

98
de J.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**BIOEQUIVALENCIA DE PRODUCTOS
COMERCIALES CONTENIENDO HIDRO-
CLOROTIAZIDA Y AMILORIDA COMO
PRINCIPIOS ACTIVOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

JOSE MANUEL MORALES HERNANDEZ



**TESIS CON MEXICO, D. F.,
FALLA DE ORIGEN**

1993



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.

INDICE GENERAL

INDICE	Página
Indice General	iii
Indice de Tablas	v
Indice de Figuras	v
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	
Breve Reseña Histórica	2
Definiciones	4
Determinación de la bioequivalencia y aspectos regulatorios	6
Consideraciones regulatorias al determinar la bioequivalencia y la biodisponibilidad	6
Sugerencias para determinar la bioequivalencia <i>in vivo</i>	7
Medicamentos que no requieren demostrar biodisponibilidad o bioequivalencia	7
Productos que requieren de estudios de biodisponibilidad o bioequivalencia	8
Bases para establecer la bioequivalencia o biodisponibilidad	9
Propiedades fisicoquímicas de la Hidroclorotiazida	13
Nombre químico	13
Fórmula condensada	13
Fórmula desarrollada	13
Peso molecular	13
Descripción	13
Solubilidad	13
Coeficiente de partición	15
Farmacocinética	15
Absorción	15
Distribución	15
Farmacocinética básica	16
Biodisponibilidad	16
Métodos analíticos para la cuantificación de Hidroclorotiazida en fluidos biológicos	17
Aspectos farmacológicos de la Hidroclorotiazida	20
Aspectos farmacológicos de la Amilorida	22
Hidroclorotiazida como fármaco con problemas potenciales de biodisponibilidad	23
PARTE EXPERIMENTAL	
Estándares y productos empleados en el estudio de bioequivalencia	25
Control de calidad	25
Identidad	25

Variación de peso	25
Uniformidad de contenido	25
Disolución	26
Método analítico para la cuantificación de HCTZ en orina	27
Equipo	27
Reactivos y estándares	27
Preparación de las soluciones	28
Procedimiento de extracción	28
Condiciones cromatográficas de análisis	29
Validación del método analítico para la cuantificación de HCTZ en orina	29
Linealidad	29
Curva patrón de HCTZ en orina	31
Presición	31
Reproducibilidad	31
Repetibilidad	31
Exactitud	31
Estabilidad de HCTZ en orina	32
Especificidad	32
Cantidad mínima cuantificable	32
Cantidad mínima detectable	32
Tolerancia	32
Estudio de Bioequivalencia de dosis única en productos comerciales conteniendo Hidroclorotiazida y Amilorida	33
Preliminar del estudio de bioequivalencia	33
Estudio de bioequivalencia	33
Análisis estadístico de los datos	34
RESULTADOS	
Control de calidad de los productos	35
Identidad	35
Variación de peso	35
Uniformidad de contenido	35
Disolución	36
Validación del método analítico para cuantificar HCTZ en orina	36
Linealidad	36
Presición	36
Repetibilidad	36
Reproducibilidad	37
Exactitud	37
Estabilidad	38
Especificidad	38
Cantidad mínima cuantificable	38
Cantidad mínima detectable	38
Tolerancia	41

Estudio de bioequivalencia de productos comerciales conteniendo HCTZ y Amilorida	41
Estudio preliminar	41
Estudio de bioequivalencia	44
DISCUSION DE RESULTADOS	
Control de calidad de los productos	49
Validación del método analítico para la cuantificación de HCTZ en orina	49
Linealidad	50
Presición	50
Reproducibilidad	50
Repetibilidad	50
Exactitud	51
Estabilidad	51
Especificidad	51
Cantidad mínima cuantificable	51
Cantidad mínima detectable	52
Tolerancia	52
Estudio de bioequivalencia de productos conteniendo HCTZ y Amilorida	52
Estudio preliminar	53
Estudio de bioequivalencia	53
CONCLUSIONES	57
APENDICES	
Apéndice A	58
Apéndice B	59
Apéndice C	60
Apéndice D	62
BIBLIOGRAFIA	66

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INDICE DE TABLAS	Página
2.1. Solubilidad de HCTZ en soluciones acuosas	14
2.2. Solubilidad de HCTZ en soluciones no acuosas	14
2.3. Coeficiente de partición	15
2.4. Fases móviles y columnas empleadas en HPLC, para la cuantificación de HCTZ	18
3.1. Características físicas de los voluntarios que participaron en el estudio de bioequivalencia de productos conteniendo HCTZ	33
3.2. Diseño del tratamiento seguido en el estudio de bioequivalencia	34
4.1. Resultados de las pruebas de control de calidad: variación de peso y uniformidad de contenido	35
4.2. Resultados de la prueba de disolución	36
4.3. Repetibilidad del método	37
4.4. Reproducibilidad del método	37
4.5. Porcentaje de extracción promedio	37
4.6. Datos de estabilidad de HCTZ en orina, mantenida a 4°C	38
4.7. Resultados del estudio preliminar de bioequivalencia de HCTZ en orina	42
4.8. Valores promedio de la cantidad excretada acumulada después de la administración de los diferentes productos conteniendo HCTZ	45
4.9. Valores promedio de velocidad de excreción obtenidos para los diferentes productos conteniendo HCTZ	46
4.10. Tiempos de vida media de eliminación	47
4.11. Parámetros farmacocinéticos	48
5.1. Análisis de varianza para el estudio de bioequivalencia de productos conteniendo HCTZ	54
5.2. Intervalos de confianza para establecer la bioequivalencia entre los productos nacionales y el producto innovador	55
5.3. Tiempos Medios de Residencia	56
INDICE DE FIGURAS	
3.1. Técnica de extracción de HCTZ en orina	30
4.1. Cromatogramas típicos del análisis de HCTZ por HPLC	39
4.2. Linealidad del método	40
4.3. Cantidad excretada acumulada, después de la administración oral de HCTZ en un voluntario sano (estudio preliminar)	43
4.4. Gráfica de velocidad de excreción vs t_{mid} , después de la administración de una dosis oral de HCTZ en un voluntario sano (estudio preliminar)	43
4.5. Gráfica de la cantidad remanente por excretarse, después de la administración de una dosis oral de HCTZ en un voluntario	

4.6. Cantidad excretada acumulada a las 48 horas después de una administración oral de HCTZ	46
4.7. Gráfica de velocidad de excreción, obtenida después de una administración oral de HCTZ	47

INTRODUCCION

La Hidroclorotiazida (HCTZ), es un diurético de la familia de las tiazidas utilizada en el tratamiento de la hipertensión, la falla cardíaca congestiva y el edema; es ampliamente prescrita en México en instituciones como el Instituto Nacional de Cardiología y en Estados Unidos ocupa el lugar # 17 entre los fármacos más empleados. Es relativamente insoluble en fluidos acuosos y por lo tanto tiene el potencial de ser pobremente absorbido en el tracto gastrointestinal.

Múltiples reportes de organismos regulatorios de los continentes Americano y Europeo: FDA, OMS, Eurodocument, Prescription Drugs, Federal Register y Hew Publications; han catalogado a la HCTZ como un fármaco con problemas potenciales de biodisponibilidad, no solamente por su baja solubilidad, sino también por influencia de la formulación en la biodisponibilidad del fármaco.

En México la Hidroclorotiazida sólo existe en combinación con otros principios activos: amilorida, lisinopril, triamtereno, metoprolol, timolol, captopril, enalapril y metildopa. Así mismo, en la literatura científica internacional existe escasa información acerca de la biodisponibilidad de estos productos combinados, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la bioequivalencia de las combinaciones de la Hidroclorotiazida en productos nacionales: productos conteniendo 50 mg de Hidroclorotiazida y 5 mg de Amilorida; en relación al producto innovador, Hidrodiuryl, conteniendo 50 mg de Hidroclorotiazida.

GENERALIDADES

2.1 BREVE RESEÑA HISTORICA

La bioequivalencia o biodisponibilidad relativa ha llamado la atención durante los últimos 25 años, después de que se hizo evidente que los productos comerciales que contenían la misma cantidad de fármaco podían exhibir marcadas diferencias en sus respectivas respuestas terapéuticas. En muchos casos, estas diferencias fueron relacionadas a los diferentes niveles en sangre del principio activo debido a una absorción incompleta.

Históricamente, sin embargo, las primeras observaciones sobre la bioequivalencia, estuvieron encaminadas hacia las pruebas de desintegración de las capsulas, tabletas y tabletas con capa entérica. Muchas de estas preparaciones farmacéuticas se utilizaron para demostrar lo que se había descrito como "el efecto del todo o nada". Si una capsula o una tableta recubierta se desintegraba apropiadamente en el tracto gastrointestinal, se asumía que el fármaco se había absorbido y se obtenía la respuesta biológica esperada, por otro lado, si la preparación no se desintegraba *in vivo*, y llegaba intacta a las heces, entonces era un claro caso de falta de efectividad.

La posibilidad de contar con formas farmacéuticas sólidas no desintegrantes de algunos fármacos representaba un caso extremo de la bioinequivalencia, donde la eficiencia clínica variaba dramáticamente, llegando incluso a no tener efecto(1)(2). Sin embargo, se encontraron serias deficiencias en la disponibilidad fisiológica de los medicamentos aun cuando la tableta se desintegraba por completo *in vivo*(3). Los trabajos pioneros de Melnick *et al*(4), fueron cruciales al establecer el procedimiento del recobro de fármaco en orina como un método cuantitativo y confiable para monitorear la bioequivalencia. Sin embargo, fue hasta el final de los años 50's, cuando el método fué utilizado para evaluar la bioequivalencia de productos vitamínicos comerciales. Morrison *et al*(5), estudiaron la disponibilidad fisiológica de la riboflavina en tabletas multivitamínicas recubiertas con capa entérica y con cubierta de azúcar y mostró que el rango de disponibilidad variaba de 14 a 81%, dependiendo del lote empleado. En 1960, Levy(6)(7), inició los estudios sobre tabletas de aspirina, encontrando una relación entre la velocidad de absorción y la incidencia y severidad de la irritación gástrica localizada, después de la administración de las

tabletas de aspirina, lo cual está en función de su velocidad de disolución y apuntó que el tiempo de desintegración no era un buen indicador de la velocidad de absorción de las tabletas estudiadas. La comparación de los tiempos de desintegración y las velocidades iniciales de absorción de los tres productos probados indicó que el producto con el mayor tiempo de desintegración era el más rápidamente absorbido por lo que concluyó que la desintegración retardada influye sobre la absorción no solamente por su efecto en la disolución(8), por lo que se sugirió el reemplazamiento de la prueba de desintegración por la prueba de disolución.

En 1962(9)(10), los reportes de la ineficacia clínica del producto "Tiroide USP" fueron confirmados por la determinación del yodo unido a proteínas. La sustitución por Levotiroxina USP en los mismos pacientes que padecían de hipotiroidismo, produjo una eficacia clínica satisfactoria

En 1963, Carter(11) y Carminetsky(12) fueron los primeros en reportar la ineficacia clínica de algunos genéricos de tabletas de tolbutamida. Los problemas de bioequivalencia fueron confirmados posteriormente por Levy(13). También en un estudio posterior(14), de 26 lotes de Tolbutamida de 21 laboratorios diferentes, se demostró que el tiempo para que el 50% del fármaco se disolviera *in vitro* variaba desde 3 hasta 120 minutos. La implicación de tales diferencias de disolución en la efectividad clínica del fármaco con cambiar de un lote a otro, era evidente. En base a estos resultados se reforzó la importancia de la disolución y la biodisponibilidad en la eficacia clínica de los medicamentos.

Varley(15), condujo posteriormente un estudio clínico bien controlado para demostrar el efecto de pequeños cambios en la formulación sobre la biodisponibilidad y eficacia clínica del medicamento. El estudio mostró que es muy posible producir diferencias significativas tanto en la biodisponibilidad del fármaco como en la utilidad terapéutica con solo hacer pequeños cambios en la formulación. De esta forma la FDA, reconoció a la tolbutamida como un fármaco con problemas potenciales de biodisponibilidad.

Las tabletas de prednisona, también representan uno de los casos de bioequivalencia. En 1963, Campagna *et al*(16) reportaron que las tabletas de prednisona habían sido usadas exitosamente para controlar cierta enfermedad en un paciente, Sin embargo, al cambiar de marca comercial, las nuevas tabletas no produjeron efecto alguno. Cuando el paciente tomó nuevamente las tabletas originales, se obtuvo una respuesta clínica completa. Los autores

encontraron que la disolución de las tabletas biológicamente inactivas era significativamente más lenta al compararla con las tabletas de la marca original. Un caso similar a este, en un paciente artrítico, fue reportado un año más tarde por Levy(17). Más estudios sobre biodisponibilidad de las tabletas de prednisona de diferentes laboratorios confirmaron los hechos anteriores y demostraron claramente que las tabletas de prednisona tenían problemas de biodisponibilidad(18)(19)(20).

Posteriormente se reportó el caso de la bioequivalencia de los productos que contenían cloramfenicol. Basado en los niveles sanguíneos y en datos de excreción urinaria y sus metabolitos, Glazko *et al*,(21) demostraron que la absorción del cloramfenicol a partir de un producto genérico después de una administración oral era solamente una tercera parte de la que presentaba el innovador. Un año más tarde, otros dos importantes antibióticos, la oxytetraciclina y la tetraciclina, fueron catalogados como productos con serios problemas de bioequivalencia(22)(23)(24).

La biodisponibilidad es particularmente importante en fármacos tales como la digoxina(25), dado su estrecho índice terapéutico, por lo que fluctuaciones significantes en los niveles sanguíneos pueden resultar en una respuesta subclínica o en una respuesta tóxica. Para la digoxina este problema es aún más grande debido a su baja solubilidad en agua e incompleta absorción en el tracto gastrointestinal(26). La variación en la biodisponibilidad de los productos tales como la digoxina así como la demostración de sus consecuencias en la seguridad y eficacia terapéutica del fármaco impulsaron a que la bioequivalencia de ser un mero tópico académico llegara a tener un mayor impacto entre los farmacéuticos, productores de medicamentos y agencias gubernamentales y privadas. Muchos más fármacos de los aquí presentados han sido identificados como propensos a problemas de biodisponibilidad y como resultado de esto se ha generado una lista de fármacos con problemas de biodisponibilidad (27)(28)(29).

2.2 DEFINICIONES

Se ha definido la biodisponibilidad como la medida de la cantidad relativa de fármaco que alcanza la circulación general y la velocidad a lo que esto ocurre. En el caso de los medicamentos que se administran de manera crónica, la cantidad total de fármaco absorbido es, por lo general, más decisiva que su velocidad de absorción. Sin embargo, para los fármacos que deberán ser

efectivos después de una sola dosis, el parámetro farmacocinético de incidencia más crítica puede ser la velocidad de absorción (más que la magnitud de la misma). Un medicamento que alcanza la circulación muy rápidamente, puede provocar, al principio, reacciones adversas si los niveles resultan excesivos. Por otro lado, si el medicamento se absorbe con demasiada lentitud puede no llegar a alcanzar los niveles necesarios para producir el efecto o la intensidad del efecto que se espera , aun en el caso de que la dosis se haya absorbido por completo. De manera similar resulta evidente que el inicio de la respuesta farmacológica tras una dosis única de medicamento depende directamente de la velocidad a la que éste se hace disponible.

La Biodisponibilidad es un concepto que está basado en el supuesto de que los niveles de fármaco en plasma u orina pueden correlacionarse con la eficacia clínica.

Cuando se compara la biodisponibilidad entre dos o más formulaciones que contienen el mismo principio activo tomando un patrón de referencia, la primer formulación que demostró ser clínicamente eficaz (conocido como Innovador), se obtiene lo que se conoce como estudio de Bioequivalencia.

Para homogeneizar los conceptos mencionados anteriormente se dan las siguientes definiciones:

Biodisponibilidad, Disponibilidad Sistémica, Disponibilidad Fisiológica y Disponibilidad Biológica.

Todos estos términos son intercambiables y denotan la medida de la velocidad y grado (cantidad total) de fármaco que alcanza la circulación sistémica después de la administración de una forma farmacéutica.

Biodisponibilidad Absoluta.

Este término indica que la biodisponibilidad es determinada al comparar la velocidad y grado de absorción de un fármaco de un forma farmacéutica con la velocidad y grado de absorción de una administración intravenosa del fármaco.

Equivalencia.

Este es un término comparativo, el cual presume que un producto farmacéutico es similar respecto a una característica específica o función a otro producto farmacéutico, o a un conjunto definido de estándares. Existen diferentes tipos de equivalencia:

*Equivalencia Química.- Este término implica que dos o más productos tienen la misma sustancia química como principio activo y que cumplen con los requerimientos de control de calidad.

*Bioequivalencia.- Término relativo que indica que el fármaco en dos o más formulaciones similares alcanza la circulación sistémica a la misma velocidad relativa y en la misma cantidad; en otras palabras, los perfiles de niveles sanguíneos después de la administración de los productos son superponibles dentro de una variación estadísticamente esperada.

*Equivalencia Clínica.- Término que denota que el fármaco en dos o más formas farmacéuticas muestra una respuesta farmacológica idéntica y puede controlar los síntomas de una enfermedad en el mismo grado.

*Equivalencia terapéutica.- Un medicamento es terapéuticamente equivalente a otro producto, si éste contiene la misma sustancia activa o molécula terapéutica y muestra clínicamente la misma eficacia y seguridad que el primer producto para el cual la eficacia y seguridad han sido establecidas. Considerando que la bioequivalencia mide los niveles plasmáticos y la equivalencia terapéutica determina la eficacia clínica, estos términos no son intercambiables.

*Bioinequivalencia.- Es un término que indica que existen diferencias estadísticamente significativas en la biodisponibilidad de dos o más formulaciones teniendo el mismo principio activo.

2.3 DETERMINACION DE LA BIOEQUIVALENCIA Y ASPECTOS REGULATORIOS

2.3.1. Consideraciones regulatorias al determinar la biodisponibilidad y bioequivalencia

El 7 de enero de 1977, la FDA (Food and Drug Administration), estableció los requerimientos para los estudios de Biodisponibilidad y Bioequivalencia *in vivo*, efectivos a partir de julio del mismo año. De acuerdo a tal reglamentación, cada estudio debe incluir la evidencia que demuestre la biodisponibilidad *in vivo* del medicamento o la información adecuada que le permita aprobar tales reglamentos. Además, cualquier cambio en la formulación o en el proceso de manufactura, nuevas indicaciones para el uso del medicamento o cualquier cambio en la dosificación para establecer un nuevo régimen de dosificación,

también deberán documentar la biodisponibilidad. Tales reglamentaciones aparecieron en el Federal Register, 21 CFR, Capítulo 1 (Ed. 4-8), parte 320(30).

2.3.2. Sugerencias para determinar la Biodisponibilidad *in vivo*

- a) Determinar las concentraciones del fármaco y/o sus metabolitos en un fluido biológico en función del tiempo.
- b) Medir la cantidad de fármaco excretada en orina y/o sus metabolitos en función del tiempo.
- c) Medir el efecto farmacológico adecuado en función del tiempo, si tal efecto puede ser medido con suficiente exactitud, sensibilidad y reproducibilidad. Esta sugerencia es aplicable cuando no existan métodos analíticos disponibles para medir la concentración del fármaco en el fluido biológico.
- d) Ensayos clínicos bien controlados en humanos que establezcan la seguridad y efectividad del medicamento. Esta sugerencia debe ser considerada como la menos exacta, sensible y menos reproducible de todas las formas de determinar la biodisponibilidad *in vivo*, en humanos y sólo aplicable cuando no existan métodos analíticos disponibles.

2.3.3. Medicamentos que no requieren demostrar biodisponibilidad o bioequivalencia(31)

- a) Preparaciones para uso intravenoso.
- b) Preparaciones tópicas, cuyos efectos sean locales, tales como cremas o ungüentos.
- c) Formas para dosificación oral que no sufran absorción sistémica tales como los antiácidos y medios radiopacos de contraste.
- d) Productos administrados por inhalación en forma de gas o vapor, como los anestésicos.
- e) Soluciones orales, elixires, tinturas, jarabes u otras formas solubilizadas similares conteniendo un principio activo previamente aprobado y sin excipientes que pudieran afectar la absorción del activo.
- f) Medicamentos que hayan demostrado ser efectivos mediante un Estudio de Eficacia Clínica y que no se encuentre incluido en la lista de la FDA como fármaco con problemas de biodisponibilidad.
- g) Productos parenterales que han sido efectivos en al menos una indicación en estudios de eficacia clínica o que demuestren contener los mismos ingredientes

activos y excipientes que un producto similar que haya sido aprobado previamente, a excepción de algunos fármacos como en el caso de la Fenitofina.

2.3.4. Productos que requieren de estudios de biodisponibilidad o bioequivalencia

Se debe demostrar la biodisponibilidad/bioequivalencia de productos cuando:

- a) Se tenga evidencia, de estudios clínicos bien controlados en humanos, que tales productos no presenten un efecto terapéutico comparable.
- b) Evidencia de que el producto tiene un estrecho índice terapéutico.
- c) Evidencia clínica que indique problemas de bioequivalencia durante la terapia.

d) Ciertos factores relacionados a propiedades fisicoquímicas del fármaco afecten la velocidad y grado de absorción, como:

- 1.-Baja solubilidad en agua (<5mg/ml).
- 2.-La disolución en el estómago es crítica para la absorción.
- 3.-El volumen de líquido requerido para disolver al principio activo excede en gran medida al volumen del fluido gástrico (100ml aproximadamente en adultos).
- 4.-El tamaño de partícula y/o area superficial es crítico para la absorción.
- 5.-Ciertas características estructurales tales como formas polimórficas, solvatos o complejos que se disuelven pobremente y pueden afectar la disolución o la biodisponibilidad.
- 6.-El medicamento tiene una alta relación excipientes/principio activo, por ejemplo 5:1.
- 7.-Los excipientes en la formulación tienen propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas muy altas y son añadidos para mejorar la absorción, o si la presencia de tales excipientes puede interferir en la absorción.

e) Evidencia de estudios farmacocinéticos indicando que:

- 1.-El fármaco es absorbido principalmente en un sitio muy particular del tracto gastrointestinal.
- 2.-El grado de absorción del fármaco es muy bajo (<50%) comparado con una administración intravenosa, aún cuando el fármaco es administrado en solución.

3.-Indicaciones de que el fármaco se metaboliza rápidamente en la pared intestinal o en hígado durante el proceso de absorción de tal forma que la respuesta biológica del fármaco es dependiente tanto de la velocidad como del grado de absorción.

4.-El fármaco es excretado o metabolizado rápidamente y por lo tanto se requiere una absorción rápida para la efectividad del fármaco.

5.-El fármaco es inestable en áreas específicas del tracto gastrointestinal y requiere de un recubrimiento o formulación especiales.

6.-El fármaco muestra una cinética dosis-dependiente en o cerca del rango terapéutico y por ello la velocidad y grado de absorción son importantes para la efectividad clínica.

2.3.5. Bases para establecer la bioequivalencia o biodisponibilidad

a) Dos productos serán bioequivalentes cuando no existan diferencias significativas en la velocidad y grado de absorción al comparar con el patrón de referencia, apoyado por un diseño estadístico que permita observar tales diferencias.

Los estudios de biodisponibilidad en humanos proveen el método más confiable para determinar la bioequivalencia. Para verificar la biodisponibilidad es necesario comparar los niveles sanguíneos del fármaco en sangre y/o la cantidad acumulada excretada en orina después de la administración de la forma farmacéutica bajo prueba con los niveles que se obtienen de la forma farmacéutica utilizada como referencia o innovador.

Los mejores estudios *in vivo* son aquellos diseñados para revelar cualquier diferencia en la velocidad y eficiencia de absorción y la magnitud de tales diferencias.

Los niveles sanguíneos y/o las cantidades excretadas en orina pueden ser medidas después de:

*la administración de una dosis única del medicamento

*durante un intervalo de dosificación en el estado estacionario, después de la administración de una dosis múltiple del medicamento

*después de la primer dosis y durante un intervalo de dosificación en el estado estacionario después de una dosis múltiple.

La necesidad de efectuar estudios de bioequivalencia en productos ya existentes para propósitos de comparación han sido realizados por los comentarios de "The Drug Price Competition" y por "Patent Term Restoration Act" en 1984. El acta permite evaluar a los duplicados de algún producto que haya salido al mercado después de 1962, con la premisa de que el medicamento demuestre ser bioequivalente al original. Lo anterior indica que en muchos de los casos, se deberán efectuar estudios de biodisponibilidad comparativa *in vivo*. Para establecer la bioequivalencia es necesario que la absorción neta de los productos no presente diferencias significativas y que las velocidades de absorción sean tan cercanas que los perfiles de niveles sanguíneos sean muy parecidos.

El protocolo para los estudios de bioequivalencia es más simple que los que se requieren para otros estudios farmacocinéticos de un fármaco nuevo, dado que(32):

a) Al mismo grupo de voluntarios se le administraran las mismas formulaciones, por lo que los parámetros farmacocinéticos tales como el volumen aparente de distribución, las microconstantes de velocidad que controlan la transferencia entre los compartimientos y la vida media de eliminación pueden ser considerados constantes.

b) Los voluntarios están sujetos al mismo protocolo de ayuno en el estudio, la eficiencia de absorción del fármaco, después de que es liberado por la forma farmacéutica y ha sido disuelto en el fluido corporal, puede ser considerado tentativamente como la misma. Por lo tanto, las diferencias en la absorción neta del fármaco pueden ser atribuidas a diferencias en las características de liberación de la forma farmacéutica.

Se recomienda que el diseño del estudio sea cruzado, para detectar las diferencias entre las formas de dosificación en un 20% ó más.

Existe cierta controversia en cuanto a cual producto se considera como "referencia" o "producto estándar". Generalmente el primer producto en salir al mercado, conocido como innovador, se considera como la referencia.

Los intentos regulatorios para establecer criterios específicos para juzgar la bioequivalencia han generado debates acalorados dada la naturaleza del tópico y sus aplicaciones. El asunto es complicado, ya los conceptos generales y procedimientos para la medición de la bioequivalencia están basados en los conocimientos de otras dos disciplinas: Biofarmacia y Farmacocinética.

Dos puntos de mayor interés, y que son los que causan los debates, son los siguientes(33):

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Un tópico crítico es el análisis estadístico empleado. Entre estos se encuentra la regla de 75/75, donde la biodisponibilidad relativa del producto de prueba debe ser mayor o igual al 75% y menor o igual al 125% en al menos el 75% de los sujetos, en relación al patrón de referencia. Algunos estudios han demostrado que la regla puede aceptar productos disimilares o no aceptar productos similares, especialmente cuando el estudio sufre de una gran variabilidad intra e interindividual.

Otro punto de debate es la regla de poder 80/20, la cual requiere que el diseño estadístico del estudio deberá ser capaz de proveer un 80% de probabilidad de detectar diferencias de hasta un 20% en las medias de las ABC y C_{max} de las formulaciones bajo prueba. Aunque una diferencia del 20% en los fármacos con una modesta pendiente en las curvas dosis-respuesta puede ser clínicamente insignificante, la diferencia puede causar serios problemas en la terapéutica si las pendientes de la curvas dosis-respuesta no son muy parecidas. Por esta razón se ha recomendado que la regla que se emplee sea 80/10.

Actualmente son los intervalos de confianza (clásicos, Westlake)(34)(35)(36), los que dan los indicios para decidir sobre la bioequivalencia o no de los productos.

VOLUNTARIOS PARA EL ESTUDIO.

Los estudios de bioequivalencia, requieren de la participación de voluntarios sanos, jóvenes, en ayuno y de sexo masculino, de preferencia. El empleo de una población homogénea y condiciones controladas es para minimizar las diferentes variables que pueden afectar los niveles plasmáticos del fármaco durante el estudio comparativo. Sin embargo, el diseño experimental crea una población aleatorizada y condiciones artificiales que pueden cubrir las diferencias potenciales en el desempeño de la prueba bajo las condiciones reales de uso de los productos.

2.4. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA HIDROCLOROTIAZIDA(8)

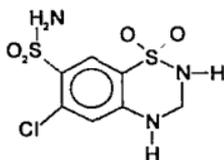
2.4.1. Nombre químico.

6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dioxido.

2.4.2. Fórmula condensada.

$C_7H_8ClN_3O_4S_2$

2.4.3. Fórmula desarrollada.



Hidroclorotiazida

2.4.4. Peso molecular.

297.72

2.4.5. Descripción.

Polvo cristalino blanco o casi blanco.

inodoro.

Punto de fusión 273°-275°.

UV_{max} (metanol+trazas de HCl) a 317,271 y 226 ($A_{1cm}^{1\%}$ 130,654,1280).

$pka_1=7.9$ y $pka_2=9.2$.

2.4.6. Solubilidad

La solubilidad en soluciones acuosas se presenta en la tabla 2.1 y la solubilidad en soluciones no acuosas se presenta en la tabla 2.2

Tabla 2.1.
Solubilidad de HCTZ en soluciones acuosas

Solvente	Temperatura (°C)	pH de la solución	Solubilidad (mg/100ml soln.)
Agua	25	6.2	60.9
Agua	37	7.2	108.0
NaCl 0.9%	25	6.1	59.4
HCl 0.1N	25	1.0	60.8
Ac. Acético 0.1N	25	2.9	63.6
Soln. Amort. de acetatos	25	4.5	62.3
Sol. amort. de fosfatos 0.067M	25	7.4	61.6
Soln. amort. de boratos 0.05M	25	8.9	103.0
Amoniaco 1M	25	11.6	2.2
NaOH 0.1N	25	10.2	1.8
Fluido gástrico simulado	37	1.1	108.0
Fluido intestinal simulado	37	7.5	109.0

Tabla 2.2.
Solubilidad de HCTZ en soluciones no acuosas

Solvente	Temperatura (°C)	Solubilidad (g/100 ml soln.)
Acetona	25	13.70
Acido acético	25	0.15
Acetonitrilo	25	2.00
Acetato de etilo	25	0.59
Cloroforno	23	0.1
Etanol (96%)	23	1.30-1.40
Metanol	23	3.90-4.10
Diclorometano	23	<0.02

2.4.7. Coeficiente de partición

El coeficiente de partición de la HCTZ, entre diferentes medios acuosos y n-octanol como fase orgánica, se presenta en la tabla 2.3.

Tabla 2.3

Coeficientes de partición de HCTZ

Medio	Coefficiente orgánico/acuoso
HCl 0.1N (pH 1.06)	1.94
Soln. Amort. glicina (pH 3.0)	0.866
Soln. Amort. Fosfatos (pH 7.4)	0.855

2.5. Farmacocinética

2.5.1. Absorción(38)(39).

Después de una dosis única intravenosa o administración oral de HCTZ marcada con ^{14}C (dosis i.v. 1, 35 y 65 mg, n=3; p.o 5, 50 y 65 mg, n=4, n=6), el 90-93 % y el 53-83 % de la dosis respectivamente fué excretado en orina. Por lo tanto la absorción de una dosis oral de una dosis del fármaco está en el rango del 60 al 80%. Se ha encontrado que la absorción se reduce en pacientes con deficiencias cardíaca, renal o hepática dado que la cantidad excretada en orina es del 40% de la dosis o menos.

Las concentraciones máximas en plasma se han encontrado entre las 3 y 4 horas.

2.5.2. Distribución(40)(41).

El patrón de distribución de la HCTZ después de una administración oral de HCTZ marcada con tritio (dosis: 5mg), revela altas concentraciones de radiactividad total en el hígado (27.8 $\mu\text{g/g}$) y en tracto gastrointestinal (36.0 $\mu\text{g/g}$) después de una hora de la administración. La concentración en plasma fue de 1.53 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en vaso, músculo y cerebro fue de 0.36 a 0.46 $\mu\text{g/g}$.

Se demostró un bajo porcentaje de unión del fármaco a albúmina sérica bovina con solo un sitio de unión.

Hasta ahora no se ha demostrado la unión de la HCTZ a las células sanguíneas.

2.5.3. Farmacocinética básica(42-45).

En voluntarios, después de una dosis oral única (n=8; dosis 12.5,25,50 y 75 mg) la concentración máxima del fármaco inalterado en plasma se encontró entre 1.5-5 horas y el área bajo la curva de 0 - 9 horas se relacionó linealmente con la dosis, Las concentraciones en relación con la dosis creciente, fueron de 70 ± 19 , 142 ± 50 , 260 ± 88 y 376 ± 70 ng/ml, respectivamente (media $\pm s_x$). La HCTZ se elimina del plasma siguiendo un modelo bicompartimental con una vida media de eliminación de 5.6 a 14.8 h. En los mismos voluntarios y con el mismo diseño estadístico, también se correlacionó la excreción urinaria con la dosis administrada. A dosis orales de 12.5, 25, 50 y 75 mg la excreción urinaria fue (0 - 48 horas) de 8.5 ± 2.0 , 17.9 ± 4.2 , 33.4 ± 8.6 y 48.9 ± 7.6 mg, respectivamente. La cantidad excretada acumulada fue del 65 al 72% de la dosis para todas las dosis administradas. La depuración renal fué independiente de la dosis: 345 ± 123 a 319 ± 86 ml/min. En 7 pacientes con falla cardíaca congestiva (dosis 50mg, n=6; 75mg, n=1) se encontraron altas concentraciones de HCTZ en plasma después de 1.5-8 horas: 282-672 ng/ml. La vida media de eliminación en plasma fue de 8.9-28.9 horas(n=6) y 3.1 horas(n=1).

En pacientes hipertensos, durante tratamientos repetidos con diferentes dosis de HCTZ (dosis 12.5, 25, 50 y 75 mg al día durante dos semanas consecutivas; 75mg durante 4 semanas adicionales) los niveles plasmáticos se relacionan al incremento de la dosis: 15 ± 7 , 17 ± 8 , 27 ± 11 y 34 ± 17 ng/ml, respectivamente. La concentración del fármaco en el estado estacionario después de 6 semanas fue de 111ng/ml. La excreción urinaria del fármaco a las 24 horas después de la administración fue de 60% de la dosis y la depuración renal fue de 317 ± 120 ml/min.

2.5.4. Biodisponibilidad.

Dado que la HCTZ se excreta casi en forma inalterada en orina en el hombre, la cantidad excretada en orina es la mejor medida de la biodisponibilidad del fármaco. Como se ha mencionado anteriormente el porcentaje excretado es independiente de la dosis: 65-72%(37).

Se ha observado que la biodisponibilidad de la HCTZ se mejora cuando se administra con alimentos (n=8, dosis $63.2 \pm 8.0\%$ - en ayuno- vs $74.2 \pm 6.5\%$ -alimentos- de la dosis medida en orina). Después de un pretratamiento de los

voluntarios con el anticolinérgico propantelina, también se vió aumentada la absorción ($n=6$, dosis 75mg; 66.9 ± 4.4 vs $49.3 \pm 5.3\%$ de la dosis en orina).

No se ha observado influencia en la biodisponibilidad de la HCTZ cuando se administró sotalol, metoprolol o hidralazina en combinación con el fármaco como polifármaco o en formas farmacéuticas por separado(46-49).

2.6. Métodos analíticos para la cuantificación de Hidroclorotiazida en fluidos biológicos.

Entre los métodos reportados para la cuantificación de HCTZ se encuentran los colorimétricos, que implican reacciones de copulación en las que se forma un compuesto colorido, sin embargo estos métodos solamente son apropiados para la cuantificación en formas farmacéuticas y no para análisis biofarmacéutico dado su inespecificidad(50-52).

Los métodos espectroscópicos propuestos en la literatura no son aplicables cuando se sabe que existen compuestos de degradación, pues nuevamente existen problemas de especificidad(53)(54).

Bower y Winefordner, reportaron una técnica a temperatura ambiente para cuantificación de HCTZ por fosforescencia y encontraron que es simple, selectivo y adecuado en la clínica(55).

Existen métodos fluorométricos, los cuales incluyen una derivatización de la HCTZ sobre placas de Cromatografía en Capa Fina (CCF). Dado que los autores del método encontraron poca reproducibilidad, recomiendan que la cuantificación se haga con el fármaco no derivatizado y aunque la sensibilidad del último método es menor, la consideran aún adecuada para los análisis en plasma humano, orina y saliva después de una administración oral de 25 mg del fármaco(56).

Los métodos cromatográficos son los más ampliamente usados para la cuantificación de HCTZ tanto en fluidos biológicos como en formas farmacéuticas. Existen métodos por Cromatografía de Gases (CG) y por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC).

Por CG la HCTZ es metilada con yoduro de metilo, empleando una técnica de extracción con agentes orgánicos. Para la cuantificación se emplea como estándar interno, la clortalidona. Las condiciones cromatográficas son las siguientes: columna SE-30 al 1% sobre Gas-Chrom Q (malla 80-100); nitrógeno como gas acarreador; la temperatura del inyector de 230°C , la temperatura de

la columna es 225°C y la del detector de captura de electrones es 300°C o detector de ionización de flama a 270°C .

Es obvio que casi todas estas técnicas por CG requieren de un tratamiento previo de la muestra, que generalmente es una extracción, ya sea del fluido biológico o de la forma farmacéutica, un ejemplo de lo anterior es la técnica citada por Lindström *et al* (57). Los métodos de cuantificación por HPLC incluyen una gran variedad de columnas y fases móviles.

En la tabla 2.4. se resumen algunos ejemplos de columnas y fases móviles empleadas en cromatografía de líquidos :

Tabla 2.4. Fases móviles y columnas empleadas en HPLC, para cuantificar a la HCTZ

Ref	Columna	Fase móvil	Tipo muestra
58	CSP int. iónico/Zipax 30µm, 1000X2.1mm	Na ₂ SO ₄ en soln. amort. de boratos, pH 9.2, 0.005M : MeOH (87.5:12.5)	Productos de hidrólisis de la HCTZ + HCTZ + Hidralazina
59	Corasil-C18, 220X2.3mm	Hacer pruebas	Mezclas artificiales de antihipertensivos
9	Corasil-fenilo, 1220X2.3mm	Hacer pruebas	Mezclas artificiales de antihipertensivos
1	µ-Bondapak C18, 300X4mm	NaH ₂ PO ₄ en agua 0.01M : Metanol (80 : 20)	suero orina
60	Lichrosorb SI60, 5µm, 250X2.1mm	n-hexano:2-propanol:cloroformo: dietilamina (76.99:17.99:4.99: 0.03)	Tabletas: HCTZ + reserpina
61	Lichrosorb 5µm, 500X4.4mm	n-hexano:etanol (55 : 45)	Suero
62	Nucleosil 10-CN 10µm, 200X4.8mm	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S 0.01M:2-propanol:H ₂ SO ₄ 0.1N (75:20:5)	Tabletas: HCTZ + reserpina + hidralazina
9	Spherisorb ODS 10µm, 250X3mm	Agua : Metanol (85 : 15)	Suero (gel filtrado)

Las condiciones de detección en estos métodos son en su mayoría por espectrometría UV, eliminándose con la separación cromatográfica los problemas de especificidad.

Se han desarrollado métodos especiales para cuantificar a HCTZ en plasma y orina cuando se encuentra combinado en la forma farmacéutica con otros fármacos como triamtereno(27), métodos que visualizan la separación de HCTZ de plasma y orina y su cuantificación por HPLC(63)(64)(65)(66)(67), cuantificación en plasma o suero (68)(69) y métodos para la cuantificación de HCTZ en orina (70)(71).

Se cuenta con métodos tan sencillos como el que reporta Cooper *et al*, en donde se requiere de 1 ml de plasma u orina, se realiza una extracción con acetato de etilo y una re-extracción con hidróxido de sodio 0.1N. La solución se inyecta en una columna fase inversa C₁₈, el eluyente es metanol-0.01M NaH₂PO₄ (1:4), la detección es por UV a 271 nm. Los recobros en plasma son del 98.2±3.7% (n=9) en un rango de 200 - 800ng/ml, en orina se obtiene un recobro de 91.5±2.5 (n=8) en un rango de 20 - 100 µg/ml. Cooper *et al*, reporta que no hay interferencia en el método cuando la HCTZ se combina con los siguientes fármacos:azatiopirina, clortalidona, guanetidina, metildopa, minoxidil, prednisona y espirolactona(72).

Alton *et al*, reportan otro método de cuantificación en orina mediante la separación de HCTZ y el estándar interno triclorometiazida, en una columna µ-Bondapak Fenilo, en donde después de una extracción con solventes orgánicos, se lleva a cabo la separación cromatográfica y la detección es por UV a 280 nm, el método es lineal hasta los 50 µg/ml, sin observarse interferencias debidas a la matriz(70).

Koopmans *et al* realizan una extracción previa a la separación con metanol, acetato de etilo y solución amortiguadora de acetatos (pH=3.8 para plasma y pH=5.0 para orina), sin embargo con la fase móvil propuesta los tiempos de retención son de 15 a 20 minutos y el tiempo de preparación de la muestra es de aproximadamente 30 minutos y aunque los autores reportan el método como simple, rápido y específico, empleando como estándar interno a la clorotiazida, no es el más idóneo de los métodos de análisis encontrados(65).

Por último, en el método propuesto por Barbhayia *et al*, se desarrolló un método cromatográfico para la determinación de HCTZ y Clorotiazida en orina y plasma, en el cual se realiza un tratamiento previo al análisis cromatográfico, una extracción con una solución amortiguadora de acetatos (pH=5.0) y acetato

de etilo, las condiciones cromatográficas son similares a las reportadas por otros autores: Columna C18, fase móvil de acetonitrilo al 4% en perclorato de sodio 0.01M con pH de 4.6, una velocidad de flujo de 2.5 ml/min y tiempos de retención de hasta 13.5 minutos(63).

2.7. Aspectos farmacológicos de la Hidroclorotiazida(73)

Durante las últimas tres décadas, el tratamiento efectivo de la hipertensión ha reemplazado el tratamiento radical de la hipertensión maligna y la indiferencia terapéutica hacia la "hipertensión benigna esencial". La morbilidad y mortalidad han disminuido con el desarrollo de agentes efectivos para reducir la presión arterial. Han surgido pautas lógicas para el manejo de la hipertensión y se ha implementado ampliamente un tratamiento efectivo.

La hipertensión es definida en general como una elevación de la presión sistólica y/o diastólica y en general se acepta un valor de 140/90 mmHg como el límite superior de normotensión. Ciertos factores de riesgo (por ejemplo, hipercolesterolemia, diabetes, tabaquismo y antecedentes familiares de enfermedad vascular) junto con la hipertensión predisponen a la arteriosclerosis y consiguiente morbilidad y mortalidad cardiovasculares. Las poblaciones de pacientes con una presión diastólica sostenida en el espectro de 105 a 129 mmHg se benefician inequívocamente con una reducción efectiva de la presión arterial. Incluso una reducción subóptima de la presión arterial puede beneficiar a pacientes moderada a severamente hipertensos. El tratamiento de pacientes con una presión diastólica en el espectro de 90 a 104 debe individualizarse, especialmente en el extremo inferior de este espectro, cuando están ausentes otros factores de riesgo cardiovascular. Los beneficios del tratamiento antihipertensivo incluyen evitar una hipertensión acelerada o maligna, menor incidencia de insuficiencia renal hipertensiva y una reducción de la incidencia de accidente cerebrovascular hemorrágico e insuficiencia cardíaca.

Las tiazidas y derivados ftalimidínicos, estrechamente relacionados, se han convertido en la base del tratamiento antihipertensivo. Aunque se usa el término diurético, su mayor efecto hipotensor durante la administración crónica parece deberse a vasodilatación más que a saluresis o pérdida de agua libre. sin embargo, su efecto sobre la resistencia periférica puede ser secundario a cambios inducidos por diuréticos en el equilibrio del sodio.

Las tiazidas y compuestos relacionados y en especial las benzotiadiazinas tienen un patrón similar de efectos farmacológicos y en general son intercambiables (con el apropiado ajuste de la dosis). Cuando se administran de forma aguda y en dosis razonablemente grandes (por ejemplo 50 a 100 mg de hidroclorotiazida), reducen la tasa de filtración glomerular, flujo sanguíneo renal y presión arterial media. Crónicamente, sin embargo, el efecto hipotensor de las tiazidas se observa con dosis mucho menores que las necesarias para una saluresis, kaluresis o pérdida de agua libre. La fracción de filtración urinaria, resistencia vascular renal y actividad de renina en plasma aumentan moderadamente. Con el uso crónico, se recupera parte del volumen plasmático perdido inicialmente, pero permanece aproximadamente un 5% por debajo de los valores pretratamiento. El volumen minuto y tasa de filtración glomerular retornan a valores casi normales, mientras que la presión arterial media permanece baja y la resistencia vascular sistémica disminuye.

Dado que las tiazidas potencian el efecto antihipertensor de otros agentes que tienen diferentes mecanismos de acción, su uso con otros fármacos antihipertensivos es racional y común. No hay forma de predecir la respuesta antihipertensiva a las tiazidas a partir de la duración o severidad de la hipertensión en un paciente dado, aunque es poco probable que sean efectivas cuando se usan solas en la hipertensión severa.

Los efectos hemodinámicos de las tiazidas hacen surgir interrogantes en cuanto a la naturaleza de su mecanismo de acción como agentes antihipertensivos. Probablemente, sus efectos sean múltiples e incluyan reducción del volumen de líquido intersticial con la consiguiente reducción de la rigidez de la pared vascular y aumento de la distensibilidad vascular. Dado que aumentan la actividad de renina en plasma y las concentraciones de noradrenalina y aldosterona en plasma como reacciones compensadoras al uso de tiazidas, la menor disponibilidad de estas sustancias no es responsable de los efectos hipotensores, puesto que los pacientes anéfricos no muestran una reducción en la presión arterial cuando reciben tiazidas.

Las tiazidas actúan directamente sobre el riñón, aumentando la excreción de cloruro de sodio y un volumen acompañante de agua; también aumentan la excreción de potasio. La potencia de las tiazidas varía ampliamente como inhibidores de la anhidrasa carbónica. Aquellas que son activas en este aspecto pueden, con una dosis suficiente, tener el mismo efecto sobre la excreción de

bicarbonato que la acetazolamida. Sin embargo, este fenómeno rara vez se encuentra en la clínica.

Las tiazidas son secretadas activamente en el túbulo proximal. Esta secreción puede ser reducida por competidores como el probenecid. En algunas circunstancias el probenecid puede inhibir la respuesta diurética de las tiazidas, sugiriendo que el diurético puede estar en el líquido tubular para ejercer su efecto. El principal sitio de acción de las tiazidas es el túbulo distal.

La velocidad de filtración glomerular puede reducirse con las tiazidas, especialmente con la administración intravenosa. Esto se debe presumiblemente a una acción directa sobre los vasos renales. Tiene poco significado en la interpretación de la acción primaria de los fármacos, pero puede tener importancia clínica, particularmente en los pacientes con reserva renal disminuida. Las tiazidas inducen la excreción de potasio, efecto que se aprecia más en estudios agudos; a diferencia de los demás agentes natriuréticos, las tiazidas disminuyen la excreción renal de calcio, como resultado de una acción directa sobre el túbulo distal.

Los agentes más usados son la clorotiazida y la hidroclorotiazida en dosis de 1- 1.5 g y 50 - 150 mg, respectivamente, en dosis diarias fraccionadas.

2.8 Aspectos farmacológicos de la Amilorida(73)

La amilorida es un agente diurético ahorrador de potasio, posee una moderada acción natriurética, suficiente para el mantenimiento de algunos pacientes; sin embargo se le usa con mayor frecuencia por sus efectos sobre la excreción de K^+ . La amilorida interfiere con el transporte en los segmentos distales de la nefrona. Induce un moderado aumento en la excreción del Na^+ , acompañado principalmente por cloruro como anión. En circunstancias comunes existe poca variación en la excreción de K^+ , si bien algunas veces puede observarse un leve aumento. Sin embargo cuando la excreción de K^+ es alta debido a una mayor ingesta, a la administración de otro diurético o a exceso de un mineralocorticoide, este agente causa un pronunciado descenso de su excreción. La amilorida, agente diurético ahorrador de K^+ , también puede producir una leve alcalinización de la orina, que puede atribuirse a la inhibición de la secreción de protones en la nefrona distal. Este compuesto no es inhibidor de la anhidrasa carbónica, es un inhibidor del mecanismo de intercambio de Na^+-H^+ en el túbulo proximal y de la Na^+ , K^+ -ATPasa, aun que para ello se requieren concentraciones más elevadas de las que se pueden lograr *in vivo*. La

amilorida reduce la excreción de Ca^{++} . Este agente se presenta para su uso solamente para dosificación oral, en tabletas de 5 mg y la dosis habitual es de 5mg a 10mg al día. Se absorbe alrededor del 50% y se une a proteínas en un 60%, no se metaboliza y es secretada en el túbulo proximal de la nefrona.

Algunos pacientes con edema, presentan una respuesta diurética satisfactoria a un diurético ahorrador de potasio solo. Sin embargo, los datos clínicos disponibles sugieren que la mayor utilidad de estos agentes se logra en combinación con otros diuréticos; así encontramos la combinación de Hidroclorotiazida-Amilorida (50mg/5mg). En general, la administración de un diurético ahorrador de potasio junto con otro compuesto natriurético aumenta la natriuresis y reduce la pérdida de K^+ . En la terapia concurrente, este último efecto es el que se observa con mayor regularidad, en consecuencia, la justificación de una terapia concomitante con otro agente está relacionada principalmente con el metabolismo del K^+ .

2.9.HCTZ COMO FARMACO CON PROBLEMAS DE BIOEQUIVALENCIA

La Hidroclorotiazida (HCTZ), es un diurético ampliamente prescrito, ocupa el lugar # 17 entre los fármacos de mayor uso en los Estados Unidos y en México es ampliamente empleado en Institutos como el Instituto Nacional de Cardiología(I.N.C.). Es reativamente insoluble en fluidos acuosos y por lo tanto, tiene el potencial de ser pobremente absorbido en el tracto gastrointestinal. En 1973 el Reporte del Ad Hoc Committe on Drug Product Selection de la Academy of General Practice of Pharmacy y la Academy of Pharmaceutical Sciences, caracterizaron a la HCTZ como un fármaco con "bajo o inexistente riesgo potencial" con respecto a problemas de biodisponibilidad. Un reporte de 1974 de un comité de la Academy of Pharmaceutical Sciences colocó a la HCTZ en la "Lista C", que es un grupo de fármacos a los cuales aún no se les podía ubicar si tenían o no problemas de bioequivalencia o problemas en el aseguramiento de la calidad del producto, lo cual se reflejaría en la terapia. También en 1974, el repote del Drug Bioequivalence Study Panel a la Office of Technology Assesment (OTA) incluyó a la HCTZ en una lista de 24 fármacos "para los cuales, se han demostrado diferencias en biodisponibilidad de productos químicamente equivalentes"(29).

Prescott y Nimmo, en 1971, discutiendo observaciones de inequivalencia de genéricos en sujetos humanos, listaron 14 ejemplos de fármacos inequivalentes entre los cuales se encuentra HCTZ (74), así mismo por lo menos un reporte indica que la formulación del producto puede afectar la biodisponibilidad de la HCTZ en las formas farmacéuticas(75), también ha sido catalogado por FDA, OMS, Prescription Drugs, Federal Register, Hew Publications y Euroducoment como un fármaco con problemas potenciales de biodisponibilidad. Además de lo que ya se mencionó, en México no existe la HCTZ como monofármaco, sino que existe combinado con fármacos como amilorida, lisinopril, triamtereno, metoprolol, timolol, metildopa, enalapril y captopril y todo ello aunado a que no existen reportes de la bioequivalencia de productos nacionales conteniendo el principio activo HCTZ, hacen de este fármaco una entidad interesante para realizar estudios de bioequivalencia.

III

Parte Experimental

3.1. Estándares y productos empleados en el estudio

Se emplearon Hidroclorotiazida y Amilorida estándar secundario, los cuales fueron donados por Laboratorios ICI División Farmacéutica.

Los productos nacionales comerciales que se emplearon en el estudio de bioequivalencia fueron adquiridos en las farmacias, siendo: Moduretic (lotes MZ61 y MZ555, de Laboratorios Prosalud), Rhefluin (lotes 91352 y 92018, de Laboratorios Siegfried de México).

El producto innovador Hidrodiuril (lote N° 50489) de MSD, fue donado amablemente por CAFET SA, de CV

Los productos nacionales : Moduretic y Rhefluin; contenían 50 mg de Hidroclorotiazida combinados con 5 mg de Amilorida, mientras que el producto innovador: Hidrodiuril; contenía únicamente 50 mg de Hidroclorotiazida.

3.2. Control de calidad de los productos.

Las pruebas de control de calidad se efectuaron de acuerdo a los lineamientos especificados en la USP XXII, debido a que esta es la Farmacopea que contenía las pruebas de control de calidad para la combinación de principios activos bajo estudio :

3.2.1. Identificación

Se llevó a cabo mediante el método de cromatografía de líquidos, descrito en la prueba de Uniformidad de Contenido. Los tiempos de retención de los picos principales obtenidos en el cromatograma de la Solución de Prueba deberán corresponder a aquellos obtenidos en la Solución Estándar.

3.2.2. Variación de peso

Se pesaron individualmente 20 tabletas, determinándose el peso promedio y la desviación estándar.

3.2.3. Uniformidad de contenido

*Solución amortiguadora de fosfatos y fase móvil: la solución amortiguadora se preparó disolviendo 13.6 g de fosfato monobásico de

potasio en 80 ml de agua, ajustado a pH de 3.0 con solución de ácido fosfórico y mezclado constante. Se aforó a 100 ml. La fase móvil se preparó con una mezcla degasificada de agua, metanol y solución amortiguadora en proporción de 71:25:4.

*Solución estándar: Se disolvió una cantidad adecuada de clorhidrato de amilorida en metanol para obtener una solución de una concentración de 1.0 mg de amilorida/ml. Se transfirieron 10.0 ml de esta solución a un matraz volumétrico de 100 ml conteniendo 100 mg de Hidroclorotiazida, exactamente pesados, y 20.0 ml de metanol. Se añadieron 4.0 ml de ácido clorhídrico, se diluyó con agua a volumen, y se mezcló. La concentración de Amilorida fue de 0.1 mg/ml y de 1.0 mg/ml para Hidroclorotiazida.

*Solución de ensayo: Se pesaron y pulverizaron finamente no menos de 20 tabletas de Hidroclorotiazida y Amilorida. Se transfirió una porción, exactamente pesada del polvo, equivalente a 5 mg de Amilorida, a un matraz volumétrico de 50 ml. Se añadieron 15.0 ml de metanol y 2.0 ml de ácido clorhídrico. Se sonicó el matraz por 10 minutos, se diluyó con agua a volumen, se sonicó por 10 minutos más, se mezcló y se filtró.

*Sistema cromatográfico: El cromatógrafo de líquidos estaba equipado con un detector de onda variable a 286 nm y una columna de 3.9 mm X 30 cm empacada con L1(C₁₈). La velocidad de flujo fue de 1.0 ml/min. Se inyectaron 5 muestras por separado de la Solución Estándar, y se registraron las respuestas de los picos como se menciona en Procedimiento. La desviación estándar relativa no deberá ser mayor al 2%, y el factor de resolución entre HCTZ y amilorida no será menor de 2.0.

*Procedimiento: Se inyectaron por separado volúmenes iguales de la solución estándar y de la solución de ensayo en el cromatógrafo, se registraron los cromatogramas, y se midió la respuesta de los picos principales y se calculó la cantidad de Amilorida y de Hidroclorotiazida por tableta.

*La prueba se realizó a 9 tabletas más.

3.2.4. Disolución

Aparato # 2 (paletas). 50 rpm.

Medio : HCl 0.1 N, 900 ml

Tiempo : 30 minutos.

Procedimiento: Se determinó la cantidad de clorhidrato de Amilorida ($C_6H_8ClN_7O.HCl$) e Hidroclorotiazida ($C_7H_8ClN_3O_4S_2$) disueltas a los 30 minutos al UV a una longitud de máxima absorción a 363 nm para Amilorida y 270 nm para Hidroclorotiazida, en porciones filtradas de la solución bajo prueba, adecuadamente diluidas con HCl 0.1 N. Para disolver a los estándares y preparar las soluciones de referencia se empleó un 2% de metanol, respecto del volumen total.

3.3 Método analítico para cuantificar HCTZ en orina

3.3.1. Equipo

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Waters-Millipore, equipado con una bomba Waters M-45, detector Waters modelo 481, integrador Waters 745-b Data Module, inyector manual Perkin Elmer modelo 7125 con un loop de inyección de 20 ml.

Columna fase inversa, Spherisorb C₁₈ de 25X0.46 cm de 5mm de tamaño de partícula.

Agitador vortex Thermolyne, modelo 16700.

Centrífuga Damon/IEC Division, modelo IEC HN-SII.

Balanza analítica Sartorius, modelo 1801.

Evaporador de solventes.

Sistema de filtración de líquidos Millipore.

3.3.2. Reactivos y Estándares

Metanol grado HPLC, Mallinckrodt (lote 3041).

Acetato de etilo grado HPLC, Optima (lote 900540).

Tolueno R.A., Mallinckrodt (lote 8608 KMNR).

Acido ortofosfórico R.A., Merck (lote 809581).

Acido clorhídrico R.A., Merck (lote 70698).

Agua destilada.

Agua deionizada.

Bicarbonato de sodio R.A., Mallinckrodt (lote 74120KERT).

Fosfato monobásico de sodio R.A., J.T. Baker (lote A16457).

Fosfato monobásico de potasio R.A., Mallinckrodt (lote 7100KJBR).

Hidróxido de sodio R.A., Mallinckrodt (lote 7708KJCK).

Hidroclorotiazida, estándar secundario, ICI-Farma (lote ADM 4427C91).

Amilorida, estándar secundario, MSD-Prosalud (lote 1779).

Sulfadiazina, estándar secundario, Laboratorio de Biofarmacia.

3.3.3. Preparación de las soluciones.

***Solución de Hidróxido de sodio 10^{-4} M:**

Se disolvieron 0.4 g de Hidróxido de sodio y se llevo al aforo a 1000 ml. De esta solución se tomó una alcuota de 1 ml y se llevó al aforo con H_2O a 100 ml, esta segunda solución tiene una molaridad 10^{-4} M.

***Solución amortiguadora de fosfatos (pH=3.0):**

Se disolvieron 13.6 g de fosfato monobásico de potasio en 80 ml de agua, se ajustó el pH a 3.0 con ácido fosfórico, se mezcló y se llevó al aforo con H_2O a 100 ml.

***Solución de fosfato monobásico de sodio 0.01M:**

Se disolvieron 1.3799 g de fosfato monobásico de sodio en agua, llevando al aforo con H_2O a 1000 ml, esta solución se filtró después de su preparación.

***Solución de ácido clorhídrico 1N:**

Se tomaron 4 ml de ácido clorhídrico concentrado y se llevo al aforó con H_2O a 50 ml.

***Solución patrón de Hidroclorotiazida:**

La solución stock de Hidroclorotiazida se preparó colocando 10 mg del fármaco en un matraz volumétrico de 100 ml, disolviendo con 2 ml de metanol y llevando al aforo con agua o con orina según sea la curva patrón que se requiera. Esta solución tiene una concentración de 100 μ g/ml de hidroclorotiazida.

***Solución patrón de Amilorida:**

Se colocaron 10 mg del fármaco en un matraz volumétrico de 100 ml, se añadieron 2 ml de metanol y se llevo al aforo con agua. Esta solución tiene una concentración de 100 μ g/ml de amilorida.

***Solución de sulfadiazina (estándar externo):**

Se disolvieron 10 mg de sulfadiazina en un matraz volumétrico de 100 ml con solución de hidróxido de sodio 10^{-4} M. Esta solución tiene una concentración de 100 μ g/ml de sulfadiazina.

3.3.4. Procedimiento de extracción.

El método analítico empleado fué propuesto por Cooper y col.(72), con algunas modificaciones:

En un tubo de vidrio con tapón rosca se colocó 1 ml de orina conteniendo a la hidroclorotiazida (HCTZ), se añadieron 250 mg de bicarbonato de sodio y 2 ml de acetato de etilo, se agitó por 1 minuto en

agitador vortex. Se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. se dejó reposar por 1 minuto, la fase acuosa se descartó y se tomó 1 ml de la fase orgánica, la cual fue transferida a otro tubo de ensayo, donde se evaporó a sequedad en baño maría 50°C y bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo se reconstituyó con 0.5 ml de hidróxido de sodio 10^{-4} M, en el cual fué disuelto el estándar externo en concentración de 10 µg/ml. Por último se inyectaron 20 µl al cromatógrafo.

Para el análisis de los cromatogramas se eligió tomar las alturas de los picos en vez de las áreas bajo la curva, pues se ha reportado una menor variación(66).

El procedimiento se esquematiza en la figura #3.1.

3.3.5. Condiciones cromatográficas para el análisis.

El análisis se llevó a cabo utilizando una columna cromatográfica de fase inversa Spherisorb C₁₈, de 25 X 0.46 (d.i.) cm. La fase móvil empleada fue MeOH-NaH₂PO₄ 0.01M, 20:80 (v/v), a un flujo de 1.0 ml/min, la longitud de onda en el detector fue de 271 nm con una sensibilidad de 0.1 AUFS.

3.4 Validación del método analítico para la cuantificación de Hidroclorotiazida en orina.

Con el fin de contar con un método analítico confiable, se evaluaron los parámetros de linealidad, recuperación, estabilidad, repetibilidad, tolerancia, especificidad, cantidad mínima detectable y cantidad mínima cuantificable.

3.4.1. Linealidad

Se prepararon 3 curvas en orina, conteniendo HCTZ en el rango de concentración de 1 a 100 µg /ml, las cuales se analizaron por el procedimiento descrito en la sección 3.3.4. Se graficó la relación de alturas, HCTZ/SDZ, con respecto a la concentración de HCTZ a fin de determinar si la respuesta era lineal.

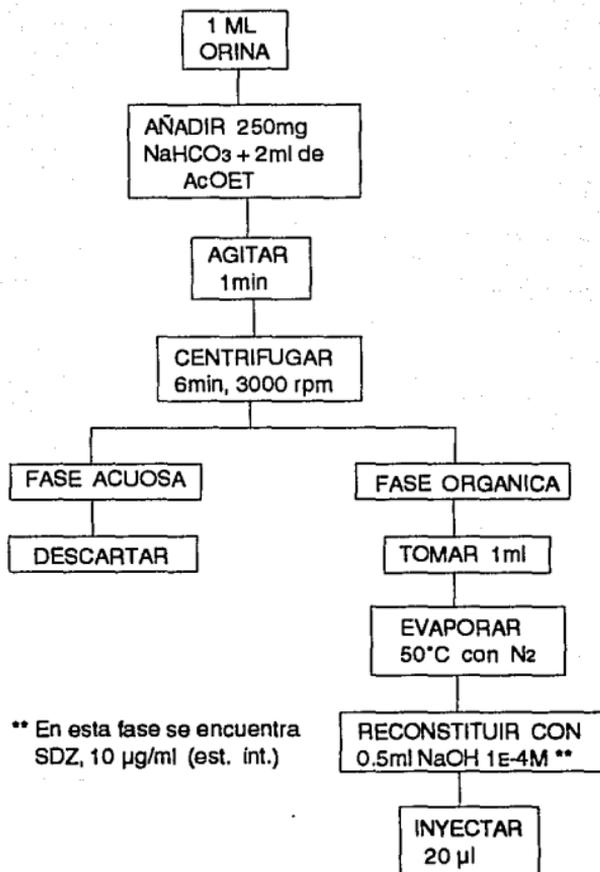


Figura 3.1. Técnica de extracción de HCTZ en orina

3.4.1.1. Curva patrón de HCTZ en orina.

Se preparó una solución stock de HCTZ en orina de la siguiente forma:

Se pesaron 10 mg de HCTZ, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 ml, se añadieron 2 ml de metanol y se llevó al aforo con orina, esta solución stock tiene una concentración de 100 µg/ml.

De la solución stock de HCTZ en orina (conc. 100 µg/ml) se hicieron las siguientes diluciones con orina libre de fármaco:

1 ml se diluyó y aforó a 10 ml	(conc. 10 µg/ml)	Solución A
2 ml se diluyeron y aforaron a 10 ml	(conc. 20 µg/ml)	Solución B
5 ml se diluyeron y aforaron a 10 ml	(conc. 50 µg/ml)	Solución C
8 ml se diluyeron y aforaron a 10 ml	(conc. 80 µg/ml)	Solución D
1 ml de la solución A se diluyó y aforó a 10 ml	(conc. 1 µg/ml)	Solución E

3.4.2. Precisión.

3.4.2.1. Repetibilidad

Para determinar la variabilidad en un mismo día, se analizaron seis curvas patrón de orina conteniendo HCTZ a concentraciones de 1 a 100 µg/ml y se calculó el coeficiente de variación.

3.4.2.2. Reproducibilidad

La reproducibilidad en diferentes días se determinó analizando una vez al día soluciones a la misma concentración en 4 días diferentes. Se tomó a la relación de alturas HCTZ/SDZ entre la concentración: $\{(HCTZ/SDZ) / \text{Concentración}\}$; como dato a evaluar.

3.4.3. Exactitud.

Se prepararon soluciones stock de HCTZ en solución: la solución stock se preparó como se describe en la sección 3.4.1.1., en vez de llevar al aforo con orina se llevó al aforo con agua, de esta solución stock se tomaron 2 ml y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 ml, se añadió 1 ml de la solución stock de estándar externo y se aforó con solución de hidróxido de sodio 10^{-4} M, de estas soluciones se inyectaron 20 µl al cromatógrafo

A partir de la solución stock de HCTZ en orina, se efectuó una dilución para obtener una concentración de 20 µg/ml, las soluciones resultantes se trataron mediante el procedimiento descrito en la sección 3.3.4. y fueron inyectadas al cromatógrafo.

3.4.4. Estabilidad de Hidroclorotiazida en orina.

A fin de establecer la estabilidad de HCTZ en orina, se prepararon muestras a una concentración de 20 µg/ml, se dividieron en tubos de ensayo y se guardaron en congelación (-4°C) hasta el momento de su análisis. Se tomaron muestras a tiempo cero y a intervalos de una semana durante seis semanas y se analizaron mediante el método descrito en la sección 3.3.4.

3.4.5. Especificidad.

Se analizaron muestras de orina libre de fármaco (blanco) y muestras de orina a las que se agregaron cantidades conocidas de acetaminofén, ácido acetilsalicílico y cafeína (fármacos de uso común). Además se probó especificidad respecto a otros dos fármacos que se administraron conjuntamente con HCTZ, Amilorida y Lisinopril.

3.4.6. Cantidad mínima cuantificable.

Se prepararon soluciones de orina adicionada de HCTZ en concentraciones de 0.05 a 1 µg/ml, se analizaron por el método descrito. Se tomó como concentración mínima cuantificable aquella cuyo coeficiente de variación fuera menor al 5% y que la relación promedio de alturas determinada fuese mayor al 10 veces la desviación estándar de las repeticiones efectuadas.

3.4.7. Cantidad mínima detectable.

Se prepararon diluciones de una solución conteniendo 1 µg/ml, hasta tener la cantidad mínima detectable, teniendo presente que la cantidad mínima detectable es aquella en la que la relación de alturas de los picos (señal de la HCTZ y señal del ruido del sistema), es 3 a 1.

3.4.8. Tolerancia.

Esta prueba se realizó para evaluar la tolerancia del sistema a cambio de la proporción de los solventes en la fase móvil hasta en un 50%, el cambio en el número de platos teóricos en la columna cromatográfica, la marca de columna cromatográfica y la marca de solvente (metanol).

3.5. Estudio de Bioequivalencia de dosis única en productos comerciales conteniendo Hidroclorotiazida y Amilorida.

3.5.1. Estudio preliminar de Bioequivalencia.

Antes de realizar el estudio de bioequivalencia, se realizó un estudio preliminar para establecer los tiempos de muestreo. En el estudio preliminar participó un voluntario sano con las siguientes características:

Sexo: Masculino

Peso: 65 kg

Edad: 23 años

Estatura: 1.76 m

Los tiempos de muestreo para este estudio preliminar fueron los siguientes: 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 37y 48 horas (27)(28)(29). El estudio se realizó con una dosis única, con uno de los productos comerciales (Moduretic, lote MZ555). Con este primer voluntario se siguió el mismo protocolo que con el resto de los voluntarios y que se describe más adelante.

3.5.2. Estudio de Bioequivalencia.

El estudio se llevó a cabo en 9 voluntarios (5 hombres y 4 mujeres), entre los 23 y 28 años de edad y clínicamente sanos, los cuales fueron informados de los objetivos, propósitos y efectos colaterales del medicamento (Apéndices B y C), y firmaron una hoja de consentimiento (Apéndice A). En la tabla # 3.1 se presentan las características físicas de cada uno de los voluntarios que participaron en el estudio.

Tabla 3.1. Características físicas de los voluntarios que participaron en el estudio de Bioequivalencia de productos conteniendo HCTZ

Voluntario	Edad (años)	Peso (kg)	Estatura (m)	Sexo
1	23	72	1.79	M
2	24	52	1.65	M
3	23	78	1.79	M
4	24	60	1.71	M
5	24	67	1.79	M
6	23	65	1.68	F
7	24	55	1.54	F
8	28	62	1.60	F
9	23	50	1.65	F

El estudio se llevó a cabo con una dosis única del producto comercial conteniendo HCTZ (50mg) y Amla (5mg), una vez por semana durante tres semanas, siguiendo un diseño de cuadrado latino 3 X 3. A cada voluntario se le asignó una clave y fue asignado al azar a uno de los tres grupos siguiendo la secuencia de tratamiento de acuerdo al diseño que aparece en la tabla # 3.2.

Todos los voluntarios recibieron los productos nacionales (Moduretic y Rhefluin) y el innovador (Hydrodiuril). Los medicamentos se administraron con 250 ml de agua, proporcionando 100 ml de agua cada hora durante las primeras cuatro horas, posteriormente la ingestión de agua fué *ad libitum*.

Se colectaron muestras de orina a las 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 10 12, 24, 30, 38 y 48 horas después de la administración del medicamento (las 0 horas sirvió como blanco), . A todas las muestras de orina se les añadió una gota de tolueno como conservador, se les midió el volumen y se guardó una alícuota en tubo de ensaye, la cual se almacenó en congelación (-4°C) hasta el momento de su análisis, empleando el método cromatográfico descrito en la sección 3.3.4.

3.5.3. Análisis Estadístico de los datos

Los datos obtenidos se analizaron utilizando un paquete especializado para este tipo de estudios: Biopak, versión 2.0 de SCI.

Tabla # 3.2. Diseño del tratamiento seguido en el estudio de bioequivalencia

Grupo	Fase I	Fase II	Fase III
A	1	H	2
B	2	1	H
C	H	2	1

1 = Rhefluin lote 91352

2 = Moduretic lote MZ555

H = Hidrodiuril lote 50489 (Innovador)

IV

Resultados

4.1. Control de Calidad de los productos

Se utilizaron las siguientes claves para identificar los productos bajo estudio:

M1 = Moduretic lote MZ61

M2 = Moduretic lote MZ555

R1 = Rhefluin lote 91352

R2 = Rhefluin lote 92018

4.1.1. Identidad

Los tiempos de retención de los picos correspondientes a HCTZ y a Amilorida, en la solución estándar y en el producto, fueron de 7 y 8.1 minutos respectivamente.

4.1.2. Variación de peso y 4.1.3. Uniformidad de Contenido

En la tabla # 4.1 se muestran los datos referentes a la prueba de variación de peso y uniformidad de contenido de los productos estudiados.

Tabla 4.1. Resultados de las pruebas de control de calidad
Variación de peso y Uniformidad de contenido

Variación de Peso

	Media (g)	C.V. (%)	max	min
M1	0.236	1.16	0.248	0.224
M2	0.237	0.85	0.248	0.225
R1	0.260	2.6	0.273	0.247
R2	0.247	0.95	0.259	0.235

Uniformidad de contenido

	HCTZ Media (mg)	HCTZ C.V. (%)	Amia Media (mg)	Amia C.V. (%)
M1	49.5	1.4	5.3	1.4
M2	48.7	1.1	4.8	1.1
R1	46.4	1.9	5.3	1.9
R2	47.1	3.8	5.1	3.8

4.1.4 Disolución.

En la tabla # 4.2 se muestran los porcentajes disueltos para los principios activos en ambos productos.

Tabla # 4.2. Porcentaje Disuelto
a los 30min, 50rpm, app#2
Medio:900 ml HCl 0.1 N

Producto	% HCTZ \pm SD	% Amia \pm SD
M1	78 \pm 1.94	87 \pm 3.83
M2	81 \pm 1.41	87 \pm 2.30
R1	83 \pm 1.08	91 \pm 9.47
R2	79 \pm 1.78	89 \pm 3.59

4.2. Validación del método analítico para cuantificar HCTZ en orina.

En la figura #4.1 se muestran los cromatogramas típicos obtenidos de:

- A.- Solución conteniendo HCTZ y SDZ (est. ext).
- B.- Muestra blanco.
- C.- Orina blanco adicionada de SDZ (est. ext.).
- D.- Orina blanco adicionada con HCTZ y SDZ (est. ext.).

4.2.1. Linealidad.

En la figura #4.2 se muestra la linealidad del método empleado para la cuantificación de HCTZ en orina en el rango de concentración de 1 - 100 μ g/ml. Mediante un análisis de regresión por mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la línea recta con una pendiente de 0.0545, un intercepto de 0.012 y un coeficiente de correlación de 0.9996, por lo que la ecuación que describe la línea es la siguiente:

$$Y = 0.0545X + 0.012 .$$

4.2.2. PRECISION.

4.2.2.1. Repetibilidad

En la tabla # 4.3, se muestran los resultados correspondientes a la repetibilidad del método analítico, en el rango de concentraciones de 1 a 100 μ g/ml.

Tabla #4.3. Repetibilidad del método
datos en Altura Relativa/Conc.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Media \pm D.E.	% C.V.
1	0.0614 \pm 0.0004	2.88
10	0.0601 \pm 0.0018	4.08
20	0.0601 \pm 0.0023	5.74
50	0.0611 \pm 0.0022	4.92
80	0.0602 \pm 0.0019	4.82
100	0.0583 \pm 0.0037	9.77

4.2.2.2. Reproducibilidad

En la tabla # 4.4, se muestran los resultados correspondientes a la reproducibilidad del método analítico, en el rango de concentraciones de 1 a 100 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla #4.4. Reproducibilidad del método.
Datos en Aturas Relativas /Conc.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Media \pm D.E.	% C.V.
1	0.0634 \pm 0.0029	4.57
10	0.0583 \pm 0.0029	5.06
20	0.0568 \pm 0.0038	6.85
50	0.0572 \pm 0.0043	7.79
80	0.0518 \pm 0.0018	3.28
100	0.0527 \pm 0.0027	4.49

4.2.3. Exactitud.

En la tabla # 4.5 se observan los datos de exactitud del método empleado para la cuantificación de HCTZ en orina, a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla # 4.5. Porcentaje de extracción promedio
Datos promedio

HCTZ/SDZ Solución	HCTZ/SDZ Extracción	% Extracción
1.3024	1.2389	95.13

4.2.4. ESTABILIDAD.

En la tabla # 4.6 se muestran los datos promedio de relación de alturas, obtenidos al evaluar la estabilidad de HCTZ en muestras de orina mantenidas en congelación.

Tabla # 4.6. Datos de estabilidad de HCTZ en orina mantenida a -4°C

Concentración (µg/ml)	Semana	HCTZ/SDZ
20.0	0	1.19
20.0	1	1.12
20.0	2	1.09
20.0	3	1.03
20.0	4	0.95
20.0	5	0.75

4.2.5. ESPECIFICIDAD.

No se detectaron picos que correspondieran a los fármacos empleados en las pruebas blanco, tampoco se detectaron alteraciones en las lecturas de las alturas de los picos al utilizar soluciones de orina cargadas con HCTZ y los fármacos de prueba.

4.2.6. CANTIDAD MINIMA CUANTIFICABLE.

La cantidad mínima cuantificable fue de 50 ng/ml.

4.2.7. CANTIDAD MINIMA DETECTABLE.

La cantidad mínima detectable fue de 10 ng/ml.

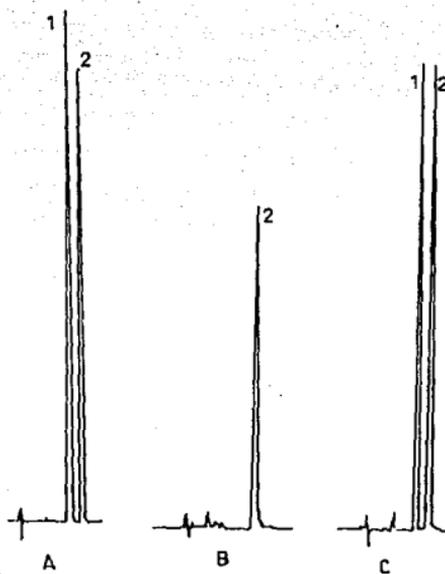


Figura # 4.1. Cromatogramas típicos de:
A) Solución con HCTZ y SDZ
B) Extracto de orina blanco y
C) Extracto de orina conteniendo HCTZ y SDZ
Los tiempos promedio de retención son :
1) HCTZ : 7.95 minutos
2) SDZ : 9.45 minutos.

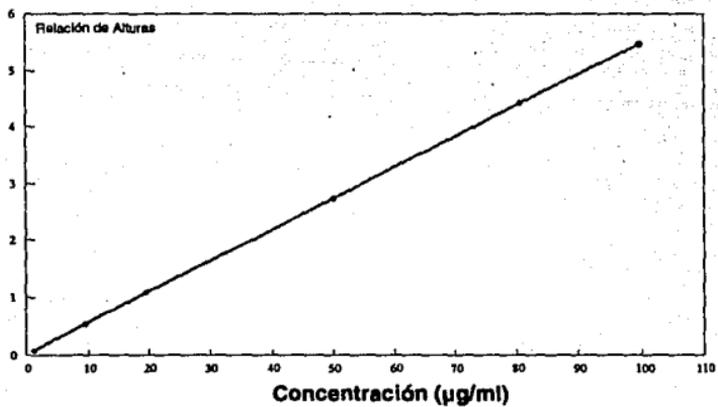


Figura 4.2. Linealidad del método analítico

4.2.8. TOLERANCIA.

* Se encontró que al cambiar la fase móvil en un 50% en el MeOH (MeOH-NaH₂PO₄ 0.01M -10:90-), el tr va hasta 15 minutos en vez de ser menor a 10 minutos, sin embargo la resolución de los picos sigue siendo buena.

* Al trabajar con una columna con 10000 platos teóricos/m se obtienen los valores óptimos de R y tr (factor de 2 y 10 minutos, respectivamente); cuando el número de platos teóricos cambió a 3000, R disminuyó a 0.5, pero cambiando el flujo a 0.6 ml/min se logra el valor de R mayor a 1.5 aunque tr es mayor de 15 minutos.

R y tr son parámetros cromatográficos que nos indican la resolución del sistema y el tiempo de retención, respectivamente,

* Se probaron columnas Alltech y Spherisorb obteniendo buenos resultados.

4.3 Estudio de Bioequivalencia de productos comerciales conteniendo Hidroclorotiazida y amilorida.

4.3.1. ESTUDIO PRELIMINAR.

En la tabla # 4.7, se muestran los resultados obtenidos del estudio preliminar, empleando para tal estudio el producto Moduretic lote MZ555.

A los datos obtenidos se les analizó utilizando el método sigma menos, velocidad de excreción y además se graficó la cantidad excretada acumulada en función del tiempo.

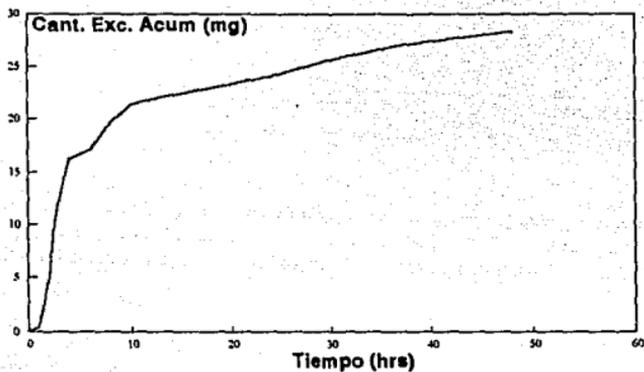
En la figura #4.3 se muestran la gráfica de Cantidad Excretada Acumulada en función del tiempo

En la figura #4.4 se presenta la gráfica de Velocidad de Excreción en función del tiempo

En la figura 4.5, se presenta los datos graficados utilizando el método de Cantidad remanente por excretarse (Sigma menos).

Tabla # 4.7. Resultados del estudio preliminar de bioequivalencia de HCTZ en orina

Tiempo	pH	Concentración (µg/ml)
Blanco	6	-
10 min	6	-
20	7	-
30	7	-
40	7	-
50	7	-
60	7	1.83
1:15 hrs	6	3.86
1:30	6	5.98
1:45	6	7.28
2	6	9.81
2:30	6	24.04
3	6	10.02
40	6	14.15
6	6	3.27
8	6	6.28
10	6	5.26
12	6	5.04
24	6	7.13
30	6	4.33
37	7	3.16
48	6	4.82



Fig#4.3. Cantidad acumulada excretada después de la administración de una dosis oral de HCTZ en un voluntario sano (estudio preliminar)

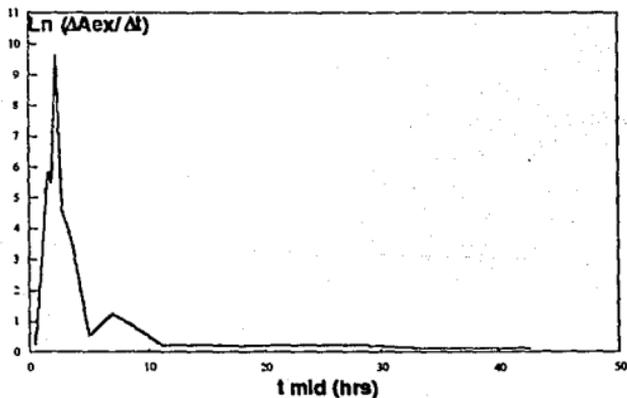
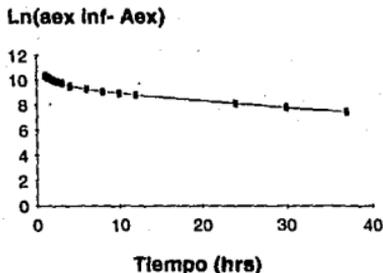


Fig #4.4. Gráfica de velocidad de excreción vs tmid, después de la administración de una dosis oral de HCTZ a un voluntario sano (estudio preliminar)



Figura#4.5. Gráfica de la cantidad remanente por excretarse después de la administración de una dosis oral de HCTZ a un voluntario sano (estudio preliminar)

Los parámetros farmacocinéticos que se obtuvieron son los siguientes:

* $t_{1/2}$ = 12 horas

* β = 0.055 hr⁻¹

* t_{max} = 2.25 hrs

*Vel Exc.max = 24.04 μ g/ml

*%Excretado = 46%

4.3.2. Estudio de Bioequivalencia de productos conteniendo HCTZ.

En la tabla 4.8 se presentan los resultados promedio de la cantidad acumulada excretada después de la administración oral de los productos conteniendo Hidroclorotiazida-Amilorida así como del producto innovador (Hidrodiuryl). En la figura 4.6. se presenta la expresión gráfica de los resultados obtenidos.

En la figura 4.7, se presenta la gráfica promedio de velocidad de excreción contra t_{mid} después de la administración de los dos productos nacionales y el producto innovador. Los valores obtenidos se presentan en la tabla 4.9.

En la tabla 4.10 se presentan los valores individuales de vida media obtenidos para cada uno de los sujetos que participaron en el estudio.

En la tabla 4.11, se presentan los resultados individuales de biodisponibilidad relativa de HCTZ después de la administración de los productos nacionales bajo estudio en relación al producto innovador.

Con el fin de comparar otros parámetros de biodisponibilidad como son velocidad de excreción máxima, $t_{m\acute{a}x}$ y vida media de absorción se elaboró la tabla 4.12 en la que se muestran los valores promedio obtenidos para cada una de las formulaciones estudiadas.

En la tabla 4.13, se muestran los intervalos de confianza para la comparación entre las formulaciones nacionales.

Tabla 4.8. Valores promedio de cantidad excretada acumulada después de la administración de los diferentes productos conteniendo HCTZ

Tiempo (hrs)	Innovador	Moduretic	Rhefluin
0.5	0.1594±0.46	0.2268±0.75	0.1482±0.62
1	1.7480±0.42	1.5914±0.42	1.1022±0.26
2	6.5159±0.92	4.9672±0.87	5.5210±0.85
3	11.3039±1.28	9.2082±1.19	9.1471±1.16
4	14.6357±1.68	12.4974±1.43	12.1848±1.29
8	20.6335±2.43	18.3348±1.57	18.3515±1.73
10	22.2593±2.50	20.1868±1.65	20.2714±1.74
12	23.8772±2.43	21.4555±1.68	21.7173±1.83
24	26.8782±2.65	24.7016±1.80	24.8739±2.04
30	27.8717±2.66	25.7440±1.93	25.7633±2.13
38	28.7024±2.64	26.7749±1.98	26.5712±2.10
48	29.3409±2.61	27.6541±2.03	27.3863±2.15

*Datos presentados como mg±error estándar

Tabla 4.9. Valores promedio de Velocidad de Excreción obtenidos para los diferentes productos conteniendo HCTZ.

T mid (hrs)	Innovador	Moduretic	Rhefluin
0.25	0.3188±0.092	0.4537±0.150	0.2964±0.120
0.75	3.1772±0.820	2.7291±0.760	1.9079±0.440
1.50	4.7679±0.620	3.3757±0.520	4.4188±0.630
2.50	4.7880±0.700	4.2410±0.600	3.6261±0.460
3.50	3.3317±0.560	3.2892±0.390	3.0377±0.410
6.00	1.4994±0.260	1.4593±0.100	1.5826±0.170
9.00	0.8129±0.081	0.9260±0.100	0.8780±0.110
11.00	0.8089±0.120	0.6343±0.056	0.7229±0.075
18.00	0.2500±0.026	0.2705±0.043	0.2630±0.034
27.00	0.1656±0.025	0.1737±0.340	0.1482±0.025
34.00	0.1038±0.015	0.1288±0.040	0.1009±0.015
43.00	0.0638±0.0096	0.0879±0.014	0.0815±0.017

Valores expresados como (mg/hr)±error estándar

Cant. Exc. Acum. (µg)

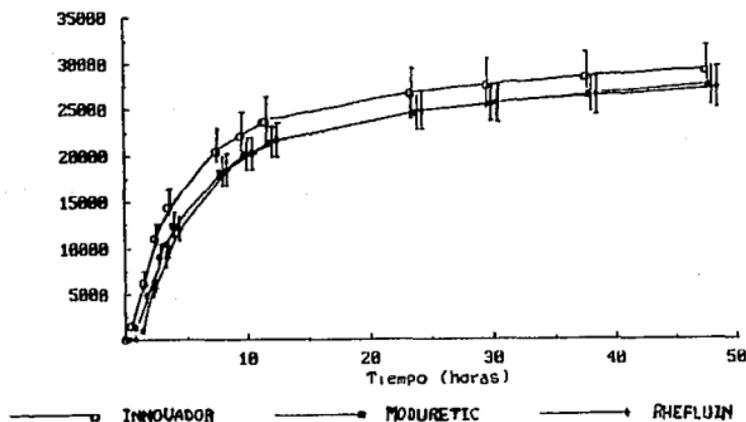


Figura 4.6. Cantidad Excretada Acumulada a las 48 horas después de una administración oral de HCTZ. Datos promedio (n=9)

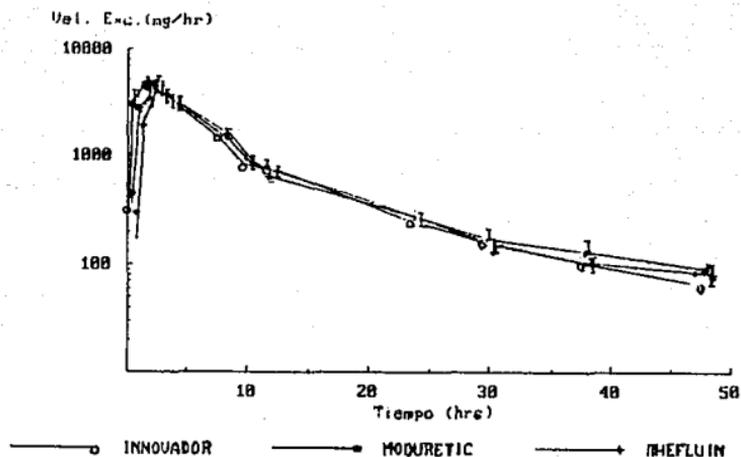


Figura 4.7. Gráfica de Velocidad de Excreción obtenida después de una administración oral de HCTZ

Tabla 4.10. Tiempos de vida media de eliminación (hrs)

Sujeto	Innovador	Rhefluin	Moduretic
1	6.68	5.76	6.51
2	6.09	6.27	5.27
3	4.65	6.93	5.19
4	4.96	6.24	5.79
5	7.77	5.90	6.47
6	6.13	5.52	7.27
7	4.64	4.16	3.05
8	7.70	7.81	6.85
9	6.76	6.28	5.81

Datos promedio por formulación (n=9) \pm error estándar

Tabla 4.11. Parámetros Farmacocinéticos

Formulación	t1/2 abs (hrs)	t1/2 elim (hrs)	Vel. Exc. máx. (mg/hr)	tmáx (hrs)
Innovador	1.399±0.38	6.15±0.40	4.7880±0.45	2.5±0.26
Rhefluin	1.289±0.27	6.09±0.33	4.4188±0.46	1.5±0.10
Moduretic	1.2665±0.24	5.80±0.42	4.2410±0.54	2.5±0.24

Datos promedio por formulación (n=9) ± error estándar

DISCUSION DE RESULTADOS

5.1. Control de calidad de los productos farmacéuticos.

Las pruebas de control de calidad efectuadas a los lotes estudiados de Moduretic y Rhefluin, muestran que los productos cumplen con el contenido químico tanto de HCTZ como de Amilorida.

En cuanto a la prueba de Uniformidad de Contenido, el criterio que se siguió fué el siguiente: dado que los productos contenían 50 mg de HCTZ y ello no correspondía al 50% del peso total del producto farmacéutico, la prueba se realizó en 10 comprimidos individualmente. Para la prueba de uniformidad de contenido la USP XXII especifica que no más del 110% y no menos del 90% de la cantidad de HCTZ y Amilorida marcada en la etiqueta estará contenida en la tableta, por lo que los productos se encuentran dentro de los límites especificados (tabla 4.1).

Así mismo los productos cumplieron con la prueba de variación de peso.

La especificación para la prueba de Disolución, según la USP XXII, es que no menos del 80% de la cantidad etiquetada de clorhidrato de amilorida y no menos de 75% de la cantidad etiquetada de hidrocloreotiazida deberá disolverse a los 30 minutos. Los datos mostrados en la tabla # 4.2. muestran que ambos productos farmacéuticos cumplen con las especificaciones que marca la USP XXII.

En base a los resultados obtenidos se demostró la equivalencia farmacéutica de los productos nacionales conteniendo la combinación de HCTZ-Amilorida.

5.2. Validación del método analítico para la cuantificación de HCTZ en orina

Es conveniente que antes de iniciar un estudio de bioequivalencia se valide la metodología analítica para asegurar la calidad de los resultados que se deriven del análisis de las muestras. Lo anterior para demostrar que en el laboratorio (o químicos analistas) se puede cuantificar con exactitud y precisión al fármaco.

Como se puede observar en la figura # 4.1., el método presenta una buena resolución ($R > 1.5$), tanto para la HCTZ como para el estándar externo empleado, SDZ, tanto en solución como en la muestra de orina. En el cromatograma blanco, de la figura 4.1. se observa que empleando el método de análisis propuesto no se presentan interferencias propias de la matriz biológica en el análisis.

5.2.1. Linealidad.

En la figura #4.2., se observa la linealidad del método, en la que el valor de la pendiente es de 0.0545 la cual es similar a las obtenidas en otros trabajos: 0.04 (con un método diferente de extracción)(63), 0.039 (en un rango de concentraciones de 2 a 50 $\mu\text{g/ml}$)(65) y 0.51 (método original del cual se partió para montar el método descrito anteriormente)(72). El coeficiente de correlación obtenido, 0.9996, es aceptable tomando en cuenta que se utilizó un fluido biológico.

5.2.2. Precisión.

5.2.2.1. Repetibilidad

En la tabla #4.4., se observa que los coeficientes de variación(C.V.), obtenidos al determinar la Repetibilidad en un mismo día, son menores al 10% (aceptado para fluidos biológicos). Para una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ se encontró un C.V. de 9.77%, en el resto de las concentraciones los C.V. promedio son de 4%.

5.2.2.2. Reproducibilidad

Para el análisis de Reproducibilidad en diferentes días, los C.V. también son menores al 10%, siendo la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ la que presentó la mayor variación: 7.79% (tabla 4.3).

En ambas pruebas de precisión, se tomó la relación de alturas, HCTZ/SDZ, entre la concentración ([HCTZ/SDZ/Conc.], para el análisis (tablas 4.3 y 4.4).

En base a tales resultados se demostró que el método es repetible.

Cabe hacer mención que este parámetro , se evaluó para un sólo analista y aunque se especifica que se debe evaluar con dos analistas, la prueba efectuada es válida para los propósitos del presente estudio, ya que el mismo analista realizó la cuantificación de todas las muestras.

5.2.3. Exactitud

De los valores obtenidos en la tabla 4.5 se observa que los porcentajes de recuperación obtenidos son aceptables, ya que el porcentaje de recobro fué mayor al 95.13%, con un %C.V. de 1.84, lo cual indica que además de repetible la extracción es buena. Al comparar los datos con algunos reportados en la literatura se encontraron recobros del 91.25%(66), 95-104%(63), 87-95%(65) y 69-71%(70), por lo que el método propuesto se encuentra dentro del rango obtenido en otros trabajos.

5.2.4. Estabilidad.

Para la validación de este parámetro se tomó en cuenta la aplicación que se le daría al método, y se evaluó solamente la estabilidad en el fluido biológico, en el que mediante prueba de "t", se determinó que las muestras de orina colectadas son estables ($P=0.005$) durante una semana almacenadas en congelación (-4°C) (tabla 4.6), por lo que todas las muestras se analizaron durante este intervalo de tiempo. La estabilidad del residuo (después de la evaporación de la muestra) no se evaluó, pues se tienen reportes que en estado sólido la HCTZ es estable (66).

5.2.5. Especificidad.

Al no detectarse más picos en los cromatogramas obtenidos, se puede asumir que la administración de Amilorida, Lisinopril, Cafena, AAS y Acetaminofén conjuntamente con la HCTZ no interfieren en la cuantificación de éste último. Dado que la HCTZ no se metaboliza y se excreta en un 50-70% en las primeras 24 horas y casi completamente a las 36-48 horas después de su administración en orina el método propuesto es adecuado para cuantificar HCTZ en orina.

5.2.6. Cantidad Mínima Cuantificable.

La cantidad mínima cuantificable fue de 0.05µg/ml, la cual fue adecuada para cuantificar la HCTZ en fluido biológico. Al realizar el estudio preliminar(37), y durante el estudio de bioequivalencia, nunca se encontraron concentraciones tan bajas en orina.

5.2.7. Cantidad Mínima Detectable.

La cantidad mínima detectable obtenida fue de 10 ng/ml, la cual concuerda con la reportada en otros trabajos sobre el tema: 50ng/ml(68) y 10 ng/ml(75).

5.2.8. Tolerancia.

Este parámetro muestra que, en caso de ser necesario se pueden hacer cambios al método originalmente propuesto para tener las condiciones cromatográficas óptimas y contar con un análisis cromatográfico ideal (buena resolución, selectivo y rápido).

Una vez analizados estos datos, se estableció que el método analítico implementado era el adecuado para el estudio de bioequivalencia

5.3. Estudio de Bioequivalencia de productos comerciales conteniendo Hidroclorotiazida y Amilorida

A la fecha existen pocos reportes en la literatura sobre estudios de bioequivalencia de la HCTZ cuando se encuentra combinada con otros fármacos. De tales reportes ninguno trata sobre la combinación de HCTZ-Amilorida. En los reportes que tratan sobre la bioequivalencia de productos conteniendo solamente HCTZ la mayoría realiza el estudio en orina (75)(27). Los resultados que se han obtenido en tales estudios muestran que en tabletas no se han detectado diferencias significativas en la biodisponibilidad de la HCTZ, aún cuando se evaluaron productos conteniendo diferentes dosis de HCTZ. Sin embargo cuando se compararon una tableta contra una formulación experimental en cápsula se demostraron diferencias en la cantidad excretada acumulada, los sujetos que tomaron la cápsula excretaron casi la mitad de la cantidad excretada acumulada de cuando ingirieron la tableta(75)(29)(77).

Considerando la poca información que existe acerca de los productos conteniendo esta combinación de principios activos (HCTZ-Amilorida), se consideró importante determinar tanto la bioequivalencia de los productos comerciales mexicanos como el efecto de la amilorida en la vida media de la HCTZ.

5.3.1. Estudio Preliminar

Se efectuó este estudio, para seleccionar tanto los intervalos de tiempo como el tiempo total de muestreo, y de esta manera obtener resultados confiables en el estudio de bioequivalencia.

Con los datos de la tabla 4.7 y de las figuras 4.3. y 4.5, se decidió que los tiempos de muestreo que proporcionarían la máxima información con el mínimo de molestias para los voluntarios serían los siguientes:

0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12, 24, 30, 38 y 48 horas.

En este voluntario, el porcentaje de HCTZ excretado fue de 56.66% y el valor de vida media fue de 7.27 horas.

5.3.2. Estudio de Bioequivalencia de Hidroclorotiazida

Se han encontrado reportes de que los niveles sanguíneos de la HCTZ no siempre están correlacionados a los niveles que se encuentran en orina, obteniendo las mejores correlaciones entre dosis-área bajo la curva de excreción urinaria, considerando la actividad farmacológica de la HCTZ(73). También desde un punto de vista terapéutico, se demostró que la cuantificación de la HCTZ en orina es una elección lógica para estimar la bioequivalencia de la HCTZ, y de los diuréticos del grupo de las tiazidas(78)(79)(80).

De los datos de la tabla 4.8., se observa que la cantidad excretada a las 48 horas fue de 27.65 para Moduretic y de 27.38 para Rhexluin.

En la figura 4.6. se presenta la gráfica promedio de la cantidad acumulada excretada después de la administración de los dos productos nacionales y el producto innovador, en la que se observa que los perfiles de excreción urinaria son muy semejantes entre ellos, por lo que la cantidad excretada a los diferentes tiempos no varía significativamente con las diferentes formulaciones bajo estudio.

Los porcentajes promedio excretados en el presente estudio (55.3 para Moduretic y 54.76 para Rhexluin), concuerdan con los obtenidos en trabajos anteriores(75)(29).

Con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre formulaciones, los valores obtenidos de cantidad excretada se analizaron utilizando el paquete estadístico Biopak(versión 2.0). Con la prueba de ANOVA es posible emplear un modelo lineal, el cual incluye tratamientos, sujetos y períodos como los efectos principales y también cualquier interacción cuando esta sea requerida.

EL modelo empleado para probar la hipótesis de que no existen diferencias entre las tres formulaciones, que es el recomendado por FDA para estudios de bioequivalencia(81) es el siguiente:

$$Y_{ijklmn} = \mu_i + \text{Secuencia}_j + \text{Sujeto(secuencia)}_{k(j)} + \text{Periodo}_l + \text{Formula}_m + \text{Error}_n$$

De los resultados obtenidos se presenta la tabla 5.1, en la que se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Tabla 5.1. Análisis de varianza
para el estudio de Bioequivalencia de productos conteniendo HCTZ

F.V.	S.C.	g.l.	F	Prob	
Secuencia	0.6463	2	0.0755	0.9273	NS
Suj(sec)	43.1620	6	1.6805	0.1252	NS
Período	19.5330	2	2.2816	0.1038	NS
Fórmula	1.6843	2	0.1967	0.8215	NS
Error	1331.2594	311			

Los datos de la tabla 5.2., contraste I-M e I-R, muestran que las formulaciones bajo estudio sí son bioequivalentes respecto a la formulación innovadora, la base para determinar la bioequivalencia reside en el cálculo de los intervalos de confianza Westlake, que es el más recomendado e indica que los valores del producto deberán encontrarse entre el 80-120% en relación al producto de referencia(34-36). En nuestro caso se obtuvieron valores de (-80,-120), lo que establece la bioequivalencia de los mismos.

En ambas comparaciones (Innovador contra productos nacionales) los intervalos de confianza se tomaron a un 90% y no a un 80% o 95%, pues al tomar para el intervalo de confianza el 80% se puede aceptar formulaciones como bioequivalentes cuando en realidad no lo son, al ampliar la probabilidad de que los productos estén dentro del intervalo de confianza. Cuando el intervalo de confianza es del 95%, el criterio es muy estricto y se podrían rechazar formulaciones que han demostrado ser eficaces en la práctica clínica.

Tabla 5.2. Intervalos de confianza para establecer la bioequivalencia entre el producto Innovador y los productos nacionales conteniendo HCTZ

Contraste	Clásico	Westlake
Innovador-M	(76.99 , 103.77)	(79.95 , 120.05)
Innovador-R	(76.92 , 103.71)	(79.88 , 120.12)

Valores de los intervalos al 90% de confianza

En los antecedentes históricos, sección 2.1., se mencionó el criterio de la regla 75/75, la cual es útil para establecer si una formulación es bioequivalente o no a un innovador, sin embargo en este trabajo no fueron determinados, pues en el pasado Congreso Internacional de Farmacia, con sede en la ciudad e Washington D.C. E.U.A., en 1991, uno de los puntos que más críticas recibió dentro del rubro de la bioequivalencia y la biodisponibilidad fué esta regla y se dejó establecido que es mucho mejor emplear los intervalos de confianza para establecer la bioequivalencia.

En la tabla 4.10, se resumen los valores de tiempos de vida media para cada uno de los voluntarios, encontrándose que no existen diferencias en el valor de vida media al administrar las diferentes formulaciones. Considerando que los parámetros de velocidad de excreción máxima y tiempo para alcanzar la velocidad máxima son indicadores de la absorción del fármaco, en la tabla 4.11, se puede observar que los valores promedio de velocidad obtenidos son un poco más altos con el innovador y el rhexfluin alcanza su velocidad máxima a un tiempo más corto, sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En 1982, Yamaoka y colaboradores(82)(83), proponen los tiempos medios de residencia (TMR) como un método modelo independiente para establecer la disposición del fármaco en el organismo. En la tabla 5.3, se resumen los valores de TMR, obtenidos con los productos estudiados, encontrándose un valor promedio de 10.12, 10.88 y 10.79 para Innovador, Moduretic y Rhexfluin, respectivamente.

Tabla 5.3 Tiempos Medios de Residencia

Voluntarios	Innovador	Moduretic	Rhefluin
1	10.57	11.81	11.14
2	10.69	11.10	9.81
3	8.89	14.98	9.02
4	8.21	7.54	10.24
5	9.05	10.31	13.61
6	10.05	8.52	11.58
7	10.48	11.12	9.40
8	9.12	11.46	11.16
9	13.10	11.09	11.22

*Datos dados en horas

Aún cuando no existe información acerca de la farmacocinética de la HCTZ combinada con la Amilorida, en el presente trabajo se demostró que no existen cambios ni en la absorción ni en los parámetros farmacocinéticos al combinar estos dos fármacos (tabla 4.11), con la ventaja terapéutica de obtener una mejor respuesta diurética, en el tratamiento de la hipertensión, además de que al combinar la HCTZ con otros agentes diuréticos, se pueden emplear dosis menores de ambos fármacos.

VI

CONCLUSIONES

- i. Los productos estudiados, conteniendo Hidroclorotiazida-Amilorida cumplieron con las especificaciones de control de calidad que marca la USP XXII.
- ii. El método analítico utilizado para cuantificar HCTZ en orina fué lineal, sensible, repetible y exacto en el rango de concentraciones de 1 a 100 µg/ml. Así mismo, no se detectaron interferencias de los siguientes fármacos en el análisis: amilorida, lisinopril, acetaminofén, ácido acetilsalicílico y cafeína.
- iii. El estudio de bioequivalencia de dos productos nacionales conteniendo Hidroclorotiazida-Amilorida, en relación al producto innovador conteniendo unicamente Hidroclorotiazida, demostró que la biodisponibilidad relativa de los mismos fué de 0.94 y 0.93 (productos Moduretic y Rhefluin, respectivamente), por lo que no existen diferencias en la biodisponibilidad entre los productos.
- iv. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el producto innovador y los productos nacionales.
- v. La amilorida no afecta la absorción ni la eliminación de la Hidroclorotiazida.
- vi. Los dos productos nacionales, cuyos lotes estudiados presentaron biodisponibilidad semejante, pueden ser intercambiables.

Apéndice A

HOJA DE CONSENTIMIENTO PARA EL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE HIDROCLOROTIAZIDA

Nombre: _____ Edad: _____
Dirección: _____ Estatura: _____

Sexo: _____
Teléfono: _____ Peso: _____

En forma voluntaria y en pleno uso de mis facultades mentales, hago constar que he sido informado sobre los riesgos en que puedo incurrir al participar en esta investigación de bioequivalencia de productos comerciales que contienen Hidroclorotiazida y Amilorida.

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.

FECHA: _____

FIRMA

Apéndice B

HIDROCLOROTIAZIDA(12)

Contraindicaciones:

Anuria, hipersensibilidad a cualquiera de los componentes del producto o a otros medicamentos sulfonamídicos.

Precauciones:

Se puede presentar hipotensión no complicada, aunque se presenta rara vez.

No se recomienda utilizarla en casos de disfunción renal.

Puede disminuir la tolerancia a la glucosa. Ha sido asociada con aumento de las concentraciones de colesterol y de triglicéridos.

Efectos colaterales:

El efecto colateral más común es el mareo cuando se administra por períodos prolongados.

Otros efectos menos frecuentes son: cefalea, tos seca, fatiga y efectos ortostáticos; que se presentan cuando el medicamento es administrado por períodos prolongados.

En casos aislados se puede presentar diarrea, vómito, molestias en el pecho, calambres y debilidad muscular, parétesis y astenia.

Apéndice C

PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE HIDROCLOROTIAZIDA

1. Para participar en el estudio, es necesario que el voluntario no padezca reacción alérgica ni sea hipersensible a Hidroclorotiazida, Lisinopril o Amilorida.
2. NO debe tomar medicamentos o alcohol por lo menos una semana antes del estudio ni durante el mismo. Notificar al responsable del estudio en caso contrario.
3. No ingerir alimentos después de las 23:00 horas del día anterior al estudio. El sujeto tomará un desayuno estándar 4 horas después de la administración del medicamento, el cual será proporcionado por el responsable del estudio.
4. Tomar 100 ml de agua a los siguientes tiempos:
Cada hora durante las primeras cuatro horas, después del desayuno la ingesta de agua será ad libitum.
5. Se coleccionarán las muestras de orina a los siguientes tiempos (en horas):
0. 0.5. 1. 2. 3. 4. 8. 10. 12. 24. 30. 38 y 48.
6. Las muestras de orina se colocarán en una probeta, midiendo el volumen excretado y colocando aproximadamente 10 ml de orina en un tubo de ensayo, el cual se le proporcionará. Los tubos se cierran y se deberán guardar en congelación hasta el día en que se entreguen al responsable. Cada tubo contiene 1 gota de tolueno como conservador.
7. Para las muestras de orina entre cada una de las horas marcadas en el inciso (5), coleccionar la orina de el intervalo en un frasco con tapa y una vez llegada la hora de toma de muestra se sigue el procedimiento del inciso (6). El frasco debe mantenerse en congelación mientras llega la hora marcada en el protocolo.
8. El volumen total de orina deberá anotarse en la hoja que se le proporcionará para tal efecto.

9. Se debe tener cuidado que los tubos para las muestras de orina estén perfectamente etiquetados para evitar cualquier tipo de confusión, ya sea de horario o muestras de otro voluntario.

10. Es muy importante que no se tire orina sin que se le haya medido el volumen, pues en caso de perder alguna muestra, los datos que se deriven del muestreo subsecuente no podrán ser analizados adecuadamente.

Apéndice D

Excreción Urinaria de HCTZ Cantidad Excretada Acumulada Datos Individuales*

Voluntario 1

Hora	Innovador	Moduretic	Rheflin
0.5	0.1778	0.3018	0.5586
1	1.716	1.624	1.8519
2	6.980	4.617	7.247
3	11.40	6.947	10.97
4	14.53	8.547	13.99
8	22.33	15.433	19.60
10	23.48	17.37	20.80
12	24.43	18.60	21.65
24	28.98	21.08	24.48
30	30.29	22.22	25.35
38	31.65	23.27	26.52
48	31.95	24.13	27.91

Voluntario 2

Hora	Innovador	Moduretic	Rheflin
0.5	0.06638	0.5860	0.2706
1	0.3692	1.307	1.127
2	5.365	4.647	7.959
3	9.344	7.488	13.59
4	12.12	9.630	17.14
8	17.27	12.48	27.04
10	18.97	13.55	28.87
12	20.03	14.67	30.87
24	22.63	17.58	35.18
30	23.70	17.87	36.79
38	24.66	18.83	36.95
48	25.42	19.43	37.93

*Los datos presentados estan dados en mg

Voluntario 3

Hora	Innovador	Moduretic	Rhefluin
0.5	0.07515	0.383	0.030
1	0.5355	3.270	0.580
2	1.502	8.640	4.14
3	7.272	13.06	7.199
4	12.37	16.75	9.790
8	12.95	28.10	12.85
10	16.11	30.81	14.29
12	17.27	32.57	15.67
24	20.40	36.18	19.10
30	21.01	36.93	19.61
38	21.33	37.54	20.53
48	21.82	37.71	21.15

Voluntario 4

Hora	Innovador	Moduretic	Rhefluin
0.5	0.0495	0.0650	0.0489
1	0.4715	0.2460	0.2280
2	2.444	2.809	2.515
3	4.982	6.127	5.776
4	6.613	9.316	9.514
8	8.693	15.29	17.37
10	10.14	16.36	19.05
12	13.38	17.27	20.29
24	14.96	19.43	21.30
30	15.46	20.44	22.14
38	15.90	20.91	23.03
48	16.13	21.86	23.27

Voluntario 5

Hora	Innovador	Moduretic	Rhefluin
0.5	0.1103	0.1520	0.0729
1	3.345	1.984	1.288
2	12.01	7.870	6.396
3	16.58	12.31	11.23
4	19.21	15.63	15.83
8	22.10	21.62	22.48
10	23.83	23.32	24.26
12	25.62	24.71	26.50
24	28.33	30.69	30.99
30	29.89	31.82	32.45
38	30.80	32.68	33.76
48	31.51	33.84	34.66

*Los datos presentados estan dados en mg

Voluntario 6

Hora	Innovador	Moduretic	Rhefluin
0.5	0.0784	0.5450	0.2815
1	1.255	1.806	2.533
2	6.054	5.699	8.879
3	11.65	7.922	14.00
4	13.87	10.54	16.25
8	18.81	16.61	22.66
10	20.38	18.33	23.55
12	21.90	20.16	24.87
24	24.81	24.10	27.41
30	25.72	25.71	28.09
38	26.43	29.16	29.02
48	27.15	30.64	29.78

Voluntario 7

Hora	Innovador	Moduretic	Rhefluin
0.5	0.0485	0.6243	0.0208
1	0.6898	3.876	0.7344
2	5.465	9.010	4.404
3	14.85	14.41	7.570
4	21.93	18.06	12.15
8	31.15	23.52	19.63
10	33.00	25.58	23.00
12	34.20	26.38	24.21
24	38.25	26.88	28.70
30	38.57	27.25	29.12
38	38.82	27.63	29.57
48	39.55	28.92	30.14

Voluntario 8

Hora	Innovador	Moduretic	Rhefluin
0.5	0.1667	0.1176	0.0474
1	3.431	3.142	1.418
2	7.613	7.115	6.820
3	13.56	14.83	8.121
4	18.29	19.86	8.999
8	25.24	27.03	13.294
10	26.30	28.95	15.21
12	28.42	30.66	16.70
24	31.49	34.53	19.72
30	31.65	36.81	20.94
38	32.69	37.98	21.57
48	33.61	38.90	23.59

*Los datos presentados estan dados en mg

Voluntario 9

Hora	Innovador	Moduretic	Rhefluin
0.5	0.4050	0.0102	0.0365
1	1.180	0.2907	0.1597
2	4.078	2.089	1.322
3	6.311	6.225	3.871
4	8.399	9.180	5.990
8	12.02	15.72	11.71
10	13.40	17.75	13.40
12	14.35	19.03	14.36
34	17.16	23.27	16.98
30	18.07	24.22	17.38
38	19.26	24.84	18.18
48	20.30	24.99	18.34

*Los datos presentados estan dados en mg

Bibliografia

1. Berry F.J.; J. Pharm. Pharmacol.; 12:503 (1939)
2. Bandelin F.; Am. J. Pharm.; 117:124 (1945)
3. Wagner J.; Drug Intell. Clin. Pharm.; 5:115 (1971)
4. Melnick D., Hochberg M. and Oser B.; J. Nutr.; 30:67 (1945)
5. Morrison A., Chapman D. and Campbell J.; J. AM. Pharm. Assoc.; 48:634 (1959)
6. Levy G. and Hayes B.; New Engl. J.MEd.; 262:1053 (1960)
7. Levy G.; J. Pharm. Sci.; 50:388 (1961)
8. Parrot E., Wuster D. and Higuchi T.; J. Pharm. Sci.; 44:269 (1955)
9. Catz B., Ginsburg E. and Salenger S.; New Engl. J. Med.; 226:136 (1962)
10. Braverman L. and Ingbar S.; New Engl. J. Med.; 270:439 (1964)
11. Carter A.; Can. Med. Assoc. J.; 88:98 (1963)
12. Carminetsky S.; Can. Med. Assoc. J.; 88:950 (1963)
13. Levy G.; Can. Med. Assoc. J.; 90:978 (1964)
14. LU F., Rice W. and Mainville C.; Can. Med. Assoc. J.; 92:1166 (1965)
15. Varley A.; J. Am. Med. Assoc.; 206:1745 (1968)
16. Campagna F., Cureton G., Mirigian R. and Nelson E.; Pharm. Technol.; 52:605 (1963)
17. Levy G., Hall N. and Nelson E.; Am. J. Hosp. Pharm.; 21:402 (1964)
18. Sullivan T., Sakmar E. and Wagner J.; J. Pharm. Sci. 64:1723 (1975)
19. Sullivan T., Hallmark M. and Wagner J.; J. Pharmacokinet. Biopharm. 4:157 (1976)
20. Sullivan T., Sakmar E. and Wagner J.; J. Pharmacokinet. Biopharm. 2:29 (1974)
21. Glazko A., Kinkel A. and Holmes E.; Clin. Pharmacol. Ther. 9:472 (1968)
22. Brice G. and Hammer H.; J. Am. Med. Assoc.; 208:1189 (1969)
23. Blair D., Barnes R. and Murray W.; J. Am. Med. Assoc. 215:251 (1971)
24. Barnes D.; Therapeutics Equivalence of Drugs-FDA Viewpoints, Paper presented at The 5th National Meeting of the APhA Academy of Pharmaceutical Sciences, Washington D.C., 1968
25. Huffman D. and Azarnoff D.; J. Am. Med. Assoc.; 222:957 (1972)
26. Lindenbaum J.; Pharmacol. Rev.; 25:229 (1973)
27. Shah V.P., Walker M.A., Prasad V.K. and Knapp G.; Biopharm. and Drug Dispos. 5:11-19 (1984)

28. Shah V.P., Walker M.A., Prasad V.K. and Knapp G.; *Curr. Ther. Res.* 24:366-377 (1978)
29. Meyer M.C., Melikian P.L. and Slywka G.W.A.; *Curr. Ther. Res.*; 17:570-576 (1975)
30. Federal Register, Vol 42, No. 5, Friday, January 7, 1977
31. *ibid*, 21 CFR ch 1 (4-1-87 edition), part 320, p118
32. Annon A.; *Guide for Biopharmaceutical Studies in Man*; The College of Pharmacy, Univ of Kentucky, USA 1971
33. Academy of Pharmaceutical Sciences, 127th Annual meeting of the American Pharmaceutical Association, Washington, D.C. (April 1980)
34. Westlake W.J.; *Biometrics* 35:273-280 (1979)
35. Westlake W.J.; *Bioavailability and Bioequivalence of Pharmaceutical Formulations*. In K.E. Pace (ed), *Pharmaceutical Statistics for Drug Development*, Marcel Dekker, NY (1988)
36. Westlake W.J.; *J. Pharm.Sci.* 62:1579-1589 (1973)
37. *Analytical Profiles of Drug Substances*; Vol 10; Edited by Florey K., Academic Press, New York, USA (1981)
38. Sheppard H., Mowles T.F., Bowen N. and Renzi A.A.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2:188-194 (1960)
39. Beerman B., Groschinsky M. and Rosen A.; *Clin Pharmacol. Ther.* 19:531-537 (1976)
40. Lindstroem B. and Molander M.; *J Chromatogr.* 114:459-462 (1975)
41. Goto S., Odawara Y. and Nakano M.; *Chem. Pharm. Bull.* 26:2298-2304 (1978)
42. McLeod P.J., Ogilvie R.I. and Ruedy J.; *Clin. Pharmacol. Ther.* 11:733-739 (1970)
43. Beerman B.; *Europ. J.Clin. Pharmacol.* 12:297-303 (1978)
44. Beerman B. and Groschinsky M.; *Br. J. Clin. Pharmacol.* 7:579-583 (1979)
45. Beerman B. and Groschinsky M.; *Europ. J. Clin. Pharmacol.* 13:195-201 (1978)
46. CIBA Pharmaceutical Company, Summit N.J., *Bioavailability Data of Apresazide*, (1976)
47. Jordoe L., Johansson G. and Roenn .O.; *Br. J. Clin. Pharm.* 7:563-567 (1979)
48. Sundquist H., Antilla M. and Simon A.; *J. Clin. Pharmacol.* 19:557-564 (1979)
49. Wagner W.E., Gilleran T. and Zak S.; *Clin. Pharmacol. Ther.* 17:247 (1975)
50. Elsayed M.A.H. and Nwakanma C.O.; *Pharmazie* 34:251-252 (1979)

51. Vachek J. and Ceskoslov; Farm 10:515-517 (1961)
52. Mollica J.A., Rehm C.R. and Smith J.B.; J. Pharm. Sci. 60:1380-1384 (1971)
53. Rehm C.R. and Smith J.B.; J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 49:386-389 (1960)
54. Fazzari F.R.; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 53:582-584 (1970)
55. Bower E.L.Y. and Winefordner J.D.; Anal. Chim. Acta 101:319-332 (1978)
56. Schaefer M., Geissler H.E. and Mutschler E.; J. Chromatogr. 143:615-623 (1977)
57. Lindström B. and Molander M.; J. Chromatogr. 114:459-462 (1975)
58. Smith J.B., Mollica J.A. and Govan H.K.; Amer. Lab. 4:13-19 (1972)
59. Honigberg I.L., Stewart J.T. and Smith A.P.; J. Pharm. Sci. 64:1201-1204 (1975)
60. Butterfield A. G.; J. Pharm. Sci. 67:650-653 (1978)
61. Robinson W.T. and Cosyins L.; Clin. Biochem. 11:172-174 (1978)
62. Felber E. and Steiner R.; CIBA-GEIGY Ltd. Basle, Internal Report(oct. 1979)
63. Barhaiya B., Phillips T.A. and Welling P.G.; J. Pharm. Sci. 70:291-295 (1981)
64. Barhaiya R.H., Craig W.A. and Welling P.G.; J. Phar. Sci. 71:245-248 (1982)
65. Koopmans P.P.; J. Chromatogr. Biomed. Appl. 307:445-450 (1984)
66. Daniels S.L. and Vanderwielen A.J.; J.Pharm. Sci. 70:211-215 (1981)
67. Gribnaw F.W.J. Biopharm. Drug. Dispos. 3:329 (1982)
68. Christophersen A.S., Rasmussen K.E. and Salvesen B.; J. Chromatogr. 132:91-97 (1977)
69. Redalieu E., Tipnis V.V. and Wagner W.E.; J. Pharm. Sci. 67:726-728 (1978)
70. Alton K.B., Desrivieres D. and Patrick J.E.; J. Chromatogr. Biomed. Appl. 374:103-110 (1986)
71. Cooper S.F.; J. Chromatogr. Biomed. Appl. 489:65-88 (1989)
72. Cooper M.J., Sinaiko A.R., Anders M.N. and Mirkin B.L.; Anal. Chem. 48:1110-1111 (1976)
73. Goodman y Guilmán; Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica; 7a. edición; Ed. Panamericana México 1985
74. Chodos D.J. and DiSanto A.R.; Basics of Bioavailability, and Description of Upjohn Single-Dose Study Desing; Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan USA, 1973
75. Meyer M.C.; J. Am. Phar. Ass. NS16:47-50 (1976)
76. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 5ª Edición, Editado por la Secretaría de Salud, México (1988)

77. Tannenbaum P.J., Rosen E., Flanagan T. and Crosley A.P.; J. Clin. Pharmacol. Ther. 9:598 (1968)
78. Shah V.P., Hunt J.P. and Prasad V.K.; J. Pharm. Sci. 70:833-835 (1981)
79. Shah V.P., Hunt J.P. and Prasad V.K.; Curr. Ther. Res. 24:366 (1978)
80. Shah V.P., Hunt J.P. and Prasad V.K.; "Abstracts, 27th Academy of Pharmaceutical Sciences National Meeting", Kansas City, Mo. (1979)
81. Biopak 2.0, Professional Data Analysis Software, SCI, Lexington, Kentucky, USA
82. Yamaoka K., Tanigawara Y. and Uno T.; Chem. Pharm. Bull. 30:1088-1089 (1982)
83. Cutler D.J.; Biopharm. and Drug Dispos. 8:87-97 (1987)
84. The United States Pharmacopeia XXII and N. F. XVII. United States Pharmacopeial Convention, Inc., USA, 1990.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA