneas diversos autores proponen los siguientes horarios: Whyatt⁽⁸⁵⁾ y Ebert⁽⁹⁵⁾ 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0 y 8.0 hr. Jusko⁽⁷⁴⁾ 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0 y 8.0 hr. Mayersohn⁽⁹⁴⁾ 0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 5.0 y 7.0 hr. Welling⁽⁹²⁾ 20, 40 min, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0 y 8.0 hr., etc., de estos autores sólo Welling toma muestras de orina al mismo tiempo que las muestras sanguíneas, pero colectando toda la orina excretada durante 8 horas y analizándola de una manera global como una sola muestra para conocer el porcentaje total de ampicilina excretado en orina en 8 horas.

Considerando los resultados encontrados en el presente estudio, el horario establecido para la toma de muestras urinarias de 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 y 24 horas es adecuado respecto al número de datos obtenidos en la fase de eliminación, estos permiten calcular adecuadamente K_d , sin embargo para calcular correctamente K_a faltan datos en la fase de absorción, por lo cual es necesario aumentar el número de tomas iniciales. Sin embargo en las muestras urinarias no es posible coleccionar orina a inter

valos menores de 30 min., pero si es posible determinar con precisión K_a a partir de datos plasmáticos, tomando 5 muestras sanguíneas antes de alcanzar la concentración plasmática máxima (cp max) de 1.5 a 2.0 horas, por lo cual se propuso para la toma de muestras sanguíneas en el estudio de bioequivalencia el siguiente horario: 20, 35, 45, 65, 75, 95, 135, 175, 235, 285, 330 y 390 min.

Gairod⁽⁷⁹⁾, Klein⁽⁹⁶⁾ y Goodman⁽⁷⁵⁾, reportan que el 30% de una dosis oral de ampicilina es recobrada en orina a 6 a 8 hr., Bunn⁽⁹⁷⁾ mencionan que el 25% de una dosis oral se excreta en 8 hr. Jusko⁽⁷⁴⁾ reporta que se excreta del 17 al 63% de ampicilina - inalterada en orina después de una dosis oral. Los datos reportados por estos autores concuerdan con el porcentaje obtenido de 33.6 y 36.3 en los dos voluntarios, para la cantidad de ampicilina excretada inalterada en orina después de la administración de 250 mg por vía oral.

Se encontró que el valor para la vida media de eliminación obtenida a partir de datos urinarios fué semejante al utilizar los 2 métodos; 1.17 hs. por el de velocidad de excreción y 1.21 hr. por el de sigma menos, este valor concuerda con lo reportado por Jusko⁽⁷⁴⁾ ($t_{1/2}$ 1.1 a 1.3 hr.).

5.3.2.2. Estudio Preliminar II.

Estudio de bioequivalencia; producto innovador, solución oral y producto del mercado nacional.

Se estudió la bioequivalencia de ampicilina th. en sus tres presentaciones: A (Solución de 250 mg de ampicilina th.,

B (producto innovador Pollycillin, Bristol Lab., Lote H6M17) y C (producto mexicano de baja disolución), colectándose tanto muestras plasmáticas como urinarias.

En el presente estudio se siguió el diseño cruzado, descrito en la Tabla XIII, con el objeto de disminuir la varianza entre voluntarios usando cada voluntario como su propio control.

Se seleccionó para el estudio de bioequivalencia el producto mexicano designado en la Tabla IX con la letra "AM", debido a que era un producto farmacéuticamente equivalente al producto innovador, o sea que cumplía con las especificaciones de la B.P. pero mostraban un perfil de disolución muy bajo (Figura X y XI). Con estas características se consideró que este producto tenía un potencial elevado para presentar una biodisponibilidad baja.

En base al MAUC se calcularon los parámetros farmacocinéticos (K_d , $t_{1/2} K_d$, K_a , $t_{1/2} K_a$, t_{max} , $C_p max$ y ABC_0^{∞}) a partir de datos plasmáticos, y (K_d , $t_{1/2} K_d$, K_a , $t_{1/2} K_a$ y Aex^{∞}) a partir de datos urinarios.

Los datos obtenidos para K_d , $t_{1/2} K_d$ y Aex^{∞} concuerdan con lo reportado por Jusko⁽⁷⁴⁾, Welling⁽⁹²⁾, Dugal⁽⁸²⁾, etc., sin embargo respecto a los valores encontrados para K_a , $t_{1/2} K_a$, t_{max} y $C_p max$, estos parámetros varían dependiendo de la cantidad y velocidad con el fármaco se absorbe, estando involucrados factores tanto de tipo individual como de formulación.

Para determinar la bioequivalencia de los productos estudiados de ampicilina th., se comparan los niveles alcanzados por

el producto mexicano respecto a la solución y al producto innovador, tanto en plasma como en orina. Esta comparación se puede hacer primero a partir de algunos parámetros plasmáticos como son: a) La concentración plasmática máxima que se alcanza ($C_p \text{ max}$), la cual depende de la formulación y la respuesta individual. b) El tiempo en el cual se llega a la concentración plasmática máxima ($t \text{ max}$). Este parámetro está relacionado a la velocidad de absorción de un fármaco a partir de una formulación y es usado como una medida de la velocidad de absorción. c) El área bajo la curva de una gráfica de concentración plasmática contra tiempo (ABC_0^{∞}) este parámetro es el más importante para evaluar la biodisponibilidad y representa la cantidad de fármaco absorbida, después de la administración de una dosis oral de un fármaco y d) La comparación de los niveles plasmáticos alcanzados a cada tiempo de muestreo por las formulaciones estudiadas.

La Bioequivalencia también se puede determinar a partir de datos urinarios como son: a) La comparación de los niveles de cantidad acumulada excretada inalterada en orina por las diferentes formulaciones a cada intervalo de muestreo y b) La comparación de los datos obtenidos por el método de velocidad de excreción a cada tiempo de muestreo en las formulaciones estudiadas.

Considerando lo anterior se efectuó una prueba estadística de análisis de varianza, para los valores de $t \text{ max}$, $C_p \text{ max}$, ABC_0^{∞} y datos de concentración plasmática obtenidos a diferentes

tiempos de muestreo (20, 35, 45, 65, 75, 95, 135, 175, 235, 285 min). primero entre los productos A, B y C y segundo entre los productos B y C. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$) entre los productos A, B y C (Tabla XXXIX) para el valor de t_{max} y para los datos de concentración a los 20, 30, 45, 65, 75 y 95 minutos y entre los productos B y C a los 65 y 95 minutos (Tabla XL).

Los datos de la cantidad acumulada de ampicilina excretada en orina a los diferentes intervalos de tiempo, así como los datos obtenidos al utilizar el método de velocidad de excreción a cada tiempo de muestreo fueron sometidos a un análisis de varianza (a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$). Este análisis se efectuó primero entre los productos A, B y C y segundo entre los productos B y C.

En las Tablas XLI y XLII se presentan los resultados del análisis de varianza para la cantidad acumulada excretada de ampicilina th. en orina, observándose que se presentan diferencias altamente significativas para los productos A, B y C a todos los tiempos de muestreo (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 y 24 horas) y para los productos B y C a los siguientes tiempos: 1.5, 2.0, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 y 24 horas.

El análisis de varianza para los datos obtenidos por el método de velocidad de excreción se presentan en las tablas XLIII y XLIV, encontrándose diferencias significativas entre los productos A, B y C a 0.75 horas y en los productos B y C a 0.75

Tabla XXXIX. Análisis estadístico de varianza para datos plasmáticos obtenidos a diferentes intervalos de tiempo después de la administración oral de los productos A, B y C de ampicilina th.

Tabla ANOVA

Parámetro Estadístico Tiempo. (min)	TSS	TrSS	ESS	DF ₁	DF ₂	DF ₃	TrMS	EMS	Fcal	Nivel de Significancia
20'	4.48	2.89	1.59	2.0	12.0	14.0	1.45	0.13	10.95	p<0.05*
35	9.27	7.25	2.02	2.0	13.0	15.0	3.62	0.16	23.31	p<0.05*
45	9.36	5.62	3.74	2.0	12.0	14.0	2.81	0.31	9.02	p<0.05*
65	9.02	4.58	4.44	2.0	13.0	15.0	2.29	0.34	6.70	p<0.05*
75	10.01	5.37	4.64	2.0	13.0	15.0	2.69	0.36	7.53	p<0.05*
95	10.05	5.13	4.92	2.0	13.0	15.0	2.56	0.38	6.77	p<0.05*
135	3.60	0.85	2.75	2.0	12.0	14.0	0.42	0.23	1.84	p>0.05
175	5.10	0.36	4.74	2.0	13.0	15.0	0.18	0.36	0.49	p>0.05
235	3.07	0.61	2.46	2.0	13.0	15.0	0.31	0.19	1.61	p>0.05
285	0.88	0.26	0.62	2.0	10.0	12.0	0.13	0.06	2.09	p>0.05
Cp max	5.77	1.88	3.89	2.0	13.0	15.0	0.94	0.30	3.14	p>0.05
t max	1437.5	6961.6	7413.3	2.0	13.0	15.0	3480.8	570.26	6.10	p<0.05*
ABC ₀	134538.3	17911.4	116626.9	2.0	13.0	15.0	8955.7	8971.3	1.0	p>0.05

TSS = Suma total de cuadrados

TrSS = Tratamiento de la suma de cuadrados

ESS = Error de suma de cuadrados

DF₁ = Tratamiento de los grados de libertad

DF₂ = Error de los grados de libertad

DF₃ = Total de los grados de libertad

TrMS = Tratamiento cuadrático medio

EMS = Error cuadrático medio

Fcal = Relación F calculada

* = Si hay diferencias significativas

Tabla XL. Análisis estadístico de varianza para datos plasmáticos obtenidos a diferentes intervalos de tiempo después de la administración oral de los productos B y C de ampicilina th.

Tabla ANOVA

Parámetro Estadístico Tiempo (min)	TSS	TrSS	ESS	DF ₁	DF ₂	DF ₃	TRMS	EMS	Fcal	Nivel de Significancia
20'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	0.98	0.19	0.79	1	9	10	0.19	0.09	2.15	p>0.05
45	2.17	0.59	1.59	1	8	9	0.59	0.20	2.97	p>0.05
65	3.61	1.64	1.97	1	9	10	1.64	0.22	7.51	p<0.05*
75	3.57	1.0	2.57	1	9	10	1.0	0.29	3.51	p>0.05
95	4.19	1.82	2.37	1	9	10	1.82	0.26	6.92	p<0.05*
135	2.18	0.84	1.34	1	8	9	0.84	0.17	5.01	p>0.05
175	4.06	0.07	3.99	1	9	10	0.07	0.44	0.16	p>0.05
235	2.39	0.02	2.37	1	9	10	0.02	0.26	0.06	p>0.05
285	0.59	0.0026	0.59	1	6	7	0.0026	0.1	0.03	p>0.05
Cp max	2.74	0.59	2.15	1	9	10	0.59	0.24	2.48	p>0.05
T max	9963.6	3030.3	6933.3	1	9	10	3030.3	770.3	3.93	p>0.05
ABC _O	95977.4	13172.1	82805.3	1	9	10	13172.1	9200.5	1.43	p>0.05

TSS = Suma total de cuadrados

TrSS = Tratamiento de la suma de cuadrados

ESS = Error de suma de cuadrados

DF₁ = Tratamiento de los grados de libertad

DF₂ = Error de los grados de libertad

DF₃ = Total de los grados de libertad

TRMS = Tratamiento cuadrático medio

EMS = Error cuadrático medio

Fcal = Relación de F calculada

* Si hay diferencia significativa

Tabla XLI. Análisis estadístico de varianza de la cantidad excretada inalterada de ampicilina en orina a diferentes intervalos de tiempo después de la administración oral de los productos A, B y C.

Tabla ANOVA

Parámetro Estadíst. Tiempo (hr)	TSS	TrSS	ESS	DF ₁	DF ₂	DF ₃	TrMS	EMS	Fcal	Nivel de Significancia
0.5	82.63	35.06	47.57	2	11	13	17.53	4.32	4.05	p<0.05*
1.0	912.4	676.6	235.7	2	10	12	338.3	23.5	14.35	p<0.05*
1.5	2205.3	1525.9	679.3	2	11	13	762.9	61.7	12.35	p<0.05*
2.0	3647.8	1974.4	1673.3	2	11	13	987.2	152.1	6.49	p<0.05*
2.5	5098.0	2782.9	2315.1	2	11	13	1391.4	10.47	6.61	p<0.05*
3.0	4640.9	2742.8	1898.1	2	11	13	1371.4	172.56	7.95	p<0.05*
3.5	4591.5	2631.0	1960.5	2	11	13	1315.5	178.2	7.38	p<0.05*
4.0	4505.6	2389.3	116.34	2	11	13	1194.6	192.3	6.21	p<0.05*
4.5	4323.8	2148.1	2175.6	2	11	13	1074.0	197.7	5.43	p<0.05*
5.0	3997.2	1884.0	2113.2	2	11	13	942.0	192.1	4.9	p<0.05*
6.0	3663.6	2106.0	1557.6	2	11	13	1053.0	141.6	7.44	p<0.05*
8.0	3557.5	2130.9	1426.6	2	11	13	1065.4	129.6	8.22	p<0.05*
10.0	3533.3	2144.3	1388.9	2	11	13	1072.1	126.27	8.49	p<0.05*
12.0	3536.2	2173.0	1363.1	2	11	13	1086.5	123.9	8.77	p<0.05*
24.0	3510.5	2147.4	1363.0	2	11	13	1073.7	123.9	8.67	p<0.05*

TSS = Suma total de cuadrados

TrSS = Tratamiento de la suma de cuadrados

ESS = Error de suma de cuadrados

DF₁ = Tratamiento de los grados de libertad

DF₂ = Error de los grados de libertad

DF₃ = Total de los grados de libertad

TrMS = Tratamiento cuadrático medio

EMS = Error cuadrático medio

Fcal = Relación de F. calculada

* Si hay diferencia significativa

Tabla XLII. Análisis estadístico de varianza de la cantidad acumulada excretada inalterada de ampicilina th. en orina a diferentes intervalos de tiempo después de la administración oral de los productos B y C.

Tabla ANOVA

Parámetro Estadístico	TSS	TrSS	ESS	DF ₁	DF ₂	DF ₃	TrMS	EMS	Fcal	Nivel de Significancia
Tiempo (hr)										
0.5	0.18	0.03	0.15	1	7	8	0.03	0.02	1.55	p>0.05
1.0	35.81	26.12	9.69	1	7	8	26.12	1.38	18.87	p>0.05
1.5	149.73	112.77	36.96	1	7	8	112.77	5.28	21.36	p<0.05*
2.0	1126.2	722.4	403.7	1	7	8	722.4	57.6	12.52	p<0.05*
2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.0	1941.23	1304.49	636.74	1	7	8	1304.49	90.96	14.34	p<0.05*
3.5	2119.26	1426.75	692.51	1	7	8	1426.75	98.93	14.42	p<0.05*
4.0	2282.6	1467.9	814.70	1	7	8	1467.9	116.39	12.61	p<0.05*
4.5	2292.6	1453.17	839.5	1	7	8	1453.17	119.9	12.12	p<0.05*
5.0	2252.6	1362.6	890.06	1	7	8	1362.6	127.1	10.72	p<0.05*
6.0	2133.3	1405.66	727.73	1	7	8	1405.6	103.9	13.52	p<0.05*
8.0	2036.3	1417.6	618.6	1	7	8	1417.6	88.38	16.04	p<0.05*
10.0	2016.7	1434.3	582.3	1	7	8	1434.3	83.19	17.24	p<0.05*
12.0	2016.8	1443.4	573.4	1	7	8	1443.4	1.92	17.62	p<0.05*
24.0	2002.8	1438.0	564.7	1	7	8	1438.0	80.68	17.82	p<0.05*

TSS = Suma total de cuadrados

DF₃ = Total de los grados de libertad

TrSS = Tratamiento de la suma de cuadrados

TrMS = Tratamiento cuadrático medio

ESS = Error de suma de cuadrados

EMS = Error cuadrático medio

DF₁ = Tratamiento de los grados de libertad

Fcal = Relación de F calculada

DF₂ = Error de los grados de libertad

* Si hay diferencia significativa

Tabla XLIII. Análisis estadístico de varianza para datos urinarios obtenidos por el método de velocidad de excreción después de la administración oral de los productos A, B y C de ampicilina th.

Parámetro Estadístico Tiempo (min)	TSS	TrSS	ESS	DF ₁	DF ₂	DF ₃	TrMS	EMS	Fcal	Nivel de Significancia
0.25	328.23	137.82	190.41	2	11	13	68.91	17.31	3.98	p>0.05
0.75	1988.46	1639.59	348.88	2	10	12	819.79	34.89	23.50	p<0.05 *
1.25	1953.27	747.26	1206.01	1	11	13	373.63	109.64	3.41	p>0.05
1.75	3505.3	1076.8	2428.4	2	11	13	538.4	220.77	2.44	p>0.05
2.25	1270.5	378.5	900.07	2	11	13	189.24	81.82	2.31	p>0.05
2.75	793.27	0.85	792.42	2	11	13	0.43	72.04	0.01	p>0.05
3.25	469.56	53.23	416.33	2	11	13	26.61	37.85	0.70	p>0.05
3.75	316.87	77.09	239.78	2	11	13	38.54	21.80	1.77	p>0.05
4.25	165.22	67.82	97.39	2	11	13	33.91	8.85	3.83	p>0.05
4.75	417.03	52.92	364.11	2	11	13	26.46	33.10	0.0	p>0.05
5.5	165.87	13.65	152.22	2	11	13	6.83	13.84	0.49	p>0.05
7.0	3.96	0.02	3.94	2	11	13	0.01	0.36	0.03	p>0.06
9.0	0.61	0.02	0.59	2	11	13	0.01	0.05	0.14	p>0.06
11.0	0.13	0.01	0.12 ₃	2	11	13	4.15X10 ⁻³	0.01 ₄	0.37	p>0.05
18.0	0.01	1.77X30 ⁻³	4.17X10	2	11	13	8.97X10 ⁻⁴	3.79X10	2.37	p>0.05

TSS = Suma total de cuadrados

TrSS = Tratamiento de la suma de cuadrados

ESS = Error de suma de cuadrados

DF₁ = Tratamiento de los grados de libertad

DF₂ = Error de los grados de libertad

DF₃ = Total de los grados de libertad

TrMS = Tratamiento cuadrático medio

EMS = Error cuadrático medio

Fcal = Relación de F calculada

* = Si hay diferencias significativas

Tabla XLIV. Análisis estadístico de varianza para los datos urinarios obtenidos por el método de velocidad de excreción después de la administración oral de los productos B y C de ampicilina th.

Dato Estadist. Tiempo (min)	TSS	TrSS	ESS	DF ₁	DF ₂	DF ₃	TrMS	EMS	Fcal	Nivel de Significancia
0.25	0.79	0.51	0.28	1	7	8	0.28	0.07	3.89	p>0.05
0.75	83.30	24.20	59.10	1	7	8	59.10	3.46	17.10	p<0.05*
1.25	207.4	121.0	88.37	1	7	8	121.02	12.62	9.59	p<0.05*
1.75	2883.1	1057.4	1825.6	1	7	8	1057.4	260.8	4.05	p>0.05
2.25	883.41	542.8	340.6	1	7	8	340.6	77.55	4.39	p>0.05
2.75	590.25	0.0013	590.2	1	7	8	0.0013	84.32	1.52X10 ⁻⁵	p>0.05
3.25	279.22	10.95	268.27	1	7	8	10.95	38.32	0.29	p>0.05
3.75	174.25	173.78	0.47	1	7	8	0.47	24.83	0.02	p>0.05
4.25	78.64	0.06	78.64	1	7	8	0.06	11.23	0.01	p>0.05
4.75	348.17	6.72	341.45	1	7	8	6.76	48.78	0.41	p>0.05
5.5	13.78	0.33	13.44	1	7	8	0.33	1.92	0.17	p>0.05
7.0	2.98	0.01 ₋₃	2.97	1	7	8	0.01 ₋₃	0.42	0.01	p>0.05
9.0	0.4	1.01X10 ₋₃	0.4	1	6	7	1.01X10 ₋₃	0.07	0.02	p>0.05
11.0	0.03 ₋₃	3.56X10 ₋₃	0.03 ₋₃	1	7	8	3.56X10 ₋₃	4.37X10 ₋₃	0.81	p>0.05
18.0	4.11X10 ₋₃	2.72X10	4.09X10	1	7	8	2.72X10	5.8 X10	0.05	p>0.05

TSS = Suma total de cuadrados

TrSS = Tratamiento de la suma de cuadrados

ESS = Error de suma de cuadrados

DF₁ = Tratamiento de los grados de libertad

DF₂ = Error de los grados de libertad

DF₃ = Total de los grados de libertad

TrMS = Tratamiento cuadrático medio

EMS = Error cuadrático medio

Fcal = Relación de F calculada

* = Si hay diferencias significativas

y 1.75.

Para corroborar los resultados obtenidos en estos análisis estadísticos de varianza y comprobar la bioequivalencia del producto mexicano estudiado de ampicilina th, se hizo un análisis de biodisponibilidad utilizando el método de Kwan-Till⁽⁹⁸⁾, el cual considera, tanto datos plasmáticos como urinarios. El método de Kwan-Till se utiliza para determinar la biodisponibilidad, basándose en estimados de parámetros farmacocinéticos en los que puede ocurrir variación intra-individuo respecto al tiempo como son: depuración renal, depuración plasmática y la cantidad de fármaco inalterado excretado en orina. Este método es totalmente compatible con otros métodos farmacocinéticos y presenta las ventajas de ser modelo independiente y considerar la variación individual que puede ocurrir en los diferentes días del estudio, debido a cambios renales.

En base al análisis de Kwan-Till se calcula la biodisponibilidad relativa entre: primero: Solución -producto innovador (A-B). Segundo: solución -producto mexicano (A-C) y tercero: producto innovador -Producto (B-C) mexicano. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla XLVII. En esta tabla se observa que el valor obtenido para la biodisponibilidad relativa promedio^{± F.S.} entre los productos A-B, A-C y B-C es de 0.97 (± 0.124), 0.74 (± 0.071) y 0.72 (± 0.055) respectivamente. Estos resultados indican que los productos A-B son bioequivalentes, pero, si se presentan diferencias significativas en la biodisponibilidad de los productos A-C y B-C, o sea entre el producto mexicano-solución y entre el producto mexicano-producto innovador. Determinando que el producto mexicano estudiado de ampicilina th. es bioinequivalente.

Tabla XLV

Análisis de Kwan Till para calcular la Biodisponibilidad
relativa de los productos A, B y C de ampicilina th.

Tratamiento	Voluntario	Depuración (ml/min)				Fracción de Dosis excretada en orina		Absorción relativa	
		$V^{S}Cl_{1r}$	$ V^{S}Cl_{1p} ex $	$V^{X}Cl_{1r}$	$ VCl_{1p}^{X} ex $	$\frac{fF}{S}$	X	Fx	Fs
X=Prod. Innov.	1	256.76	693.95	383.39	1036.19	0.37	0.32	0.869	
S = Solucion (A-B)	2	344.62	1148.73	-	-	0.3	-	-	
	3	182.93	630.79	339.06	1169.16	0.29	0.33	1.15	
	4	209.52	698.40	249.61	832.03	0.3	0.38	1.28	
	5	267.07	635.88	231.51	551.14	0.42	0.28	0.671	
		$\bar{X}=0.972 (0.124)$							
X=Prod. Mexic.	1	265.76	693.95	213.72	577.62	0.37	0.28	0.75	
S=Solucion (A-C)	2	344.62	1148.73	273.70	912.33	0.3	0.21	0.69	
	3	182.93	630.79	146.47	505.05	0.29	0.22	0.77	
	4	209.52	698.40	287.18	957.26	0.3	0.23	0.77	
	5	267.07	635.88	199.77	475.64	0.42	0.20	0.48	
		$\bar{X}=0.74 (0.071)$							
X=Prod. Mexic.	1	383.39	1198.09	213.72	667.87	0.32	0.28	0.87	
S=Prod. Innov. (B-C)	2	-	-	273.70	-	-	0.21	-	
	3	339.06	1027.45	146.47	443.84	0.33	0.22	0.67	
	4	249.61	656.87	287.18	757.55	0.38	0.23	0.61	
	5	231.51	826.82	199.77	712.77	0.28	0.20	0.73	
		$\bar{X}=0.72 (0.055)$							

$V^{S}Cl_{1r}$ = Depuración renal del producto de referencia
 $V^{S}Cl_{1p} ex$ = depuración plasmática del producto de referencia
 $V^{X}Cl_{1r}$ = Depuración renal del producto problema

$VCl_{1p}^{X} ex$ = depuración plasmática del producto problema

\bar{X} = media
 () = Error estándar.

En la Tabla XLVIII se resumen los resultados obtenidos del cálculo de la biodisponibilidad relativa para los productos A-B, A-C y B-C a partir de los datos Aex^{∞} , ABC_0^{∞} y $Fx \cdot fs$ (Kwan-Till). El calcular la biodisponibilidad por diferentes métodos y a partir de diferentes parámetros farmacocinéticos permite asegurar de una forma más adecuada si dos o más productos son bioequivalentes entre sí.

En la Tabla XLVIII se observa que no hay diferencias significativas en la biodisponibilidad de los productos A-B en ningún caso, al igual que para los productos B-C respecto al ABC_0^{∞} , pero si se presentan diferencias significativas en los productos A-C y B-C respecto a los datos de Aex^{∞} (0.7 y 0.71) y $Fx \cdot fs$ (0.74 y 0.72) respectivamente. Lo cual significa que el producto mexicano estudiado de baja disolución no es bioequivalente respecto a la solución y al producto innovador de ampicilina.

La razón más importante por la cual es necesario realizar estudios de bioequivalencia es debido a que muchos productos considerados farmacéuticamente equivalentes al utilizar en la clínica no producen efectos terapéuticos comparables en los diferentes pacientes. Por lo cual un medicamento además de cumplir con las pruebas de Control de Calidad debe demostrar su eficacia terapéutica, que es el fin para el cual se produce cualquier tipo de medicamento.

Por último se calculó el número necesario de voluntarios para detectar una diferencia estadísticamente significativa de un 20% en la biodisponibilidad de los productos de ampicilina en estudio, a un nivel de significancia de 0.05, en base a parámetros de biodisponibilidad y sus respectivas desviaciones estándar, como pueden ser, la cantidad acumulativa excretada (Aex), la constante de absorción (Ka), la velocidad máxima de excreción ($\Delta Aex/\Delta t_{max}$), el tiempo

Tabla XLVI Biodisponibilidad relativa obtenida por diferentes métodos para los productos A, B y C de ampicilina th.

	Aex ^{oo}	ABC _o ^{oo}	FxFs (Kwan-Till)	
Soluc-P.innovador (A-B)	1	0.875	0.469	0.869
	2	-	1.40	
	3	1.17	1.05	1.15
	4	1.28	1.44	1.20
	5	0.676	0.697	0.571
	\bar{X}	1.00 (0.137)	1.011 (0.190)	0.972 (0.124)
Soluc-P.mexicano (A-C)	1	0.760	0.875	0.75
	2	0.700	1.15	0.69
	3	0.780	1.13	0.77
	4	0.766	0.579	0.77
	5	0.488	0.484	0.48
	\bar{X}	0.70 (0.054)	0.84 (0.137)	0.74 (0.071)
P.innov-P.mexicano	1	0.868	1.86	0.87
	2	-	0.822	
	3	0.666	1.07	0.67
	4	0.598	0.402	0.61
	5	0.721	0.693	0.73
	\bar{X}	0.713 (0.057)	0.97 (0.247)	0.72 (0.055)

() = Error estándar.

de velocidad máxima de excreción (tra \times), calculados a partir de datos urinarios o bien cp_{max} , t_{max} y ABC_0^{∞} a partir de datos plasmáticos.

A partir de la ecuación sugerida por Dixon⁽⁹⁹⁾ se calculó el número de voluntarios. El cálculo se basó en las cantidades acurulativas excretadas a las 24 hs. en orina por el producto mexicano y el producto innovador, de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\phi^2 = \frac{\sum_{i=1}^K (u_i - \bar{u})^2 / K}{\sigma^2 / n} \quad (1)$$

En la cual ϕ^2 es una función que se utiliza para medir una alternativa. O sea la posibilidad de rechazar la hipótesis $u_1 = u_2 = \dots = u_K$, la cual puede usarse también para determinar la potencia del contraste n = número de observaciones de cada población u_i = las medidas experimentales observadas de cada población. \bar{u} = la media de las medias experimentales.

σ = el cuadrado medio residual del análisis de varianza del diseño

K = número de productos probados.

por lo tanto $u_1 = 33.0$, $u_2 = 22.9$, $\bar{u} = 27.95$, $K = 2$ y $\sigma^2 = 80.68$

sustituyendo estos datos en la ecuación (1).

$$\phi^2 = \frac{(33.0-27.95)^2 + (22.9-27.95)^2 / 2}{80.68 / n} = 0.316 n$$

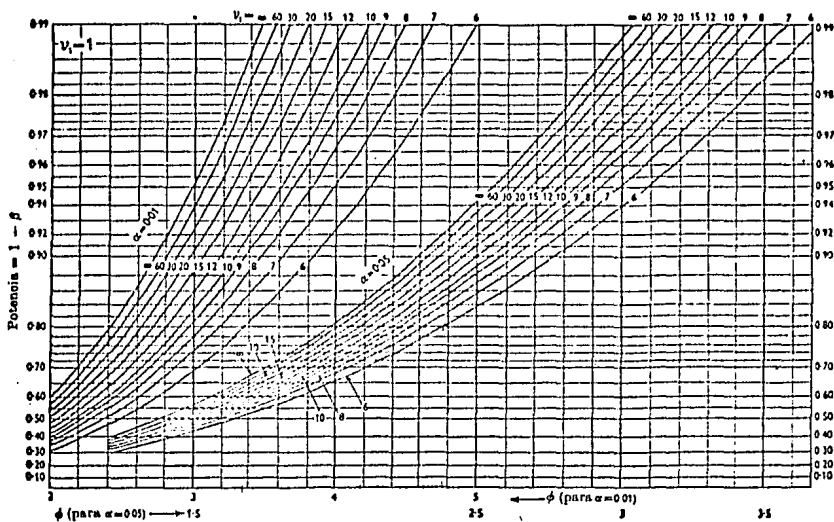
Ahora, leemos a partir de la gráfica presentada en la Figura 31 con $\alpha = 0.05$, $1-\beta=0.8$, $v_1 = K-1$, y $v_2 = Kn-K$, los resultados correspondientes a diferentes valores de n , comparando, cada vez el valor tabulado con $0.316 n$ hasta que se obtenga un valor mayor que el de la gráfica.

Se recurre a la Figura 31 utilizando $n = 2, 4, 6, 8, 10, 12$ y 14 y los resultados obtenidos de la tabulación, ^{los cuales} se presentan a continuación:

n...	v2....	.0.316n	De la Figura 31	
			\emptyset	\emptyset^2
2	2	0.632	-	-
4	6	1.264	2.38	5.66
6	10	1.896	2.22	4.92
8	14	2.528	2.12	4.49
10	18	3.16	2.08	4.32
12	22	3.792	2.06	4.24
14	26	4.424	2.05	4.205

Para $n = 14$ la \emptyset^2 de la tabla es menor que $0.316n$. Esto indica que el número necesario de voluntarios por producto es igual a 14 , para tener la posibilidad de descubrir diferencias estadísticamente significativas del 80%.

Figura No. 31. Potencia de contraste del análisis de varianza.



" CAPITULO VI "

CAPITULO VI

6. Conclusiones.

6.1. Se encontró que de trece productos estudiados de ampicilina th. del mercado nacional, los productos C₁, D₁, F₁, KMy MMno son farmacéuticamente equivalentes, ya que no cumplen con el requisito de contenido especificado por la British Pharmacopea. Por lo tanto, estos productos deberían ser retirados del mercado al no cumplir con este requisito básico de calidad.

6.2. Se utilizó el método espectrofotométrico de la British Pharmacopea⁽¹¹⁾ para la valoración de ampicilina en agua destilada y HCl 0.1 N. El método mostró una linealidad satisfactoria de 4 a 24 mcg/ml ($r = 0.999$, $p < 0.001$) en los dos medios de disolución. El coeficiente de variación fué de 0.12 a 1.6% en HCl 0.1 N y de 0.25 a 1.9% en agua destilada para las concentraciones de 4 y 24 mcg/ml respectivamente.

Por las características de linealidad y precisión, el método espectrofotométrico de la B.P. resulta adecuado para ser utilizado en la determinación de ampicilina th. en las pruebas de disolución.

6.3. Las pruebas de disolución de los trece productos nacionales de ampicilina th., y del producto innovador, Pollycillin de Bristol, mostraron diferencias significativas en la cantidad disuelta a todos los tiempos tanto en HCl 0.1 N como en agua destilada.

Las diferencias fueron mayores en agua destilada a los 30, 45 y 60 min. lo cual indica que en agua destilada y a una menor agitación se podría discernir mejor el comportamiento de disolución de las cápsulas de ampicilina th. El producto con la clave AM presenta el comportamiento de disolución más bajo tanto en HCl 0.1N como en agua destilada 65 y 55% respectivamente.

La baja disolución del producto AM se comprobó que correspondía a un caso de menor biodisponibilidad. El producto FM presentó también baja disolución, 66% en agua destilada lo cual hace pensar en un posible problema de bioequivalencia.

6.4. No se encontró correlación entre la prueba de disolución y desintegración en los productos estudiados.

6.5. El método microbiológico de sensidisco-placa utilizando B. subtilis como microorganismo de prueba para la cuantificación de ampicilina th. en plasma y orina, mostró una linealidad satisfactoria de 0.25 a 60 mcg/ml con un coeficiente de correlación de 0.998 ($p < 0.01$), el coeficiente de variación fué de 2.5 a 0.694% en plasma y de 3.39 a 0.699% en orina para las concentraciones de 0.25 y 50 mcg/ml respectivamente, por las características de linealidad, sensibilidad, precisión y especificidad, el método microbiológico es adecuado para ser usado en los estudios de biodisponibilidad de ampicilina th. a partir de muestras plasmáticas y urinarias.

6.6. En base a un estudio preliminar en el que se administró por vía oral 250 mg de ampicilina th. a dos voluntarios sanos, se establecieron los horarios utilizados en el estudio de bioequivalencia para la toma de muestras plasmáticas y urinarias.

Se encontró que el intervalo establecido (0.2 - 50 mcg/ml) en la curva patrón de ampicilina th. en plasma y orina era adecuado para interpolar los datos de las muestras obtenidas durante el estudio y que los parámetros farmacocinéticos promedio encontrados para K_d (0.588), $t_{1/2}$ (1.18 hs) y A_{ex} (36%) concordan con lo reportado en la literatura^(73,74,75,77,83,91,92,93,94).

6.7. Se realizó el estudio de bioequivalencia de una solución de 250 mg de ampicilina th., el producto innovador, Pollycillin de Bristol y un producto mexicano de baja disolución, en 6 voluntarios sanos. Encontrándose mediante un análisis estadístico de varianza que había diferencias altamente significativas entre los productos estudiados para la cantidad de ampicilina excretada inalterada en orina a los diferentes tiempos de muestreo.

Para corroborar estos resultados se efectuó el análisis de Kwan-Till para calcular la biodisponibilidad relativa entre; solución-producto innovador (A-B), solución-producto mexicano (A-C) y producto innovador-producto mexicano (B-C). Encontrándose en los resultados que no hay diferencias significativas entre los productos A-B ($F = 0.97$), pero sí hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los productos A-C ($F = 0.74$) y B-C ($F = 0.72$). Lo cual comprueba que el producto mexicano estudiado de ampicilina th. de baja disolución designado como farmacéuticamente equivalente al producto innovador en base a las pruebas de control farmacéutico es "bioinequivalente".

6.9. Se determinó que son necesarios 14 voluntarios por cada formulación de ampicilina th. que se desee estudiar para tener un poder de 0.8 en la prueba de análisis de varianza.

6.10. En base a los resultados encontrados en el presente estudio se sugiere; primero, que el control farmacéutico para cápsulas de ampicilina sea más riguroso para evitar que los productos que salen al mercado no sean farmacéuticamente equivalentes. segundo, debido a la biodisponibilidad del 72% encontrada en el producto mexicano que presentó baja disolución se fundamenta la necesidad de considerar una prueba de disolución que pueda evidenciar problemas de bioinequivalencia como requisito oficial dentro de las pruebas de control farmacéutico para cápsulas de ampicilina th. tercero, se considera que la prueba de disolución para cápsulas de ampicilina th. se lleve a cabo en agua destilada a menos de 100 revoluciones p/min, con el objeto de evidenciar mejor el comportamiento de disolución entre los productos estudiados y cuarto, que se realice un estudio final de bioequivalencia en el cual se utilice un número mayor de productos nacionales de ampicilina para que los resultados encontrados sean estadísticamente representativos de la situación real de bioequivalencia de este fármaco en nuestro país.

" CAPITULO VII "

7. Apéndices.

7.1. Apéndice I.

"REACCIONES SECUNDARIAS Y TOXICAS DE LAS PENICILINAS"⁽⁷⁵⁾

Las penicilinas, como todos los agentes antimicrobianos provocan diversos efectos adversos, tanto las biosintéticas naturales como las semisintéticas. Estas reacciones, desde las leves y evanescentes, hasta las graves y posiblemente mortales pueden suceder por el uso parenteral, bucal, tópico, por inhalación, e intraraquídeo y pueden atacar a la mayoría de los tejidos y órganos separadamente o de modo difuso.

La frecuencia de los efectos indeseables varía según el preparado y la vía de administración. De las penicilinas inyectables, la penicilina G procaínica produce la más alta frecuencia de reacciones, aproximadamente 5%; la penicilina G acuosa, de 2 a 2.5%. La penicilina benzatínica produce efectos desagradables en 0.3% de los pacientes. Los compuestos que se dan por vía oral dan una frecuencia de 0.3%. Por lo general, la vía oral entraña menores riesgos que la parenteral. Pero debe señalarse que han ocurrido muertes cuando la penicilina se ha tomado por la boca.

REACCIONES POR HIPERSENSIBILIDAD:

El mecanismo más común en la patogénesis de los efectos adversos de cualquier clase de penicilinas es la hipersensibilización. Las reacciones alérgicas a la penicilina varían en fre--

cuencia de 0.7 a 10% en varias areas del mundo. No hay testimo-
nios de que haya habido aumento de frecuencia en los últimos 10
años.

Se cree que la penicilina es la causa
más general de alergia a los medicamentos, y en sus manifestacio-
nes abarca casi toda la gama de reacciones por alergia y meca-
nismos inmunitarios.

Debe destacarse el hecho que las reacciones de hipersen-
sibilidad pueden ocurrir con cualquier forma de dosificación de
la penicilina, y es de notar que, en algunos casos, la alergia
a un compuesto expone al paciente al riesgo de reacción si se le
administra una penicilina químicamente afín.

Por otra parte, la ocurrencia de un efecto indeseable no im-
plica necesariamente la repetición del efecto en sucesivas exposi-
ciones. Por ejemplo, algunos pacientes que han tenido manifesta-
ciones cutáneas leves o moderadas pueden recibir de nuevo el agen-
te que las provocó y no mostrar reacción alérgica. Reacciones de
este tipo pueden presentarse sin que haya habido exposición ante-
rior al medicamento o inmediatamente después de la administración
de la primera dosis, especialmente en individuos que han tenido
reacciones alérgicas a otras sustancias. Aunque con la elimina-
ción del antibiótico suelen desaparecer pronto las manifestacio-
alérgicas, puede suceder que persistan por una o dos semanas des-
pués de terminado el tratamiento. En algunos casos, la reacción
es leve y desaparece mientras continúa el uso de la penicilina.
En otros, la reacción es más seria y requiere la inmediata cesa-
ción del tratamiento. En alguno que otro caso, es necesario pro

hibir todo futuro uso de la penicilina, porque hay riesgo de muerte, y el enfermo debe ser advertido de ello. Debe hacerse resaltar que han ocurrido episodios mortales de anafilaxia por la ingestión de muy pequeñas cantidades de este antibiótico.

Se han visto por sensibilización a la penicilina erupción urticarial, vesicular y bulbosa. Las lesiones purpúricas son raras, causadas por la vasculitis; es muy rara la púrpura troncocitopénica. Ocasionalmente contraen la dermatitis por contacto farmacéuticos, enfermeras y médicos que preparan o manejan soluciones de penicilina, aunque nunca hayan recibido por vía bucal o en inyección; la dermatitis puede también resultar de aplicaciones tópicas imprudentes de pomada de penicilina. Reacciones cutáneas más graves son la dermatitis exfoliativa y el eritema exudativo multiforme de tipo eritemo-papular o vesículo bulboso; estas lesiones pueden ser muy graves y de distribución atípica y producir el característico síndrome de Stevens-Johnson.

La sensibilización a penicilinas conduce a lesiones bucales: glositis, estomatitis grave con pérdida de membrana mucosa de los carrillos, lengua saburral, lengua negra o parda y queilosis. Tales manifestaciones se ven principalmente después de la aplicación local de penicilina a la boca en forma de pastillas, pero también pueden aparecer cuando se reciben inyecciones del antibiótico.

La fiebre puede ser la única manifestación de hipersensibilidad a las penicilinas. Puede ser alta y sostenida, remiten

te o intermitente; a veces hay escalofríos. La reacción febril desaparece en 24 a 36 horas después de cesar la administración del mecanismo, cuya excreción es rápida. A menudo acompañan a la fiebre otras manifestaciones de sensibilidad. La eosinofilia acompaña frecuentemente a otros síntomas de alergia a la penicilina. A veces ^{la eosinofilia} es la única anormalidad y llega de 10-20% o más del número de leucocitos circulantes.

En pacientes que recibían penicilina, se ha registrado hematuria, albuminuria, piuria, cilindros de células renales y otras especies de cilindros en la orina, aumento de la creatinina en el suero y aún oliguria estos efectos probablemente se debían a hipersensibilización, pues fueron acompañados de eosinofilia y erupción cutánea. En pacientes con enfermedad renal, la penicilina puede producir una nefropatía con sedimento urinario anormal o glomerulonefritis aguda.

Las reacciones más graves de hipersensibilidad producidas por las penicilinas son el angioedema, la enfermedad del suero, anafilaxia y el fenómeno de Arthus. El angioedema con notable hinchazón de los labios, lengua, cara y tejidos periorbitales, acompañado con frecuencia por respiración asmática y ronchas gigantes de la piel, ha sido observado como efecto de la administración tópica, bucal y parenteral de penicilinas de varios tipos. Típica enfermedad del suero ha seguido a la sensibilización a este tipo de fármacos, especialmente a las formas de depósito; la gravedad es variable, desde la reacción con fie-

bre ligera, erupción cutánea y leucopenia, hasta la fuerte astralgia o artritis, púrpura, linfadenopatía, esplenomegalia, trastornos mentales, anormalidades en el ECG que hacen pensar en miocarditis, edema generalizado, albuminuria y hematuria. Esta reacción se produce al cabo de una semana o más de tratamiento; tal vez se demora hasta una o dos semanas después de terminado el tratamiento. La enfermedad del suero causada por el tratamiento de penicilina puede persistir una semana o más. Algunos pacientes que han tenido varias exposiciones a la penicilina, han experimentado varias clases de reacciones contra vasculitis alérgica, lepus eritematoso diseminado o poliarteritis.

Las reacciones anafilácticas inducidas por varias clases de preparados de penicilina son los peligros más importantes del uso de estos medicamentos. Entre todos los antibióticos las penicilinas son las que con mayor frecuencia causan este efecto. Las reacciones anafilácticas pueden ocurrir en pacientes de cualquier edad. Se ha calculado su frecuencia en 0.015 a 0.04% en personas tratadas con penicilinas en varias partes del mundo. Aproximadamente 0.002% de los enfermos tratados con estos antibióticos mueren por anafilaxia. Por lo menos 300 muertes al año son debidas a esta complicación del tratamiento. Alrededor del 15% de los que sucumben han tenido otro tipo de alergia, 70% recibieron penicilina anteriormente, y una tercera parte de estos reaccionaron al fármaco en ocasión anterior.

La mayoría de las reacciones de anafilaxia siguieron a la inyec-

ción de penicilina, pero también se han observado después de la ingestión del medicamento, y aún como resultado de la aplicación intradérmica de muy pequeña cantidad del mismo en la prueba de hipersensibilidad. El cuadro clínico varía en gravedad el caso extremo es la súbita y fuerte hipotensión y rápida muerte. En otros casos, el episodio anafiláctico se caracteriza por constricción bronquial con asma intensa, o por dolor abdominal, náuseas y vómitos, o por extrema debilidad y descenso de la presión arterial, o por diarrea y erupción purpúrica de la piel.

REACCIONES DEBIDAS A LAS PROPIEDADES TOXICAS E IRRITATIVAS DE LAS PENICILINAS:

La penicilina es virtualmente no tóxica para el hombre, a pesar de que, en algunas circunstancias, daña la células en los cultivos de tejidos. La mayoría de las reacciones que han sido atribuidas a un mecanismo de toxicidad son el resultado de efectos irritativos de concentraciones excesivas. El límite real de la dosis de penicilina que puede administrarse por vía parenteral sin nocividad no ha sido aun determinado. Algunos individuos han sido tratados con dosis intravenosas de 40 a 80 millones de unidades al día, por espacio de 4 semanas, sin que hayan padecido efectos secundarios adversos. Una posible excepción es la meticilina; se ha observado con la administración de la dosis ordinaria, una depresión de la médula ósea.

En algún caso de tratamiento con ampicilina se ha notado agranulocitosis con monocitosis periférica e histiocitosis de

la médula ósea.

Las más frecuente entre las respuestas irritativas a las penicilinas son el dolor y las reacciones inflamatorias estériles en los sitios de inyección intramuscular, reacciones que están relacionadas con la concentración. Mientras que la administración de un millón de unidades de penicilina G disuelta en 1 ml de solución salina isotónica puede producir fuerte molestia por algún tiempo, la inyección de igual dosis disuelta en 5 ml sólo causa un dolor moderado por breve tiempo. En algunos individuos que han recibido inyecciones intravenosas de penicilina se ha visto flebitis y tromboflebitis, especialmente si se ha utilizado la misma vena por tiempo demasiado largo. Muchas personas que toman preparados de penicilina por la boca experimentan náuseas, algunas veces con vómitos y ocasionalmente ↓ tienen diarrea ligera y moderada. Estas manifestaciones suelen tener relación con la dosis, y en muchos casos obedecen a irritación del conducto digestivo.

Otras indicaciones del efecto irritativo de las altas concentraciones del antibiótico es el efecto en el sistema nervioso central y periférico. Si por accidente se inyecta penicilina en el nervio ciático, el paciente nota fuerte dolor y padece disfunción en el área de distribución del nervio durante varias semanas. La inyección intrameningea de penicilina en cantidad y concentración excesivas puede producir aracnoiditis o grave y aún mortal encefalopatía. El límite superior de seguridad es de 50 000 unidades o aproximadamente 300 unida

des del fármaco por ml en líquido cefalorraquídeo, administradas en el espacio subaracnoideo de la región lumbar.

La administración parenteral de dosis muy grandes de penicilina G (40 a 80 millones de unidades por día) puede producir concentraciones musculares parcelarias o convulsiones epilépticas formes localizadas o generalizadas, más probables si hay insuficiencia renal, lesiones localizadas del sistema nervioso central e hiponatremia. La inyección de altas cantidades de la especie más comunmente empleada, la penicilina G potásica, puede causar grave y aun mortal hipercalcemia en personas que padecen insuficiencia renal.

La inyección accidental de penicilina G procaínica es un vaso sanguíneo puede producir una reacción mortal. Por ser in soluble el compuesto, por ser insoluble sus partículas se depositan rápidamente en los pulmones, donde producen numerosos pequeños infartos pulmonares y un síndrome caracterizado por ansiedad, ruido de oídos, dificultad de la visión, confusión, desorientación, parestesias, rubicundez, dolor en el pecho, disnea, cianosis, hipotensión y en algunos casos la muerte. Este cuadro se parece al de la embolia .

REACCIONES DEBIDAS A ALTERACIONES BIOLÓGICAS DEL PACIENTE Y NO RELACIONADAS CON HIPERTENSIBILIDAD NI CON TOXICIDAD:

El efecto biológico más importante de la penicilina es la alteración de la flora bacteriana en las regiones del cuerpo a las que tiene acceso el antibiótico. Cualquiera que sea la vía

de administración, pero con mayor efecto si se dá por vía oral, la penicilina altera la composición de la microflora eliminando los microorganismos susceptibles. Profundas alteraciones pueden observarse en las especies y números de microorganismos del intestino y de las vías respiratorias superiores; el grado de alteración guarda relación directa con la cantidad de penicilina administrada. Aunque esto ocurre en casi todos los individuos, generalmente no tiene importancia clínica y la microflora normal se restablece poco después de cesar el tratamiento. Sin embargo, en algunas personas sobrevienen sobreinfecciones por los cambios ocurridos en la flora.

La frecuencia de estas sobreinfecciones en el tratamiento con penicilina es de 1 por 100.

Abscesos por diversas bacterias, frecuentemente por estafilococos y bacilos gramnegativos, como las especies de Proteus, Pseudomonas, y E. coli, pueden formarse en los sitios de inyección de penicilina por vía intramuscular, causados por la introducción de microorganismos presentes en la piel. Un efecto llamativo que puede seguir al uso de la penicilina en la sífilis es la reacción de Jarish-Hersheimer, cuyo mecanismo se desconoce, pero se sabe que no se debe a hipersensibilización. Dermatitis que afecta primeramente a la piel inguinal y escrotal y que se asemeja a la palabra, ha sido observada en pacientes tratados con penicilina y puede estar relacionada con las alteraciones de la microflora intestinal y la resultante deficiencia en ácido nicotínico.

La producción de inmunidad a microorganismos invasores puede ser perjudicada o suprimida por el tratamiento de ciertas infecciones con penicilina, especialmente si el antibiótico se da en grandes dosis al principio de la enfermedad.

7.2. Apéndice II.

"Carta de consentimiento para participar como voluntario en"
el estudio de biodisponibilidad de ampicilina th.

NOMBRE:

DIRECCION:

TELEFONO:

EDAD:

ESTATURA:

SEXO:

PESO:

En forma voluntaria y en pleno uso de mis facultades mentales, hago constar que he sido informado sobre los peligros en que puedo incurrir al participar en esta investigación sobre productos comerciales de Ampicilina Trihidratada (cápsulas de 250 mg).

La información recibida y la cual he leído cuidadosamente se anexa en este documento.

Igualmente hago constar que seguiré fielmente todas las instrucciones recibidas con respecto a la toma del medicamento y recolección de muestras.

FIRMA

FECHA

7.3. Apéndice III.

Características de los voluntarios para el estudio de la administración oral de 250 mg del producto innovador de ampicilina th.

Sujeto	Peso (Kg)	Estatura (m)	Edad (años)	Sexo
1	54	1.62	25	F
2	70	1.86	20	M
Promedio	62(8)	1.74(0.12)	22.5(2.5)	-

() = Error estándar.

7.4. Apéndice IV.

Características de los voluntarios del estudio cruzado
de 3 vías; producto innovador solución oral y producto me
xicano.

datos

Sujeto	Peso (Kg)	Est tura (m)	Edad (años)	Sexo
1	60	1.65	23	M
2	65	1.75	23	F
3	70	1.86	20	M
4	72	1.70	27	M
5	54	1.62	25	F
6	52	1.62	24	F
Promedio	62.1(3.37)	1.7(0.038)	24(0.408)	F

() = Error estándar

Apéndice V . Datos individuales obtenidos por el método de velocidad de excreción después de la administración oral de 250 mg de los productos A, B y C de ampicilina th.

Voluntario t mid(hr)	Solución (A)					P. innovador (B)					P. mexicano (C)							
	1	2	3	4	5	\bar{X} ($\mu\text{g/hr}$) E.S.	3	5	4	1	\bar{X} ($\mu\text{g/hr}$) E.S.	2	3	5	4	\bar{X} ($\mu\text{g/hr}$) E.S.		
0.25	0.0	2.6	16.62	3.52	11.14	3.08 6.76	0.923	0.512	0.13	0.159	0.433	0	0.34	0.04	0.0	0.0	0.076	0.066
0.75	24.92	17.7	42.42	-	26.92	4.65 27.99	9.59	5.76	5.98	6.53	0.889 6.96	0.42	3.4	4.34	4.24	0.64	1.80	0.958
1.25	24.66	19.86	21.08	18.71	58.12	7.47 28.48	25.64	13.44	17.77	17.66	2.54 18.62	9.28	11.0	13.66	11.8	10.5	11.24	0.728
1.75	27.96	20.54	21.46	13.68	45.92	5.49 25.91	35.90	26.8	70.68	28.58	10.25 40.49	35.32	8.58	14.2	8.62	26.66	18.67	5.30
2.25	37.98	18.1	16.04	22.94	32.62	4.22 25.53	35.48	18.98	31.46	30.0	3.52 28.98	14.0	3.02	26.3	13.24	26.44	16.6	4.43
2.75	16.26	15.92	10.54	28.74	12.4	3.19 16.72	13.28	12.5	19.74	23.68	2.67 17.3	10.16	19.66	15.14	35.20	6.22	17.27	5.02
3.25	18.44	7.56	4.78	17.62	10.1	2.72 11.7	17.16	13.32	15.38	20.38	1.49 16.56	9.9	15.66	9.42	27.40	9.32	14.34	3.47
3.75	12.62	5.86	2.34	5.4	4.76	1.71 6.19	9.1	12.74	11.48	12.56	0.837 11.47	8.44	8.92	8.34	22.24	5.66	10.72	2.93
4.25	5.9	0.6	1.76	1.58	1.78	0.969 2.12	3.26	8.02	8.86	6.36	1.23 6.62	7.28	11.32	2.7	9.66	2.98	6.78	1.73
4.75	4.16	6.84	1.46	5.6	1.64	1.06 3.94	3.86	7.82	9.94	5.44	1.33 6.76	1.16	8.28	2.52	6.96	23.6	8.50	4.0
5.5	1.88	14.32	0.81	1.87	0.37	2.63 3.85	2.58	3.56	0.18	1.8	0.714 2.03	1.44	4.01	1.16	0.69	0.91	1.64	0.605
7.0	1.21	0.845	0.335	1.53	0.505	0.220 0.885	1.05	1.22	0.14	0.995	0.241 0.851	0.86	2.08	0.46	0.33	0.26	0.799	0.337
9.0	0.385	0.31	0.055	0.55	0.123	0.082 0.306	0.435	0.475	0.0	0.355	0.108 0.316	0.225	0.73	0.125	0.095	0.035	0.242	0.125
11.0	0.125	0.06	0.011	0.39	0.045	0.068 0.126	0.015	0.195	0.0	0.14	0.041 0.11	0.07	0.13	0.045	0.105	0.0	0.07	0.022
18.0	0.01	0.0	0.0	0.0	0.0	0.013 0.0	0.052	0.042	0.0	0.0	0.023 0.039	0.039	0.05	0.009	0.037	0.0	0.027	0.009
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Apéndice VI . Datos individuales obtenidos por el método de sigma menos, después de la administración oral de 250 mg de los productos A, B y C de ampicilina th.

Voluntario Tiempo(hr)	Solución (A)					P. innovador (B)					P. mexicano (C)					E.S.		
	1	2	3	4	5	\bar{X} (ng) E.S.	3	5	4	1	\bar{X} (ng) E.S.	2	3	5	1		4	\bar{X} (ng) E.S.
0.0	91.89	74.54	71.25	75.06	104.15	83.37 6.31	83.5	70.49	96.17	80.46	82.65 5.29	52.20	55.62	50.86	69.88	57.52	57.21	3.38
0.5	91.89	73.24	62.94	73.30	98.58	79.39 6.18	83.03	70.46	96.10	80.38	82.51 5.28	52.20	55.45	50.84	69.88	57.52	57.17	3.38
1.0	79.43	64.4	41.73	-	85.12	67.67 9.68	78.23	64.67	93.11	77.11	78.27 5.81	51.99	53.75	48.67	69.76	57.20	56.27	3.64
1.5	67.1	54.46	31.19	54.59	56.06	52.68 5.86	65.41	57.95	84.23	68.28	68.96 5.53	47.35	48.25	41.84	63.86	51.95	50.65	3.67
2.0	53.12	44.19	20.46	47.75	33.1	39.72 5.82	47.46	44.55	48.89	53.99	48.72 1.76	29.69	43.96	34.74	59.55	38.62	41.31	5.12
2.5	34.13	35.14	12.44	36.28	16.79	26.95 5.07	29.71	35.06	33.16	38.99	34.23 1.93	22.69	42.45	21.59	52.93	25.39	33.01	6.24
3.0	26.0	27.18	7.17	21.91	10.72	18.59 4.07	23.08	28.81	23.29	27.15	25.58 1.42	17.61	32.62	14.02	35.33	22.28	24.37	4.15
3.5	16.78	23.4	4.78	13.1	5.67	12.74 3.48	14.50	22.15	15.60	16.96	11.56 1.69	12.66	24.79	9.31	21.63	17.62	17.20	2.83
4.0	10.47	20.47	3.61	10.4	3.29	9.64 3.12	9.95	15.78	9.86	10.68	1.41 8.25	8.44	20.33	5.14	10.51	14.79	11.84	2.63
4.5	7.52	20.17	2.73	9.61	2.9	8.58 3.18	8.32	11.77	5.43	7.5	4.87 1.32	4.8	14.67	3.79	5.68	13.3	8.44	2.29
5.0	5.44	16.75	2.0	6.81	2.08	6.61 2.7	6.39	7.86	0.46	4.78	1.59 2.84	4.22	10.53	2.53	2.20	1.50	4.19	1.64
6.0	3.56	2.43	1.19	4.94	1.71	0.573 0.776	3.81	4.3	0.28	2.98	0.896 1.13	2.78	6.52	1.37	1.51	0.59	2.55	1.05
8.0	1.14	0.74	0.52	0.78	0.7	0.101 0.196	1.71	1.85	0.0	0.99	0.423 0.505	1.06	2.35	0.45	0.85	0.07	0.956	0.387
10.0	0.37	0.12	0.25	0.0	0.24	0.062 0.1	0.84	0.90	0.0	0.28	0.218 0.285	0.61	0.89	0.20	0.66	0.0	0.472	0.162
12.0	0.12	0.0	0.14	0.0	0.24	0.045	0.63	0.51	0.0	0.0	0.166	0.47	0.63	0.11	0.45	0.0	0.332	0.118
24.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

" BIBLIOGRAFIA "

BIBLIOGRAFIA

1. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (PLM)
25a. Edición Mexicana, Ediciones P.L.M., S.A.
México (1979).
2. Shargel, L. and Yu, A.B.C., "Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics" Appleton-Century-Crafts, New York (1980).
3. Federal Register 42 (5) 1624, (1977).
4. Schneller, G.H., J. Am. Pharm. Assoc., No. 59, p. 455, (1969).
5. Drug Information Bulletin, Jan/June 1969, "Symposium on Formulation Factors affecting Therapeutic Performance of Drug Products", Drug Information Association, (1969).
6. Chodo, D.J., DiSanto, A.R., "Basics of Bioavailability Published by the Upjohn Company", Kalamazoo, Michigan, (1974).
7. Report of the "Ad. Hoc Committee on Drug Product Selection of the Academy of General Practice of Pharmacy and the Academy of Pharmaceutical Sciences", J. Am. Pharm. Assoc., N. 513, (1973).
8. Chemical Abstracts, Formula Index Vol. 92 Jan-June 1980.
9. The Merck Index 9th. Merck & Co., Inc. E.U.A. (1976).
10. The United States Pharmacopeia, XVIII. 18ed. Mack Pub. Co. Easton; P.A. 18042 (1970).
11. British Pharmacopeia, 1961, Addendum Her Majesty's Stationery Office at the University Press, Cambridge (1964).
12. Gaurenitch, A., Walfe, S., and Leiu, J., Antimicrob. Agents Chemother. p. 576-80, (1961).

13. Doyle, F.P., Fosker, G.R., Noylen, J.H.C. and Smith, H., J. Chem. Soc., p. 1440, (1962).
14. Dane, E. and Dockner, T., Chem. Ber., 98, 789, (1975).
15. Dursch, F., The Squibb Institute for Medical Research, Private Communication, (1965).
16. Marsch, J.R. and Weiss, P.J., J. Assoc. of Anal. Chem. 50, p. 457, (1967).
17. Rapson, H.D.C. and Bird, A.E., J. Pharm. Pharmacol, Suppl. 15, p. 222, (1963).
18. Hou, J.P. and Poole, J.W., J. Pharm. Sci. 58, p. 1510, (1969).
19. Toeplitz, B., The Squibb Institute for Medical Research, Private Communication, (1972).
20. Cohen, A., and Puar, M.S., the Squibb Institute for Medical Research, Private Communication, (1972).
21. Funke, P.T. and Cohen, A.I., the Squibb Institute for Medical Research, Private Communication, (1972).
22. Lerner, H., The Squibb Institute for Medical Research, Private Communication, (1972).
23. "Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry", edited by C.O. Wilson, O. Gisval and R.F. Doerge 5th. Ed., (1966).
24. Gallelli, J.F., Am. J. Hosp. Pharm. 24 p. 425, (1967).

25. Simberhaff, M.S., Thomas, L., et al., N. Engl. J. Med., 283, p. 116, (1970).
26. Saccani, F. and Pangera, F., Boll Chem.Pharm. 107 p. 640, (1968).
27. Hou, J. and Poole, J.W., J. Pharm. Sci. 58 p. 447, (1969).
28. Bundgaard, H., J. Pharm. Sci., 60, 1273, (1971)
29. Jacobson, H. and Russo-Alesi, F., The Squibb Institute for Medical Research, Private Communication, (1969).
30. George, M.J., the Squibb Institute for Medical Research, Private Communication, (1964).
31. Sherman, C. and Russo-Alesi, F., the Squibb Institute for Medical Research, Private Communication, (1969).
32. Weiss, P.J. and Palmer, R.V., Antimicrob. Agents Chemother., 1964, 355-9, (1965).
33. Nara Takashi, Misawa Masavanu, and Kadu Ryo Gen. Offen 1 p. 945, 607, August (1970).
34. Ekstrom, B. and Sjaberg, B., Acta Chem. Scand 19 p. 1245, (1965).
35. Doyle, F.P. Fosker, G.R., et al., J. Chem. Soc. p. 1440, (1962).
36. Mestre, J.R. Span. 291, 104, September (1963).

37. Ekstrom, B., Gromez-Revilla, et al., Acta Chem. Scand 19, p. 281, (1965).
38. Soulal, M.J., Brit. 975, 379, November (1964).
39. Bahme E. and Dalfini, J.E., the Squibb Institute for Medical Research, Private Communication February (1969).
40. Coclers, L., Delahant, R. and Versalato, A., J. Pharm. Belg. 24, p. 475, (1969).
41. Thomas, A.H. and Broadbridge, R.A., Analyst 95 p. 459 (1970).
42. Mc Gilveray, I.J. and Streckland, R.A., J. Pharm. Sci. 56, p. 77, (1967).
43. Hellberg, H., J. Assoc. of Anal. Chem., 51 p. 552 (1968).
44. Biagi, G.L., Barbara, A.M., Gamba, M. Fand Querra M.C., J. Chromatogr. 41 p. 371, (1969).
45. Goadall, R.R. and Leni, A.A., Analyst 72 p. 277, (1974).
46. Stephens, I. and Grainer, A., J. Pharm. Pharmacol. 7 p.702, (1955).
47. Angelucci, L. and Baldieri, M., J. Pharm. Pharmacol. 23, p. 471, (1971).
48. Rasmussen, C.E. and Higuchi, T., J. Pharm. Sci. 60 p. 1608, (1971).
49. Boxer, G. and Everett, P., Anal. Chem. 21 p. 670, (1949).

50. Fed Register 33 p. 4099, Marck (1968).
51. Niedermayer, A.O., Russo-Alini, F.M. and Leudzian, C.A., Anal. Chem. 32, p. 665, (1960).
52. Jusko, W.J., J. Pharm. Sci., 60 p. 728, (1971).
53. Sinsheimer, J.E., et al, J. Pharm. Sci. 58 p. 104, (1969).
54. Diirr, A. and Schatzmann, H.J., Experientia 31.
55. Miyazaki, K., Ogino, O. and Arita, T. Chem. Pharm. Bull., 22(8) p. 1910, (1974).
56. Princeton Applied Research, Application Note, AN-111.
57. Sacconi, F., Boll. Chem. Pharm., 106, p. 625, (1967).
58. Biagi, G.L., Barboro, A.M., Gamboa, M.F. and Guerra, M.C., J. Chromotogr. 41, p. 371, (1969).
59. Biagi, G.L., et al, J. Chromatogr. 51, p. 548, (1970).
60. Roberts, H.R. and Vahidi, A., the Squibb Institute for Medical Research, Private Communication, (1971).
61. Smith, J.T. and Hamilton Miller, J.M.T., Chemotherapy 15 p. 368, (1970).
62. Hishta C., Mays, D.L. and Garafalo, M. Anal. Chem. Vol 43, No. 11, p. 1530, (1971).
63. Meesschaert, B., Adriaens, P., Eyssen, H. J. of Chromatography, 136 p. 162, (1977).

64. Hsin-Lung Wu, Mikio Masada and Toyozo Uno, J. of Chromatography, 137 p. 127, (1977).
65. Tsuji, K., Robertson, J.H., J. Pharm. Sci. 64 (9) p. 1542, (1975).
66. Vree, T.B., Hekster, V.A., Baars, A.M., Van Der Kleijn, E. J. of Chromatography, 145 p. 496, (1978).
67. Alicino, J., Anal. Chem. 18, p. 619, (1946).
68. Fed. Register 33 (165), 11999-7, August 23, (1968).
69. Yakovlev, U.P. and Skala, L.Z., Antibiotiki, 11 p. 723, (1966).
70. Shaw, W.H.C. and Duncombe, R.E., Analyst 88 p. 694, (1963).
71. Jones, A. and Palmer, G., Analyst 95, p. 463, (1970).
72. Grimshaw, J.J. and Jones, A., Analyst 95 p. 466, (1970).
73. Gairad, L.P., Lambert, H.P., O'Grady, F., Antibiotic and Chemotherapy, Fourth Edition p. 78, (1973).
74. "Ampicillin", Bioavailability Monograph. J. of the American Pharmaceutical Association Vol. N515, No. 10, October (1975).
75. Goodman, L.Y. y Gilman, A. "Bases Farmacológicas de la Terapéutica", 4a. Edición, Macmillan Publishing Co., Inc. New York (1970).
76. Bray, R.E., Bal, R.W. and Johnson, W.L. Am. J. Obstet. Gynec., 96 p. 938, (1966).

77. "The Pharmaceutical Codex", Eleventh Edition (1979).
78. Kunin, C.M., Clin. Pharmacol. Ther. 7, p. 166, (1966).
79. Wagner, J.G., "Biopharmaceutics and Relevant Pharmacokinetics, Drug Intelligence Publications, Hamilton, Illinois, (1971).
80. MacLeod, H., Rabin, J., et al, Can. Med. Assoc. J., 107 p. 203, (1972).
81. Mayershon, M., and Endrenyi, L, Can. Med. Assoc. J., 109 p. 989, (1973).
82. Dugal, R., Brodeur, J., and Coille, G., J. Clin Pharmacol. 14, p. 513, (1974).
83. Poole, J.W. and Bahal, C.K., J. Pharm. Sci., 57, p. 1945, (1968).
84. Silverio, J., and Poole, J.W., Pediatrics, 51 p. 578, (1973).
85. Whyatt, P.L., Siywka, G.W.A., Melikan, A.P., and Meyer, M.C., "The College of Pharmacy University of Tennessee Center for Health Sciences", Memphis, Tennessee, August (1974).
86. Mohar Betancourt, O. "Foro sobre Empresas Multinacionales de Dependencia Farmacológica", Industria Química Farmacéutica; consumo de ampicilina en el mercado nacional. Edición UAM, México, (1980).
87. United States Pharmacopeia XIX, 19 ed. Mack, Pub. Co. Easton Pennsylvania (1975).

88. Unites States Pharmacopeia XX 20 ed. Mack, Pub. Co. Easton Pennsylvania (1980).
89. Gibaldi, M. and Perrier, D. "Pharmacokinetics Drug and the Pharmaceutical Sciences" Marcel Dekker INC. U.S.A. (1975).
90. Wagner, J.G. "Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics" Drug Intelligence Publications, Inc. Illinois E.U.A. (1975).
91. Ehrnebo, M., Nilsson, S. and Boreus, L., J. of Pharm. and Biopharm. Vol. 7, No. 5, p. 429, (1979).
92. Welling, P.G., Huang, H. et. al, J. Pharm. Sci. Vol. 66, No. 4, p. 549, (1977).
93. Whyatt, P.L., Slywka, G.W., et al. J. Pharm. Sci. Vol. 65, No. 5, p. 652, (1976).
94. Mayersohn, M., Relative Bioavailability of Commercial Ampicillin. CMA Journal Vol. 109, p. 989, (1973).
95. Ebert, W.R., Research Medical Abstracts Technicol "Bio-availability study of ampicillin trihydrate capsules, 500 mg. (1975).
96. Klein, J.O., Finland, M. and Wihox, C., Am. J. Med. Sci., 245 p. 544, (1963).
97. Biemn, P.A., Antimicrob. Agents, Chemother. 1962, 323, (1963).
98. Kwan, K.C. and Till, A.E., J. Pharm. Sci. Vol. 62, No. 9