



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA DE FORMAS FARMACEUTICAS CONTENIENDO HIDROCLOROTIAZIDA Y LISINOPRIL.



EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ENRIQUE DIAZ PEREZ

TESIS CON FALLA DE ORIGEN





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.

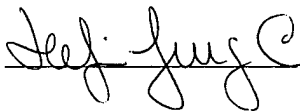
JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE: ALFREDO GARZON SERRA
VOCAL: HELGI HELEN JUNG COOK
SECRETARIO: CONSUELO ARELLANO BORJAS
1er. SUPLENTE: GRACIELA SOSA GARCIA
2do. SUPLENTE NORMA TRINIDAD GONZALEZ MONZON

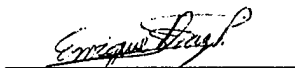
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE
BIOQUIMICA Y FARMACIA DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA: M. en C. HELGI HELEN JUNG COOK.



SUSTENTANTE: ENRIQUE DIAZ PEREZ.



DEDICATORIA

A Dios, por su manifestación diaria y constante en todas las cosas que me recuerdan que estoy vivo y por hacer realidad un sueño más.

A mis padres Irma y Enrique, por su vocación de padres en todos estos años llenos de aprendizaje pero sobre todo de amor.

A Irma y Ma. Luisa, porque su amistad y cariño superan la definición de hermana.

A mis amigos, por todo lo que su amistad significa para mí y por todo aquello que me hace pensar que ellos son el principal motivo para saber que estuve en el lugar correcto.

A quien no menciono pero recuerdo siempre . . . Como te prometí.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Helgi Jung por el apoyo, dirección, asesoría y por las enseñanzas que han resultado de todo ello.

A las maestras Inés Fuentes y Margarita Rodríguez por su apoyo y ayuda en tantas ocasiones.

A los voluntarios que tomaron parte en el estudio, porque con su participación hicieron posible la parte más difícil e importante del mismo.

INDICE

	Página
INDICE	i
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	2
Consideraciones generales	2
Bioequivalencia	3
Definición de términos relacionados con biodisponibilidad y bioequivalencia.	4
Biodisponibilidad relativa en el desempeño de fármacos	6
Regulaciones federales sobre biodisponibilidad y bioequivalencia.	7
Lineamientos para el diseño de estudios de biodisponibilidad.	9
Protocolos para estudios comparativos de biodisponibilidad.	11
Monografía de la hidroclorotiazida.	12
Biodisponibilidad de la hidroclorotiazida.	16
Farmacología de la hidroclorotiazida.	18
Farmacología del lisinopril.	21
PARTE EXPERIMENTAL.	23
Control de calidad de los fármacos de estudio.	23
Método analítico para cuantificar hidroclorotiazida en orina.	27
Validación del método analítico.	30
Estudio preliminar	36
Estudio de biodisponibilidad relativa.	36

RESULTADOS.	39
Control de calidad de los productos.	39
Validación del método analítico.	41
Estudio preliminar de biodisponibilidad.	49
Estudio de biodisponibilidad relativa.	52
Análisis estadístico de los datos	57
ANALISIS DE RESULTADOS.	58
Control de calidad de los medicamentos de estudio.	58
Método analítico.	59
Validación del método analítico.	60
Estudio preliminar de biodisponibilidad.	62
Estudio de biodisponibilidad relativa.	63
CONCLUSIONES.	67
APENDICES.	
Apéndice A	68
Apéndice B	69
Apéndice C	70
Apéndice D	72
Apéndice E	73
BIBLIOGRAFIA	77

INTRODUCCION

En el diseño de un estudio de biodisponibilidad relativa es necesario considerar que debe contarse con una metodología analítica con alto grado de sensibilidad y especificidad que proporcione resultados confiables, lo cual solo se puede garantizar mediante una validación de la metodología desarrollada; con un diseño experimental apropiado al tipo y alcance del estudio, con el número adecuado de sujetos y tiempos de muestreo y finalmente con un análisis estadístico que refleje la veracidad de los resultados de acuerdo al problema que se plantea.

El fármaco de estudio en este trabajo es la hidroclorotiazida, uno de los fármacos de primera elección en el tratamiento de la hipertensión y uno de los más empleados en México, E.U.A. y otras partes del mundo. Siendo un medicamento de empleo delicado, se han detectado problemas de biodisponibilidad relativos a la formulación del medicamento considerando su baja solubilidad en agua.

La hidroclorotiazida se administra sola o en combinación con otros fármacos. En México se comercializa combinada con los siguientes fármacos: triamtereno, timolol, metoprolol, metildopa, captopril, enalapril y lisinopril. Este último es el análogo más reciente del captopril del cual también es análogo el enalapril.

No existen reportes en la literatura respecto a la biodisponibilidad de la combinación hidroclorotiazida - lisinopril de tal manera que el motivo de este trabajo es determinar la biodisponibilidad relativa de productos comerciales conteniendo esta combinación respecto a una solución de hidroclorotiazida para lo cual se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para posteriormente realizar el estudio en humanos.

II

ANTECEDENTES.

2.1 Consideraciones generales (1) (2).

Los fármacos se administran localmente para tener una acción protectora, antiséptica, de anestesia local o efectos antibióticos. Cuando se administran sistémicamente para actuar sobre las células y órganos del cuerpo o para combatir organismos invasores, existen una serie de factores químicos y fisiológicos que son importantes para la absorción, distribución y eliminación de fármacos en el organismo. Algunas de las propiedades de la cavidad bucal, estómago e intestinos que influyen en la acción de los fármacos se muestran en las tablas 2.1 y 2.2 .

Tabla 2.1.
Características fisiológicas y químicas de fluidos gastrointestinales.

Factores (props de fluido)	Estómago	Intestino delgado
pH	1 - 3	5 - 8
Volúmen de fluido disponible (ml)	50 - 250	25 - 125
Tensión superficial (dina/cm)	35 - 50	32 - 45
Viscosidad (cP)	0.8 - 2.5	0.7 - 1.2

Tabla 2.2.
Características de los fluidos bucal, gástrico e intestinal.

Fluido	Volúmen diario (ml)	pH
Saliva	1200	6.0 - 7.0
Sec. gástrica	2000	1.0 - 3.5
Sec. pancreática	1200	8.0 - 8.3
Bilis	700	7.8
Sec. intest. delg.	60	7.5 - 8.0

Cuando los fármacos se administran para ejercer una acción sistémica, se dispone de una serie de vías que incluyen la oral, rectal, parenteral, sublingual y la inhalación. Después de ser absorbido en el organismo, un fármaco se distribuye por la sangre y/o por el sistema linfático para llegar a los fluidos extracelulares de varios tejidos. Las moléculas del fármaco pueden penetrar a las células inmediatamente y ejercer su acción farmacológica o bien ser almacenadas como un reservorio en músculo o tejido graso para efectuar una acción prolongada. El fármaco puede también unirse a albúmina y a otros componentes del plasma alterando de esta forma su distribución en tejidos y su eliminación del organismo.

La cinética de absorción, distribución y excreción de fármacos después de la administración ha sido demostrada desde hace varias décadas (3). Un fármaco debe ser liberado de la forma farmacéutica (exceptuando la administración intravenosa) y alcanzar su sitio de acción antes de que pueda ejercer una respuesta farmacológica. Las propiedades fisicoquímicas del fármaco, las características de la forma de dosificación en la cual es administrado el fármaco y los factores fisiológicos que controlan la absorción, distribución, metabolismo y eliminación del mismo deben de ser considerados al formular y producir agentes terapéuticos efectivos y seguros.

2.2 Bioequivalencia.

Los términos que habían llevado hace años al concepto de biodisponibilidad fueron principalmente aquellos debidos a la equivalencia

genérica (4). Específicamente, es muy importante asegurarse que productos farmacéuticos químicamente equivalentes de diferentes compañías den como resultado el mismo grado de acción terapéutica.

2.3 Definición de términos relacionados con Biodisponibilidad y Bioequivalencia (5).

Fármaco.	Molécula terapéuticamente activa.
Forma farmacéutica.	Sistema de liberación, tableta, cápsula, suspensión, etc. (conteniendo la molécula terapéuticamente activa) generalmente pero no necesariamente en asociación con ingredientes inactivos.
Biodisponibilidad.	Medida de la cantidad relativa de fármaco que llega a la circulación general y la velocidad a la cual esto ocurre.
Equivalentes farmacéuticos	Productos farmacéuticos idénticos en cantidad de principio activo y forma de dosificación, y que cumplen con las especificaciones de estándares para identidad, potencia, calidad y pureza. Estos pueden no ser idénticos en cuanto a excipientes.

Alternativas
farmacéuticas.

Son productos farmacéuticos que contienen el mismo principio activo o su precursor pero no necesariamente en la misma cantidad o forma farmacéutica y no necesariamente como la misma sal o éster.

Productos farmacéuticos Bioequivalentes

Son aquellos equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya velocidad y grado de absorción no son significativamente diferentes cuando son administrados a humanos en la misma dosis molar en condiciones similares.

La forma farmacéutica es un sistema de liberación de fármacos, ésta puede ser buena o pobre en su papel de liberar el fármaco eficientemente para que sea absorbido de la circulación sistémica al sitio de acción, por lo que el proceso de absorción o los factores relacionados con el sistema de liberación deben estudiarse para asegurar una adecuada biodisponibilidad del fármaco y bioequivalencia de productos de un fabricante a otro y de lote a lote (6).

Las regulaciones de buenas prácticas de manufactura y buenas prácticas de laboratorio promulgadas por FDA son herramientas valiosas para asegurar la calidad, sin embargo deben de tomarse acciones específicas respecto a la biodisponibilidad para asegurar la equivalencia de productos comerciales. En una gran cantidad de casos se ha relacionado la inequivalencia terapéutica con variaciones en la biodisponibilidad de los productos farmacéuticos.

2.4 Biodisponibilidad relativa en el desempeño de fármacos.

Si un fármaco es administrado a un nivel de dosis que no excede notablemente la concentración mínima efectiva (CME), la biodisponibilidad del principio activo de la forma farmacéutica influirá decididamente sobre el desempeño del mismo. En la figura 2.1 se ejemplifica esto.

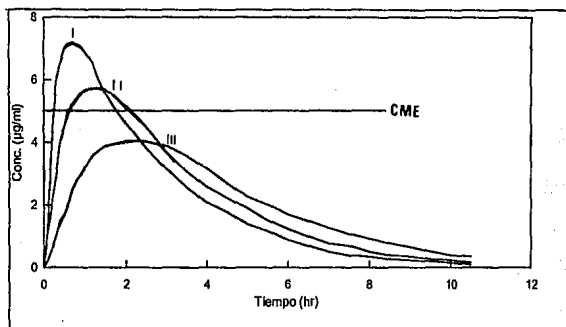


Figura 2.1

La curva I indica que la forma farmacéutica hace que el fármaco tenga una buena respuesta terapéutica. En la curva II, como se ha retardado la velocidad de absorción, la respuesta efectiva es menor. La baja absorción de la curva III conduce a una falta de respuesta farmacológica, no obstante que la cantidad absorbida determinada por el área total bajo la curva es igual a las otras dos (7).

Diferentes estudios de productos comerciales conteniendo el mismo principio activo han revelado diferencias en biodisponibilidad. Entre los fármacos que presentan estas diferencias se encuentran la tetraciclina (8), cloranfenicol (9), digoxina (10) y oxitetraciclina (11). De manera que se observa que los controles que se practican normalmente a los medicamentos como producto terminado no aseguran que estos sean bioequivalentes.

2.5 Regulaciones Federales sobre Biodisponibilidad y Bioequivalencia.

(4), (12) y (5).

En el "Federal Register" de Enero de 1973, la FDA publicó los requerimientos de biodisponibilidad para nuevos fármacos y para fármacos genéricos. Estas propuestas pasaron a ser regulaciones en Enero de 1977 con algunas modificaciones sugeridas por distintos grupos.

En el reporte de la oficina de evaluación de tecnología (OTA) para estudios de bioequivalencia, se concluyó que los estudios de biodisponibilidad no son ni factibles ni deseables para todos los medicamentos. La selección de estos fármacos debería basarse de acuerdo a su importancia clínica, índice terapéutico y ciertas características farmacéuticas. Se decidió no obstante que los estudios de biodisponibilidad deberían ser requeridos para productos cuyo principio activo no había sido introducido aún en el mercado.

2.5.1 Medicamentos que no requieren demostrar biodisponibilidad o bioequivalencia.

- a) Preparaciones para uso intravenoso.
- b) El medicamento es una preparación para aplicación tópica (crema, ungüento, gel) destinada para un efecto terapéutico local.
- c) El medicamento es una forma farmacéutica oral que no esta destinada para ser absorbida.
- d) El medicamento cumple con las siguientes condiciones:

- i.- Es una solución oral, elixir, jarabe, tintura u otra forma solubilizada similar.
- ii.- Contiene un principio activo en la misma concentración que otro previamente aprobado.
- iii.- No contiene excipientes que se conozca que afecten significativamente la absorción del principio activo.

2.5.2 Medicamentos que requieren de estudios de biodisponibilidad o bioequivalencia.

- a) El fármaco tiene un índice terapéutico estrecho.
- b) Aquellos que contienen principios activos que son relativamente insolubles o son convertidos a formas insolubles en los fluidos gastrointestinales.
- c) Los medicamentos cuyo principio activo representa menos de un 20% de la forma farmacéutica.
- d) El medicamento cumple con las siguientes condiciones:
 - i.- El principio activo es absorbido en menos del 50%, aún administrado en solución.

ii.- El principio activo se absorbe preferentemente en un sitio específico del tracto gastrointestinal.

iii.- El fármaco es altamente metabolizado durante el proceso de absorción.

iv.- El fármaco es excretado o metabolizado rápidamente.

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

2.6 Lineamientos para el diseño de estudios de biodisponibilidad (13) y (14).

El diseño de un estudio de biodisponibilidad debe minimizar la variabilidad que no es debida al fármaco per se. A continuación se presentan algunos puntos importantes que deben ser considerados en relación a los sujetos.

1) Estandarización.

Deben considerarse numerosos factores tales como ejercicio, dieta, consumo de cigarro y alcohol, etc.; de tal manera que se estandarizen las condiciones del estudio. Es preferible no utilizar fumadores y si participan, éstos deben ser bien identificados. Los voluntarios no deben tomar ningún otro fármaco, ni alcohol ni antes ni durante el estudio; en caso de emergencia, el uso de cualquier fármaco debe ser reportado.

2) Estudio ciego.

Es importante en la medida que sea posible que tanto el voluntario como el analista de las muestras no sepan que producto se administra con el objeto de evitar predisposiciones.

3) Diseño.

Debe de usarse un diseño cruzado en el cual a cada individuo se le administra el producto de referencia y al menos uno de los productos de prueba si es más de uno. La secuencia de administración de los productos de prueba y de referencia debe ser especificada anticipadamente y los sujetos deben ser designados al azar en secuencias.

4) Administración de comida y fluidos.

La administración de alimentos y fluidos debe controlarse cuidadosamente. Normalmente los sujetos deben encontrarse en ayunas 10 hr antes de la administración del medicamento el cual debe ser administrado con un volumen estándar de líquido. 4 horas después de la administración del medicamento se puede tomar un desayuno estándar el cual debe ser el mismo para todo el estudio.

5) Postura y actividad física.

En general, los voluntarios no deben recostarse al menos 2 horas después de la administración del fármaco. La actividad física debe ser estandarizada tanto como sea posible.

6) Intervalo entre dosis.

El intervalo de tiempo entre una administración y otra deberá ser el suficiente para permitir la eliminación de toda la dosis anterior del cuerpo. Generalmente se maneja un tiempo de 10 veces la vida media del fármaco.

7) Manejo de muestras.

Las muestras deben ser procesadas y almacenadas bajo condiciones en las cuales no cause degradación significativa de los analitos.

8) Identificación de reacciones adversas y efectos colaterales.

Deberá reportarse la incidencia, severidad y duración de reacciones adversas y efectos colaterales ya que los excipientes de la formulación pueden afectar estas reacciones y el investigador debe juzgar si estos efectos adversos son inducidos o no por el fármaco administrado.

2.7 Protocolos para estudios comparativos de Biodisponibilidad (15).

En la 13a. conferencia anual internacional de la industria farmacéutica en Lakeway, Texas: Skelly trató los elementos que conforman un buen protocolo así como la gran importancia del mismo.

Un protocolo debe incluir información del fármaco y uso clínico; facilidades clínicas y los investigadores responsables del estudio; un plan de experimentación incluyendo referencia a los sujetos involucrados; fármacos a ser administrados; el plan del tratamiento; recolección de muestras; metodología de

análisis. Los apéndices del protocolo deben incluir la forma de consentimiento, precauciones que el sujeto debe considerar en caso de posibles reacciones adversas, hoja de instrucciones para el sujeto, forma de análisis clínico y un suplemento describiendo las características del fármaco.

2.8 Monografía de la Hidroclorotiazida (16), (17) y (18).

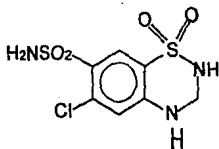
2.8.1 Nombres químicos.

- 6 -Cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida 1,1-dióxido.
- 6-Cloro-7-sulfamilo-3,4-dihidro-1,2,4-benzotiadiazina 1,1-dióxido.
- 2H-1,2,4-Benzotiadiazina-7-sulfonamida, 6-cloro-3,4-dihidro-,1,1-dióxido-

2.8.2 Fórmula condensada.



2.8.3 Fórmula desarrollada.



2.8.4 Peso molecular.

297.75 g/mol

2.8.5 Apariencia.

Polvo blanco cristalino e inodoro

2.8.6 Identificación.

Se cuenta con diversos espectros de referencia tales como infrarrojo, UV, Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas.

2.8.7 Propiedades fisicoquímicas.

El punto de fusión oscila entre 263 y 275 °C aunque por calorimetría de barrido diferencial se ha determinado a 266°C para una velocidad de secado de 1.25 °C/min y a 273.3°C para una velocidad de 80°C/min. Por el método de extrapolación se obtiene un punto de 274.5°C ±0.3°C .

Su densidad es de $1.68 \pm 0.01 \text{ g/cm}^3$.

2.8.8 Solubilidad.

La hidroc lorotiazida es soluble en soluciones acuosas de bases inorgánicas (hidróxido de sodio o hidróxido de amonio) y en bases orgánicas como n-butilamina. Es ligeramente soluble en agua, soluble en etanol y acetona e insoluble en ácidos minerales diluidos.

2.8.9 Absorción UV

En la tabla 2.3 se muestran las absorbancias de la HCTZ en diferentes solventes.

2.8.10 Métodos de análisis de hidroclorotiazida.

A continuación se presentan los métodos más usuales en la identificación y/o cuantificación de la hidroclorotiazida.

- Colorimetría
- Espectrofotometría UV
- Fosforometría
- Fluorometría
- Polarografía
- Titulación acuosa y no acuosa
- Cromatografías: C.C.F., C. Gases, CLAR
- Electroforesis
- Radioinmunoensayo

De estas técnicas las más usadas para detectar HCTZ en fluidos biológicos son la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y la cromatografía de gases; en segundo término se utilizan el radioinmunoensayo, la fluorometría y la fosforometría.

Tabla 2.3

Absorción al ultravioleta de la hidroclorotiazida.

Solvente	\ max nm	\ min nm	log e
Etanol	225		4.576
	269		4.307
	316		3.505
Metanol	226		4.513
		241.5	3.129
	271		4.279
		294	3.272
	317		3.471
Agua	270		4.286
	315		3.495
0.01 N HCl	270		4.290
	315		3.500
0.01 N NaOH	272		4.193
	323		3.435
0.1 N NaOH	221		4.448
		247	
	273		4.198
		299	
	319/320		3.456

2.8.11 Biodisponibilidad de la hidroclorotiazida.

La hidroclorotiazida se absorbe rápidamente después de su administración oral. Esta se detecta en orina una hora después de ser administrada y el comienzo de la acción diurética se encuentra antes de 2 horas. El periodo de tiempo de máxima actividad diurética es de aproximadamente 4 hr con una duración total de 6 a 12 hr (19). Se ha utilizado HCTZ marcada con ^{14}C para rastrear los niveles séricos del fármaco. El nivel máximo encontrado fué de 0.8 mcg/ml en 4 sujetos, 4 hr después de una administración oral de 65 mg de HCTZ marcada (20).

La HCTZ no se metaboliza y se excreta inalterada en la orina mediante proceso de secreción activa en el túbulo proximal. Aproximadamente 50 a 90 % del fármaco se recupera en la orina 24 hr después de la administración de dosis únicas de 25 a 65 mg . La excreción es casi completa dentro de 36 a 48 hr eliminándose aproximadamente el 10% entre las 24 y las 48 hr.

Usando el procedimiento de Bratton-Marshall (por CLAR: fase inversa, fase móvil acetonitrilo-agua), la excreción urinaria de la HCTZ fué comprobada en humanos que recibieron una cápsula comercial y una tableta de formulación experimental, ambas preparaciones conteniendo 25 mg de HCTZ y 50 mg de triamtereno. Inesperadamente se excretó aproximadamente el doble de la HCTZ cuando se administró la tableta respecto a la cápsula (21).

La excreción urinaria de HCTZ se comprobó en 7 sujetos a los cuales se les administraron tabletas conteniendo HCTZ e HCTZ en combinación con hidralazina. El recobro urinario fué 80% de la dosis administrada de HCTZ para ambos productos.

Diferentes estudios indican que existe una influencia significativa de los factores de formulación sobre la velocidad de disolución de tabletas de HCTZ. Mientras que las especificaciones de disolución no han demostrado ser aún un acertado indicador de biodisponibilidad, ésta es un indicador del control de calidad para asegurar consistencia tableta a tableta y lote a lote.

La FDA ha incluido a la HCTZ en la lista de fármacos para los cuales la bioequivalencia es un requerimiento para el registro de nuevos productos (22).

Sin una relación establecida entre niveles sanguíneos y de orina de HCTZ y su actividad diurética y antihipertensiva, es difícil estimar acertadamente la influencia de la biodisponibilidad en la efectividad terapéutica. Pacientes con daños hepático, cardíaco o renal demuestran pobre absorción de HCTZ.

Entre los parámetros farmacocinéticos que existen en la literatura se encuentran:

Biodisponibilidad oral (%)	71 ± 15	Excreción urinaria (%)	95
		% de la fracción absorbida	
Unión a proteínas (%)	64	Depuración (ml/min kg)	4.9 ± 1.1
Vol. distribución (l/kg)	0.83 ± 0.31	Vida media (hr)	2.5 ± 0.2

2.8.12 Farmacología de la hidroclorotiazida (23), (24) y (25).

El mecanismo de acción de los diuréticos antihipertensivos es por disminución del volumen sanguíneo lo cual provoca un descenso de la presión arterial por disminución del retorno venoso y por lo tanto del gasto cardíaco. Con el advenimiento de diuréticos potentes, que son grandes eliminadores de líquido del organismo, en especial agua y sodio por el riñón (natriuréticos) y activos por vía bucal; se ha permitido un tratamiento continuado de la hipertensión arterial, hecho que constituyó un gran progreso.

Los diuréticos antihipertensivos son de origen sintético y comprenden 4 subgrupos de compuestos:

- 1) Las tiazidas o derivados de la benzotiadiazina que son los más empleados y se clasifican a su vez en 4 grupos en orden creciente de potencia.
 - a) Clorotiazida (el de potencia más baja).
 - b) Incluye a la hidroclorotiazida y a la hidroflumetiazida.
 - c) Comprende entre otros a la bendroflumetiazida, ciclotiazida y triclorometiazida.
 - d) El grupo de mayor potencia corresponde a la politiazida y a la ciclopentiazida.
- 2) Las ftalimidinas o derivados de la isoindolina que comprende principalmente a la clortalidona.
- 3) Las quinazolinas o derivados de la quinazolina representados por la quinetazona.
- 4) Derivados de la bencenodisulfonamida como la mefrusida.

5) Los derivados del ácido antranílico y del ácido fenoxiacético que son diuréticos más poderosos que los anteriores pero con potencia antihipertensiva semejante a la de los mismos.

Actualmente se acepta que los efectos hipotensores de los diuréticos del grupo de las tiazidas, ftalimidinas, quinazolinas y derivados del bencenodisulfonamida son paralelos a la potencia diurética y natriurética de los mismos y que a las dosis correspondientes todos poseen la misma potencia antihipertensiva. De tal manera la hidroclorotiazida y la hidroflumetiazida son 10 veces más activas que la clorotiazida con respecto a la dosis y la ciclotiazida y la triclormetiazida lo son 100 veces más.

Tiazidas.

Los medicamentos de este grupo se denominan tiazidas o mejor dicho benzotiadiazinas. Las sustituciones y la naturaleza de los anillos heterocíclicos varían entre los diferentes miembros pero todos ellos tienen en común con los inhibidores de la carbónica anhidrasa un grupo sulfonamida sin substituir.

La administración de tiazidas no modifica, o muy poco, la presión arterial pero en los pacientes hipertensos provoca un descenso apreciable de la presión sistólica y diastólica, en forma inconstante. El efecto hipotensor no es inmediato sino que generalmente aparece a los 2 o 3 días de iniciada la administración del fármaco por vía oral al mismo tiempo que se produce una depleción de agua y sodio por el riñón (acción diurética y natriurética) y una reducción del líquido extracelular y del plasma sanguíneo en forma concomitante, la respuesta antihipertensiva máxima se produce a los 15 días.

La acción antihipertensiva de los diuréticos no es muy potente cuando se emplean solos pero tienen la propiedad de potenciar la acción de los otros agentes hipotensores tales como los la hidralazina, metildopa y sobre todo los fármacos simpaticopléjicos y bloqueadores ganglionares cuyo efecto se acrecenta de manera que dichos diuréticos reducen en un 50% las dosis efectivas de estos últimos fármacos.

Las tiazidas inhiben la absorción de NaCl en los primeros segmentos del túbulo distal. Estudios más recientes han demostrado que el túbulo contorneado distal es el sitio de acción de las tiazidas y que no hay actividad sobre la función de la rama ascendente. Puede haber también un efecto en la resorción de NaCl en el último segmento del túbulo proximal, sin embargo esto no se ha observado en el cuadro clínico común. Cualquier aumento en la salida de NaCl fuera del túbulo proximal es absorbido en la rama ascendente gruesa no inhibida del asa de Henle.

Se conoce poco acerca del sistema de transporte de NaCl que es inhibido por las tiazidas. Normalmente hay un potencial eléctrico negativo en la luz del túbulo contorneado distal, lo que es congruente con una resorción electrogénica de Na^+ . En comparación con el sistema del túbulo colector no parece haber transporte de sodio dependiente de las hormonas mineralocorticoides en el túbulo contorneado distal. En este túbulo existe un proceso activo de resorción para el Ca^{2+} el cual es modulado por la hormona paratiroidea (PTH). Las tiazidas no inhiben la resorción de Ca^{2+} en este sitio, más aún puede haber una estimulación relativa de la resorción de Ca^{2+} cuando las tiazidas inhiben la resorción de NaCl.

2.9 Farmacología del lisinopril.

El lisinopril es un inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina (ACE). Este y otros inhibidores de la enzima de conversión fueron desarrollados específicamente para modificar el factor identificado en la hipertensión arterial. Sin embargo se ha establecido su capacidad para reducir la presión arterial en la mayoría de los pacientes con hipertensión de diversos tipos, además se ha demostrado su utilidad en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva (26).

Con un grupo lisina, el lisinopril es el análogo del enaprilato (el metabolito activo del enalapril) pero a diferencia de éste, es absorbido oralmente como la molécula activa sin requerir de activación hepática. Se absorbe inalterado a través del tracto gastrointestinal y aunque se desconoce el sitio preciso de absorción, sus efectos farmacológicos se atribuyen a la fracción absorbida que oscila entre un 20 y un 30%. Se excreta inalterado por vía renal y se han observado tiempos de vida media de eliminación prolongados en pacientes con disfunción renal. También se ha notado que la edad incrementa el área bajo la curva de concentración de plasma-tiempo incluso cuando ésta se corrige por la diferencia en depuración de creatinina (27).

El lisinopril ha sido utilizado para tratar la hipertensión que va de ligera a moderada. La biodisponibilidad oral del lisinopril aunque menor que la del enalapril es mayor que la del captopril. Tanto el lisinopril como el enalapril carecen de grupos sulfidrilo que son los causantes de algunos efectos colaterales del captopril como las incidencias de erupciones y alteraciones del gusto (28).

Se ha reportado que la presencia de alimentos en el tracto gastrointestinal reduce la absorción del captopril en 30 a 40 %. Esta reducción en biodisponibilidad puede deberse en parte, a la unión del grupo sulfidrilo del captopril a los grupos tioles presentes en la dieta. En 1984 se encontró que la biodisponibilidad del enalapril no se vio afectada por un desayuno estandarizado (29) y de acuerdo a otro estudio realizado en 1986 (30), se determinó que la administración de lisinopril con alimentos no altera significativamente su absorción o biodisponibilidad.

III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Control de calidad de los fármacos de estudio.

Actualmente en el país, solo dos laboratorios fabrican el producto conteniendo la combinación hidroclorotiazida/lisinopril.

Los productos empleados en el estudio fueron los siguientes:

Nombre del producto	Laboratorio	Fórmula
Prinzide	Prosalud(MSD)	12.5 mg HCTZ 20 mg Lisinopril
Zestoretic	ICI - FARMA	12.5 mg HCTZ 20 mg Lisinopril

Ambos productos fueron amablemente donados por los laboratorios correspondientes.

Ya que no esta reportada la combinación en estudio en ninguna de las principales farmacopeas - USP, Británica, Europea - así como tampoco en la

FNEUM 5a. edición, se realizó el análisis de control de calidad marcado en la monografía de hidroclorotiazida de la USP XXII.

3.1.1 Identificación.

Los tiempos de retención de los picos principales obtenidos en el cromatograma de la solución de ensayo corresponden a aquellos obtenidos en la solución estándar.

3.1.2 Disolución.

Medio: Acido clorhídrico 0.1 N, 900 ml

Aparato 1: 100 rpm

Tiempo: 60 minutos

Procedimiento: Las muestras obtenidas al tiempo indicado así como una muestra de concentración conocida fueron inyectadas al cromatógrafo de líquidos para la cuantificación de la HCTZ.

3.1.3 Uniformidad de contenido.

3.1.3.1 Método analítico.

3.1.3.1.1 Soluciones.

- Fase móvil.

Se preparó una mezcla degasificada de agua deionizada, metanol y solución amortiguadora de fosfatos en la siguiente proporción 71:25:4

- Solución de ácido clorhídrico 1 N.

Se tomaron 4 ml de HCl concentrado y se llevaron al aforo con 50 ml de agua.

- Solución amortiguadora de fosfatos.

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

- Solución estándar.

Se preparó una solución a una concentración de 1.0 mg/ml de lisinopril en agua. 10.0 ml de esta solución se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 ml que contenía 100 mg de hidroclorotiazida, 20.0 ml de metanol y 4.0 ml de ácido

clorhídrico. Se llevó al aforo con agua para obtener una solución con una concentración de 0.1 mg/ml de lisinopril y 1.0 mg/ml de hidroclorotiazida.

3.1.3.1.2 Método.

Se pesaron y pulverizaron 20 tabletas. Se transfirió una parte exactamente pesada equivalente a 12.5 mg de hidroclorotiazida a un matraz volumétrico de 50 ml. Se añadieron 15 ml de metanol y 2 ml de ácido clorhídrico. Se agitó el matraz en el baño de ultrasonido por 10 minutos, se llevó al aforo y se agitó por 10 minutos más, después se filtró.

- Sistema cromatográfico.

- Detector UV de onda variable ajustado a 286 nm
- Columna de 30 x 0.39 cm C₁₈
- Velocidad de flujo de 1.0 ml/min

- Procedimiento.

Se inyectaron por separado al cromatógrafo, volúmenes iguales de 5 muestras de solución estándar y 5 muestras de la solución de ensayo. Con las respuestas obtenidas y la concentración conocida de la solución de ensayo se calculó la cantidad de hidroclorotiazida presente en las tabletas.

3.2 Estudio de biodisponibilidad relativa.

3.2.1 Método analítico para cuantificar hidroclorotiazida en orina.

3.2.1.1 Reactivos.

Metanol , HPLC , Mallinckrodt

Acetato de etilo , HPLC , Optima

Toluceno , R.A. , Mallinckrodt

Acido clorhídrico , R.A. , Merck

Acido ortofosfórico , R.A. , Merck

Acido clorhídrico , R.A. , Merck

Bicarbonato de sodio , R.A. , Mallinckrodt

Fosfato monobásico de sodio , R.A. , J.T. Baker

Fosfato monobásico de potasio , R.A. , Mallinckrodt

Hidróxido de sodio , R.A. , Mallinckrodt

Hidroclorotiazida , estándar secundario , ICI-Farma

Lisinopril , estándar secundario , ICI-Farma

Sulfadiazina , estándar secundario , MSD

3.2.1.2 Equipo

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters equipado con:

- Bomba modelo M-45
- Detector modelo 481 de longitud de onda variable.
- Procesador de datos 745-b Data Module.
- Inyector manual Perkin Elmer modelo 7125 con loop de 20 μ l .
- Columna Spherisorb C18 de 25 x 0.46 cm con un tamaño de partícula de 5 μ m fase inversa.

- Jeringa de inyección Hamilton de 50 μ l .

- Baño de ultrasonido Mettler Electronics modelo ME4-6.

- Potenciómetro Corning modelo 7.

- Balanza analítica Sartorius modelo 1801.

- Agitador Vortex Thermolyne modelo 16700.

- Centrifuga Damon / IEC Division modelo IEC HN-S11.

- Sistema de evaporación de solventes:

Baño Labline modelo no. 18000.

Sistema de mangueras adaptadas con pipetas Pasteur.

- Sistema de filtración de líquidos Millipore.

- Deionizador de agua Waters no. 01395-C .

3.2.1.3 Soluciones.

- Fase móvil.

Metanol - fosfato monobásico de sodio 0.01 M (proporción 20:80).

Disolver 0.6894 g de fosfato monobásico de sodio en agua deionizada y llevar al aforo de 500 ml, agitar perfectamente y filtrar la solución; esta solución se mezcla con metanol HPLC en la proporción indicada.

La fase móvil se degasifica en el baño de ultrasonido antes de emplearse.

- Solución de estándar externo.

Pesar con exactitud 100 mg de sulfadiazina y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y llevar a volumen con solución de hidróxido de sodio para obtener una solución con una concentración de 10 µg/ml de sulfadiazina.

- Solución de hidróxido de sodio 1×10^{-4} M

Pesar con exactitud 400 mg de hidróxido de sodio y llevar al aforo con 1000 ml de agua deionizada y filtrada. De esta solución tomar 1 ml y llevar al aforo de 100 ml .

3.2.1.4 Procedimiento.

Un ml de orina de prueba se transfiere a un tubo de ensayo con tapón de rosca conteniendo 250 mg de bicarbonato de sodio, se añaden 2 ml de acetato de

etilo y se agita por 1 minuto en un agitador Vortex. Después de 1 minuto de reposo se centrifuga a 3000 rpm durante 6 minutos, se toma 1 ml de la fase orgánica que se deposita en un tubo de ensayo y se somete a una evaporación bajo corriente de nitrógeno utilizando un baño María a 50 °C. El residuo se reconstituye con 0.5 ml de la solución de estándar externo (10 µg/ml de sulfadiazina en una solución de hidróxido de sodio 1×10^{-4} M). Una vez reconstituido el extracto, se agita en vortex, se toma una alícuota de 20 µl la cual se inyecta al cromatógrafo.

3.2.1.5 Condiciones cromatográficas.

Se empleó una columna de fase inversa Spherisorb C₁₈ de 25 x 0.46 cm. La fase móvil fue metanol - fosfato monobásico de sodio (0.01 M) en proporción 2:8 a un flujo de 1.0 ml/min. El detector se ajustó a 271 nm a una sensibilidad de 0.1 AUFS.

3.2.2 Validación del método analítico.

Los parámetros de evaluación que se tomaron en cuenta para establecer la validación del método analítico fueron los siguientes:

Linealidad	Especificidad
Precisión (Repetibilidad, Reproducibilidad)	Cantidad mínima cuantificable
Exactitud	Cantidad mínima detectable
Estabilidad	Tolerancia

3.2.2.1 Curva patrón de hidroclorotiazida en orina.

Cada curva patrón se preparó de la misma manera, partiendo de una solución patrón y haciendo diluciones consecutivas como se indica a continuación:

Se pesaron exactamente 10 mg de HCTZ y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 ml, se agregaron 2 ml de metanol como cosolvente y se llevó al aforo con orina. A partir de esta solución (100 µg/ ml) se obtuvieron las concentraciones requeridas:

Solución	alícuota	aforar a	Concentración obtenida
sol. patrón (100 µg/ml)	2 ml	10 ml	20 µg/ml
sol. patrón	1 ml	10 ml	10 µg/ml *
* sol. 10 µg/ml	5 ml	10 ml	5 µg/ml

Solución	alícuota	aforar a	Concentración obtenida
* sol. 10 µg/ml	1 ml	10 ml	1 µg/ml **
** sol. 1 µg/ml	5 ml	10 ml	0.5 µg/ml
** sol. 1 µg/ml	1 ml	10 ml	0.1 µg/ml

3.2.2.2 Linearidad.

Se prepararon 3 curvas en orina cuantificándose 6 concentraciones de HCTZ en un intervalo de 0.05 a 20 µg/ml . Para determinar el comportamiento lineal del método se comparó la relación de respuesta expresada en alturas, de HCTZ/estándar externo contra la concentración real de hidroclorotiazida.

3.2.2.3 Precisión

3.2.2.3.1 Repetibilidad

Se determinó analizando 6 curvas de orina adicionadas con hidroclorotiazida a las concentraciones de trabajo (0.05 a 20 µg/ml), las cuales se

analizaron en un mismo día por el mismo analista. De los datos obtenidos se calculó el coeficiente de variación en por ciento.

3.2.2.3.2 Repetibilidad en diferentes días.

Este parámetro se determinó analizando 4 curvas distintas, una cada día a las mismas condiciones de trabajo. Se calculó el coeficiente de variación referido a la relación de respuestas (alturas) entre la concentración real.

3.2.2.4 Exactitud.

Se prepararon 6 soluciones patrón de 100 $\mu\text{g/ml}$ de HCTZ tanto en agua como en orina de acuerdo a los lineamientos descritos en linealidad. Para las soluciones en agua su preparación fué la misma salvo que en vez de orina se aforó con agua deionizada.

Las soluciones de HCTZ en orina se diluyeron con orina a 20 $\mu\text{g/ml}$ y se siguió el procedimiento de extracción para su posterior inyección al cromatógrafo de acuerdo al método descrito en la sección 3.2.1.4.

Para el análisis de las soluciones en agua se procedió de la siguiente manera: Se tomaron 2 ml de la solución patrón, se le añadió un ml de la solución de sulfadiazina (100 $\mu\text{g/ml}$) y se llevó al aforo de 10 ml con hidróxido de sodio $1 \times 10^{-4}\text{M}$. Hecha la dilución, las muestras se inyectaron directamente al cromatógrafo.

3.2.2.5 Especificidad.

Se efectuó una comparación entre muestras de orina blanco (sin adición de ningún fármaco), muestras de orina adicionadas de hidroclorotiazida y muestras de orina adicionadas de hidroclorotiazida, cafeína, ácido acetilsalicílico, acetaminofén, así como de amilorida y lisinopril; fármacos que podrían formar parte de las formulaciones en estudio.

3.2.2.6 Estabilidad de las muestras.

Se prepararon muestras de orina adicionadas de hidroclorotiazida a una concentración de 20 µg/ml y se almacenaron en congelación a -4°C. Se analizó una muestra cada semana durante 6 semanas y se estableció si las muestras se degradaban.

3.2.2.7 Tolerancia.

Este parámetro se evaluó tomando en cuenta las variaciones que se podían sufrir en el sistema:

- Cambios en la proporción de disolventes de la fase móvil por evaporación. Para ello se modificó la concentración de metanol, que es el disolvente más volátil de la fase, disminuyéndose hasta la mitad de su concentración original.
- Cambios en la marca de disolvente. Se realizó utilizando 3 diferentes marcas de metanol grado HPLC.
- Disminución del número de platos teóricos de la columna así como cambio de marca. Esto se determinó utilizando 3 diferentes columnas con diferente número de platos teóricos.

3.2.2.8 Cantidad mínima detectable.

Se realizaron diluciones a partir de la mínima concentración de trabajo hasta que se detectaron señales cuyo tamaño de pico fuera 3 veces superior a los picos producidos por la señal del ruido.

3.2.2.9 Cantidad mínima cuantificable.

Se hicieron diluciones de 1.0 a 0.01 $\mu\text{g/ml}$ de hidroclorotiazida en orina determinándose que el tamaño del pico de las señales fuera 10 veces mayor al del ruido y que el coeficiente de variación de dichas señales fuera menor al 10%.

3.2.3 Estudio preliminar.

En este estudio participó un sujeto sano de 23 años, sexo masculino con estatura de 1.76 m y peso de 65 kg. Se tomaron muestras a los siguientes tiempos: 0, 30, 60, 90, 105, 120 min y a las 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 25.5, 28.5, 30, 37, 48 y 58 hr. El sujeto permaneció en ayunas 10 hr antes de empezar el estudio y recibió un desayuno (que sería propuesto como el estándar) 4 hr después del inicio. Con los datos obtenidos se establecieron los tiempos de muestreo del estudio final.

3.2.4 Estudio de biodisponibilidad relativa.

Se elaboró una hoja de consentimiento en la que se informó a los voluntarios los efectos colaterales posibles y firmaron una hoja de consentimiento (Apéndices A y B), así mismo se diseñó el protocolo de estudio (Apéndice C) en el que se incluyeron todas las instrucciones que el voluntario debía seguir acompañado de una hoja de registro de datos (Apéndice D).

Además del protocolo, a cada voluntario se le dió una explicación acerca del estudio y se le aclararon las dudas surgidas al respecto.

En el estudio participaron 9 voluntarios clínicamente sanos cuyas edades fluctuaron entre los 23 y los 26 años de los cuales 3 fueron hombres y 6 mujeres. Los voluntarios no tomaron medicamento alguno al menos 1 semana antes ni durante el estudio.

La distribución de los voluntarios se dió al azar utilizando una clave para cada uno de ellos con la cual se llenaron los registros a lo largo de todo el estudio. La secuencia del estudio se muestra en la tabla 3.1

El estudio se llevó a cabo siguiendo un diseño de cuadrado latino 3 x 3 dejando 7 días de lavado entre la administración de un producto y otro. El día de la toma del fármaco los voluntarios permanecieron en ayunas desde la noche anterior. 4 horas después de la ingestión se proporcionó una comida estándar que consistió en 1 sandwich de jamón, 1 torta de salchicha, 1 gelatina, una ensalada de fruta y agua de sabor. Se solicitó a los voluntarios que consumieran todo su desayuno y no se permitió que ingirieran nada más.

El medicamento se administró con 250 ml de agua, cada voluntario ingirió además 100 ml de agua cada hora durante las primeras 4 horas. Después la ingestión fué ad libitum. Se tomaron muestras a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12, 24, 30, 38 y 48 horas. Todos los estudios comenzaron entre las 7:00 y las 8:00 horas del día.

Se midió el volúmen de cada muestra en una probeta y se separaron 15 ml, los cuales fueron congelados inmediatamente. Se registró el volúmen en la hoja de datos así como la hora y fecha a la cual fué tomada la muestra. Las muestras fueron analizadas antes de una semana mediante el método descrito en la sección 3.2.1.4 .

Los medicamentos de estudio fueron Prinzide de Prosalud (MSD); Zestoretic de ICI y una solución acuosa conteniendo 12.5 mg de hidroclorotiazida.

3.2.5 Análisis estadístico de los datos.

Una vez obtenidos los datos del estudio y determinada la concentración y cantidad excretada del fármaco, se procesó toda esta información para poder tener una comparación real y objetiva del comportamiento de cada producto. Los datos se procesaron utilizando el paquete estadístico Biopak 2.0 SCI.

Tabla 3.1 Secuencia del estudio de biodisponibilidad relativa.

Gpo/voluntario	Semana 1 se administró	Semana 2 se administró	Semana 3 se administró
I	I1		
	I2	PRINZIDE	SOLUCION
	I3		ZESTORETIC
II	II4		
	II5	ZESTORETIC	PRINZIDE
	II6		SOLUCION
III	III7		
	III8	SOLUCION	ZESTORETIC
	III9		PRINZIDE

IV RESULTADOS

4.1 Control de calidad de los productos.

4.1.1 Identificación.

El tiempo de retención para la hidroclorotiazida en solución fué de 7.2 minutos. El mismo valor fué obtenido para cada uno de los 2 lotes de cada producto.

4.1.2 Disolución.

Los resultados de esta prueba se presentan en la tabla 4.1

Tabla 4.1 Resultados de disolución.

Producto	Lote	HCTZ (Disuelta) * % ± D.E. 60 min, 100rpm, ap 1
Prinzide	MY1554B	88.63 ± 2.14
	MY2789A	87.98 ± 1.53
Zestoretic	152NB	89.23 ± 0.41
	257NE	89.12 ± 1.18

* Promedio de 6 tabletas.

4.1.3 Variación de peso y uniformidad de contenido.

Los resultados se muestran en las tablas 4.2 y 4.3 .

Tabla 4.2 Variación de peso de los productos estudiados.

Producto	Lote	P. promedio (g)	C.V. (%)
Prinzide	MY1554B	0.225	1.05
	MY2789A	0.227	1.11
Zestoretic	152NB	0.220	0.98
	257NE	0.223	1.58

Tabla 4.3 Valores de uniformidad de contenido de HCTZ.

Producto	Lote	Cant. HCTZ (mg)	D.E.R. (%)	Fuera de límites: 11.875 - 13.125 mg
Prinzide	MY1554B	12.27	1.97	0
	MY2789A	12.81	2.83	0
Zestoretic	152NB	12.13	2.12	0
	257NE	12.39	1.04	0

4.2 Estudio de biodisponibilidad relativa.

4.2.1 Validación del método analítico.

En la figura 4.3a) se presenta un cromatograma típico de HCTZ en orina en el que se observa que los tiempos de retención fueron 6.86 min para HCTZ y 8.18 min para el estándar (sulfadiazina).

4.2.1.1 Linealidad.

En la tabla 4.4 se muestran los resultados de linealidad del método para cuantificar hidroclorotiazida en orina. Al hacer un análisis de regresión se obtuvo una pendiente de 0.1017, un intercepto de 0.012 y un coeficiente de correlación de 0.9989. En la figura 4.1 se presenta gráficamente la linealidad del método.

4.2.1.2 Precisión.

4.2.1.2.1 Repetibilidad.

En la tabla 4.5 se presenta la repetibilidad del método bajo las mismas condiciones de operador, equipo y laboratorio. El coeficiente de variación más alto fue de 5.87% a una concentración de 0.5 µg/ml.

Tabla 4.4 Linearidad del método.

relación de alturas	HCTZ/STD (a)	(a) / conc.	HCTZ/STD (b)	(b) / conc.	HCTZ/STD (c)	(c) / conc.
Conc. μ g/ml	curva no.1		curva no.2		curva no.3	
0.1	0.0099	0.0990	0.0101	0.1011	0.0105	0.1053
0.5	0.0545	0.1090	0.0495	0.0990	0.0447	0.0894
1.0	0.1022	0.1022	0.1009	0.1009	0.0990	0.0990
5.0	0.4740	0.0948	0.4489	0.0898	0.4788	0.0958
10.0	0.9574	0.0957	0.9947	0.0995	0.9886	0.0989
20.0	2.0273	0.1014	2.0180	0.1009	1.9852	0.0993

Tabla 4.5 Repetibilidad del método

Concentración (μ g/ml)	Media \pm D.E. relación de alturas	C.V. (%)
0.1	0.1018 \pm 0.0016	4.03
0.5	0.0984 \pm 0.0023	5.87
1.0	0.0979 \pm 0.0014	3.52
5.0	0.0980 \pm 0.0017	4.40
10.0	0.0983 \pm 0.0009	2.34
20.0	0.1009 \pm 0.0011	2.82

4.2.1.2.2 Repetibilidad en diferentes días.

En la tabla 4.6 se muestran los valores de repetibilidad en diferentes días a las concentraciones de trabajo.

Tabla 4.6 Repetibilidad del método en diferentes días.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Media \pm D.E. relación de alturas	C.V. (%)
0.1	0.1004 ± 0.0071	7.11
0.5	0.0991 ± 0.0058	5.92
1.0	0.0964 ± 0.0043	4.46
5.0	0.0996 ± 0.0061	6.15
10.0	0.0987 ± 0.0025	2.55
20.0	0.1015 ± 0.0034	3.39

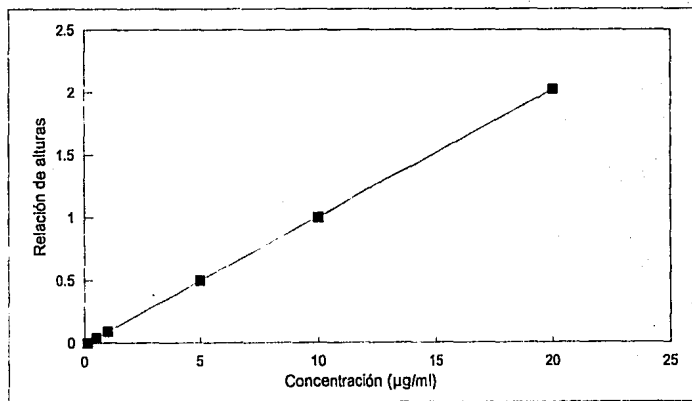
4.2.1.3 Exactitud

En la tabla 4.7 se presenta la exactitud del método al comparar las alturas de ICTZ/SDZ en en solución y después de la extracción a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 4.7

HCTZ/SDZ solución	HCTZ/SDZ extracción	
Relación de alturas	Relación de alturas	
1.2709	1.2562	
1.2914	1.2489	
1.3298	1.2211	
1.3091	1.2450	
1.3119	1.2115	
1.3012	1.2507	
Promedio	Promedio	Extracción (%)
1.3024	1.2389	95.13

Figura 4.1 Linearidad del método analítico.



4.2.1.4 Especificidad.

Cuando se corrió una muestra de orina blanco no se detectó ningún pico, al seguirse la técnica de extracción en la misma, solo se detectó el pico correspondiente al estándar externo.

Se analizó una muestra de orina adicionada de hidroclorotiazida detectándose este pico y el del estándar. Finalmente se añadieron a la muestra de orina los fármacos aspirina, acetaminofen, lisinopril, amilorida y cafeína; no se detectó la aparición de algún pico adicional y las señales registradas de HCTZ y el estándar (sulfadiazina) no sufrieron cambios.

Los resultados se presentan en las figuras 4.2 y 4.3

4.2.1.5 Estabilidad de las muestras.

En la tabla 4.8 se presentan los resultados de los análisis de estabilidad a -4°C .

4.2.1.6 Tolerancia.

La fase móvil se modificó variando la concentración de metanol de un 20% (original) a un 10%, es decir que se redujo a la mitad. Se encontró que la magnitud de las respuestas obtenidas tanto de la hidroclorotiazida como del estándar externo no se vio modificada salvo que el tiempo de retención aumentó de 10 a 15 minutos.

Al cambiar la marca de metanol grado HPLC no se observó cambio alguno.

El sistema tolera hasta un mínimo de 10000 platos teóricos/m obteniéndose valores de Resolución (R)=2 y Tiempo de retención (tr)=10 min

Se probó una columna con 3000 platos teóricos/m obteniéndose valores de Resolución = 0.5 sin embargo al cambiar la velocidad de flujo de 1.0 a 0.6 ml/min se obtuvieron valores de Resolución = 1.5 y un tiempo de retención = 15 min.

Se probaron columnas Alltech y Spherisorb mostrando ambas resultados satisfactorios.

Tabla 4.8 Estabilidad de muestras de orina.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Semana (- 4° C)	Relación de alturas hctz/sdz promedio
20.0	inicio	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

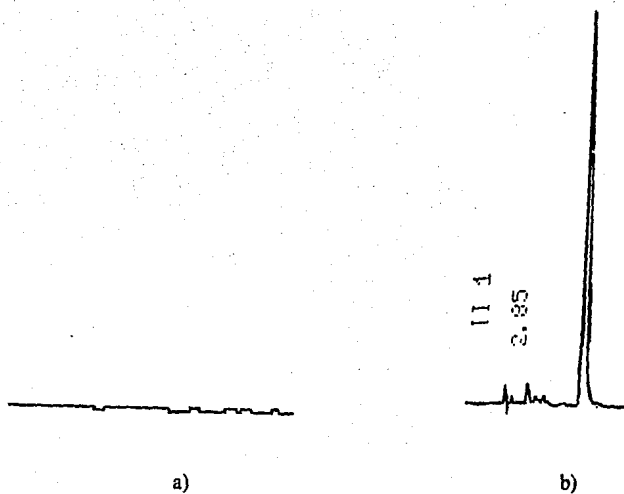


Figura 4.2 Cromatogramas obtenidos para la especificidad del método.

a) Muestra de orina blanco.

b) Muestra de orina blanco adicionada del estándar externo.

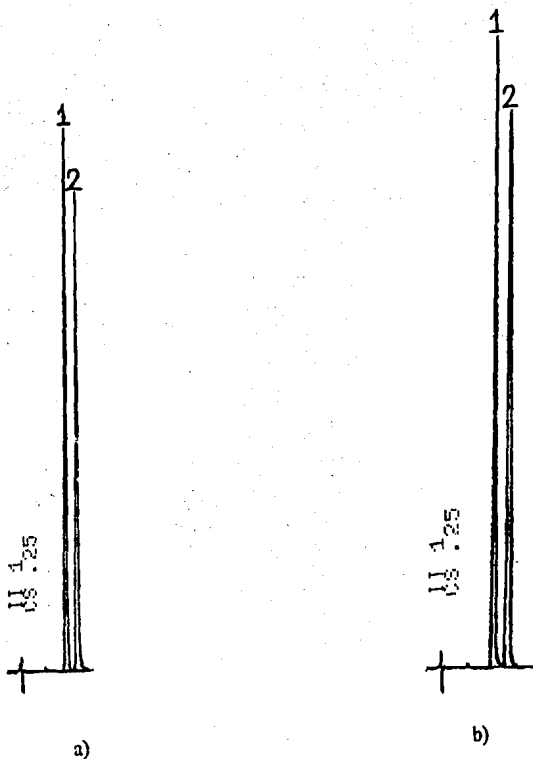


Figura 4.3 Cromatogramas obtenidos para la especificidad del método.

a) Muestra de orina conteniendo HCTZ y estándar externo.

b) Muestra de orina conteniendo HCTZ, amilorida, lisinopril, aspirina, acetaminofen y cafeína extraída con estándar externo.

1 - Hidroclorotiazida.

2 - Sulfadiazina.

4.2.1.7 Concentración mínima detectable.

La cantidad mínima detectable fué de 10 ng/ml de acuerdo a lo descrito en la sección 3.2.2.8 .

4.2.1.8 Concentración mínima cuantificable.

La concentración mínima cuantificable fué de 50 ng/ml (3.2.2.9).

4.2.2 Estudio preliminar de biodisponibilidad.

Los datos recabados en este estudio preliminar se muestran en la tabla no. 4.9. El producto estudiado fué Prinzide (lote: MY1554B).

La representación de las gráficas promedio de cantidad excretada acumulada vs tiempo, velocidad de excreción vs tiempo y sigma menos se muestra en las figuras 4.4, 4.5 y 4.6 .

De las figuras 4.5 y 4.6 se encontraron los siguientes parámetros:

$$t_{1/2} = 11.18 \text{ hr}$$

$$\beta = 0.062 \text{ hr}^{-1}$$

$$t_{\text{max}} = 2.2 \text{ hr}$$

$$\text{Vel. exc. max.} = 14.44 \mu\text{g/ml}$$

$$\% \text{ excretado} = 58\%$$

Tabla 4.9 Estudio preliminar.

Tiempo (hr)	Volúmen de orina (ml)	Concentración ICTZ (μg hctz/ml orina)
0.5	23	0.61
1.0	70	1.11
1.5	160	1.57
2.0	135	1.74
2.5	415	1.74
3.0	160	3.35
4.0	350	3.18
6.0	170	6.30
8.0	515	1.31
10.0	340	1.48
15.0	145	2.41
25.5	320	2.21
28.5	140	1.61
31.0	50	0.95
36.5	250	1.02
48.5	380	0.76
58.5	440	0.42

Figura 4.4 Cantidad acumulada excretada de HCTZ vs tiempo

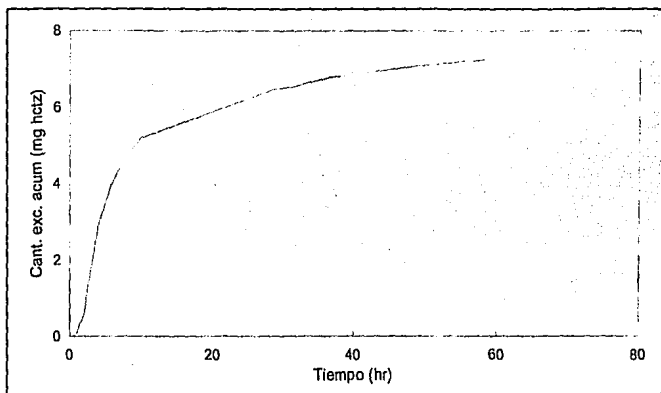


Figura 4.5 Velocidad de excreción vs tiempo

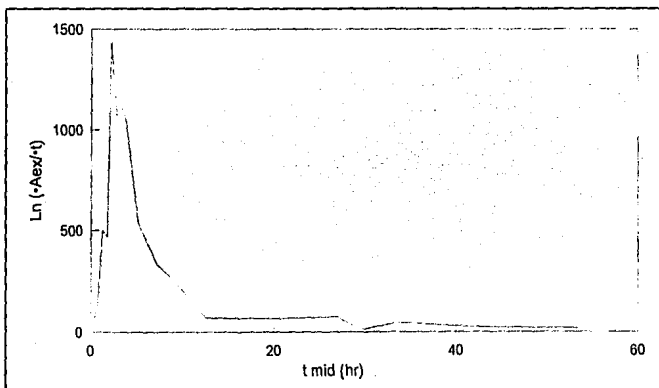
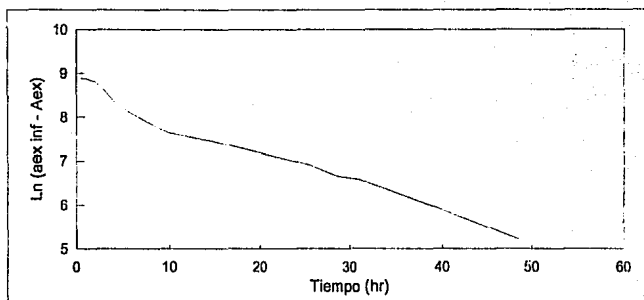


Figura 4.6 Gráfica de "sigma menos" para el estudio preliminar.



4.2.3 Estudio de biodisponibilidad relativa.

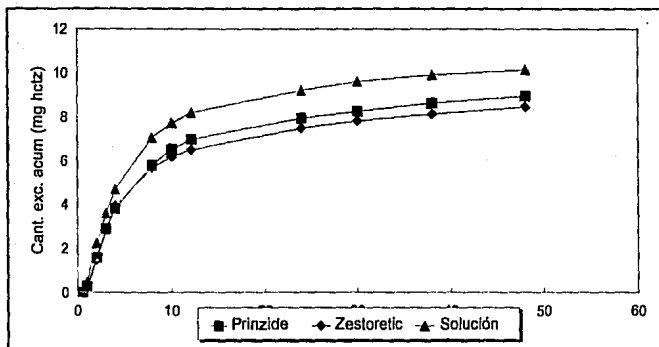
Los datos de cantidad acumulada excretada (promedio) se presentan en la tabla 4.10, los datos individuales se presentan en el apéndice E. Estos datos representan la cantidad de hidroclorotiazida excretada en 48 hr tanto de los dos productos comerciales como de la solución (ver figura 4.7).

En la tabla 4.11 se muestran los valores promedio de velocidad de excreción y la figura 4.8 la representación gráfica de los resultados.

Tabla 4.10 Valores promedio de la cantidad acumulada excretada después de la administración de los dos productos comerciales conteniendo HCTZ y de la solución (Dosis de 12.5 mg).

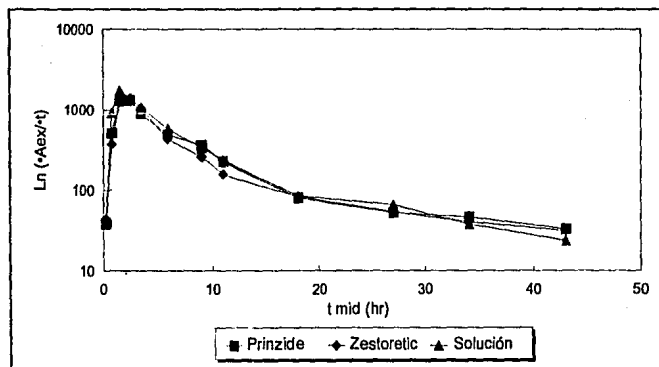
Tiempo (hr)	Prinzide mg HCTZ ± e.s.	Zestoretic mg HCTZ ± e.s.	Solución mg HCTZ ± e.s.
0.5	0.0189±0.002	0.0218±0.008	0.0207±0.003
1	0.2770±0.046	0.2095±0.045	0.4792±0.108
2	1.5844±0.180	1.4610±0.186	2.2301±0.189
3	2.8991±0.188	2.8607±0.224	3.6108±0.195
4	3.7999±0.193	3.9230±0.2618	4.6918±0.179
8	5.7830±0.203	5.6633±0.304	7.0440±0.393
10	6.5105±0.210	6.1789±0.328	7.7120±0.407
12	6.9667±0.257	6.4901±0.332	8.1875±0.432
24	7.9341±0.250	7.4879±0.398	9.2034±0.487
30	8.2489±0.275	7.8112±0.421	9.6018±0.499
38	8.6198±0.296	8.1342±0.458	9.9058±0.494
48	8.9492±0.289	8.4496±0.467	10.1424±0.47

Figura 4.7 Cantidad acumulada excretada vs tiempo



Estudio de biodisponibilidad relativa de productos conteniendo HCTZ

Figura 4.8 Velocidad de excreción vs tiempo



Estudio de biodisponibilidad relativa de productos conteniendo HCTZ

Tabla 4.11 Valores promedio de Velocidad de excreción después de la administración de los 2 productos comerciales y la solución.

T mid (hr)	Prinzide mg HCTZ/hr ± e.s.	Zestoretic mg HCTZ/hr ± e.s.	Solución mg HCTZ/hr ± e.s.
0.25	0.0379 ± 0.005	0.0437 ± 0.015	0.0414 ± 0.006
0.75	0.5161 ± 0.095	0.3753 ± 0.077	0.917 ± 0.215
1.5	1.3073 ± 0.160	1.2515 ± 0.145	1.7508 ± 0.204
2.5	1.3148 ± 0.095	1.3997 ± 0.113	1.3808 ± 0.05
3.5	0.9007 ± 0.065	1.0621 ± 0.102	1.081 ± 0.070
6	0.4958 ± 0.041	0.4351 ± 0.0398	0.588 ± 0.085
9	0.3637 ± 0.082	0.2578 ± 0.023	0.334 ± 0.028
11	0.2281 ± 0.031	0.1556 ± 0.017	0.2377 ± 0.032
18	0.0806 ± 0.0105	0.0832 ± 0.011	0.0847 ± 0.014
27	0.0524 ± 0.007	0.0539 ± 0.008	0.0664 ± 0.009
34	0.0464 ± 0.0049	0.0405 ± 0.007	0.0380 ± 0.007
43	0.0329 ± 0.0064	0.0314 ± 0.005	0.0236 ± 0.0036

En la tabla 4.12 se muestran los valores de tiempo de vida media de absorción y de eliminación obtenidos, así como t max y velocidad de excreción máxima.

Tabla 4.12 Parámetros farmacocinéticos.

Producto	t½ abs (min)	t½ elim (hr)	Vel. exc.max (mg/hr)	t max. (hr)	Aex (mg HCTZ)
Prinzide	9.47 ± 1.68	3.8317 ± 0.195	3.1804 ± 0.025	1.94 ± 0.17	8.9492
Zestoretic	11.20 ± 0.9	3.7709 ± 0.232	3.1814 ± 0.029	2.05 ± 0.17	8.4496
Solución	7.68 ± 0.78	3.6531 ± 0.258	3.2509 ± 0.037	1.64 ± 0.18	10.1424

En la tabla 4.13 se presentan los valores de tiempo medio de residencia.

Tabla 4.13.

No. voluntario	Prinzide (hr)	Zestoretic (hr)	Solución (hr)
I1	4.1123	4.1485	3.5895
I2	3.9406	3.6858	3.7629
I3	2.9526	6.0499	3.2354
II4	4.3697	4.7548	4.0674
II5	3.4919	3.0708	3.2085
II6	3.2674	2.4571	2.2471
III7	3.8208	3.5261	3.7152
III8	4.0071	4.7954	4.790
III9	3.9267	3.6925	3.098
prom. ± e.s.	3.76 ± 0.15	4.02 ± 0.35	3.52 ± 0.23

4.2.4 Análisis estadístico de los datos.

El análisis de varianza realizado con los datos obtenidos de cantidad excretada acumulada se muestra en la tabla 4.14. Los resultados obtenidos de los intervalos de confianza Westlake se presenta en la tabla 4.15 .

Tabla 4.14 Análisis de varianza del estudio de biodisponibilidad relativa.

F.V.	S.C.	g.l.	F	Prob.
Secuencia	3.1034	2	1.6319	0.2306
Suj (sec)	20.9612	6	3.6741	0.0210
Periodo	1.9469	2	1.0237	0.3846
Fórmula	13.6155	2	7.1596	0.0072
Error	13.3121	14		

Tabla 4.15 Intervalos de confianza del estudio de biodisponibilidad relativa.

Contraste	Clásico	Westlake
Solución / Zestoretic	(75.32 , 91.29)	(77.21 , 122.78)
Solución / Prinzide	(80.25 , 96.22)	(82.14 , 117.86)
Prinzide / Zestoretic	(84.06 , 106.06)	(93.25 , 106.75)

V

ANALISIS DE RESULTADOS

5.1 Control de calidad de los medicamentos de estudio.

Primeramente se demostró la identidad del principio activo de cada uno de los lotes de cada producto.

La disolución es un parámetro importante en la evaluación de la calidad de un producto ya que afecta directamente la disponibilidad del fármaco. Los resultados demostraron que los 2 lotes de cada producto cumplieron con lo especificado en farmacopea (No menos de 75% de principio activo disuelto a los 30 minutos) y no presentaron diferencias significativas entre ellos.

En cuanto a la uniformidad de contenido, ésta se realizó analizando 10 tabletas individuales para cada lote, ninguna tableta estuvo fuera del intervalo 90% - 110 % y la D.E.R fué menor a 6 en los 4 casos.

Efectuado el control de calidad de los productos de estudio, se comprobó tanto la calidad de los mismos como su equivalencia química; es decir que no solo se comprobó que los medicamentos cumplieran los lineamientos farmacopéicos sino que al compararlos entre ellos se determinó que no había diferencias significativas que pudieran ocasionar variaciones en el estudio.

5.2 Estudio de biodisponibilidad relativa.

5.2.1 Método analítico.

El método analítico desarrollado se basó principalmente en la técnica reportada en el trabajo de Cooper et al (31) así como en los trabajos de V.P. Sha et al (32) y Barhaiya et al (33). Se efectuaron algunas modificaciones sobre estos trabajos para obtener los mejores resultados de acuerdo al equipo con que cuenta el laboratorio y con los reactivos y recursos disponibles.

El método analítico desarrollado mostró algunas ventajas sobre las técnicas ya reportadas:

- 1) Es menos desgastante para la columna por lo que se alarga el tiempo de vida útil de la misma.
- 2) La técnica de extracción es sencilla.
- 3) Se obtienen tiempos de retención cortos sin manejar altas velocidades de flujo de la fase móvil.
- 4) La fase móvil es económica en comparación de algunas técnicas que utilizan altas concentraciones de acetonitrilo.
- 5) El tener una muestra de análisis seca para ser reconstituída es ventajoso cuando se maneja un gran número de muestras.
- 6) Esta técnica resulta muy selectiva respecto a la hidroclorotiazida.

En la técnica se empleó un estándar externo y no uno interno debido a las propiedades de solubilidad de la sulfadiazina. La sulfadiazina es soluble en soluciones alcalinas o ligeramente alcalinas, sin embargo es insoluble en acetato de etilo por lo que se optó por agregarla en la reconstitución de la muestra

analítica (solución de sulfadiazina en NaOH 10^{-4} M) . Se probaron otras sulfas (Sulfametacina, Sulfatiazol, etc.) sin encontrar alguna que tuviera un tiempo de retención adecuado para el método analítico.

El método se desarrolló para efectuar estudios en orina debido a que la hidroclorotiazida no se metaboliza y se excreta por vía renal. De esta forma era más factible realizar un estudio de esta naturaleza dadas las necesidades y requerimientos que implica un estudio en sangre.

5.2.2 Validación del método analítico.

5.2.2.1 Linearidad.

Como el coeficiente de correlación es mayor a 0.99 y el coeficiente de determinación es mayor a 0.98, el método es lineal en un intervalo de 0.1 a 20.0 $\mu\text{g HCTZ/ ml}$.

La ecuación que describe a la recta es la siguiente:

$$y = 0.1017x - 0.0122$$

5.2.2.2 Precisión.

En el parámetro de repetibilidad se determinaron los coeficientes de variación para cada concentración de la curva en los que el menor fué de 2.82% y el mayor de 5.87%, como el límite máximo permitido es de 10.0% el método es entonces repetible.

En cuanto a la repetibilidad en diferentes días, el mayor coeficiente de variación que se obtuvo fué de 7.11% por lo que el método también es repetible entre días.

5.2.2.3 Exactitud

El 95.13% de extracción obtenido demuestra la eficiencia del método mostrando la concordancia de los valores obtenidos respecto a los valores verdaderos.

5.2.2.4 Especificidad.

El método demostró ser específico al fármaco en estudio puesto que no se detectaron en los cromatogramas picos ajenos a los correspondientes a la hidroclorotiazida y a la sulfadiazina . Así, ni sustancias endógenas de la orina ni los fármacos adicionados fueron detectados en los cromatogramas ni tampoco afectaron la respuesta de las señales de detección.

5.2.2.5 Tolerancia.

Al analizarse los posibles cambios que pudiera llegar a sufrir el sistema a lo largo del estudio, se probó que éste es tolerante a cambios importantes tanto en variación de la concentración de la fase móvil como en el número de platos teóricos de la columna.

Es importante notar cómo un cambio en la proporción de metanol afecta mayormente al tiempo de retención del pico correspondiente a la hidroclorotiazida pues al disminuirse se obtienen tiempos de retención más altos. Cuando se tienen alrededor de 7000 platos teóricos es necesario disminuir la

velocidad de flujo para poder tener una resolución adecuada y modificar la cantidad de metanol para reducir el tiempo de retención.

Cuando se usó una columna con menos de 3000 platos teóricos, se observó un doble pico en vez de uno correspondiente a la hidroclorotiazida.

5.2.2.6 Cantidad mínima detectable y cuantificable.

El método resultó ser sumamente sensible pues son detectables concentraciones de 10 ng/ml y cuantificables cantidades de 50 ng/ml.

5.2.2.7 Estabilidad.

Un análisis de los datos mediante una prueba de *t* de student demostró que las muestras de orina son estables en congelación a -4°C hasta una semana, tiempo en el que éstas pueden ser analizadas con confiabilidad puesto que el fármaco no se ha degradado significativamente.

Una vez determinados y aprobados estos parámetros, se estableció que el método era confiable para poder realizar el estudio de biodisponibilidad relativa y considerando los datos de estabilidad, las muestras se cuantificaron en un período de tiempo menor a una semana.

5.2.3 Estudio preliminar de biodisponibilidad.

En el estudio preliminar se observó el comportamiento del fármaco de prueba determinándose lo que se esperaría para el estudio de biodisponibilidad relativa.

Las concentraciones que se determinaron estuvieron en el intervalo de 0.42 a 6.3 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de tal forma que estuvieron dentro de los límites en los que se validó el método (0.1 hasta 20 μg HCTZ/ml). De los parámetros que se obtuvieron, el porcentaje excretado a las 58.5 hr fué de 58 % lo cual está de acuerdo con lo reportado en la literatura (ver sección 2.8).

De los 17 tiempos de muestreo con los que se hizo el preliminar, se seleccionaron los 12 más importantes para el estudio de biodisponibilidad relativa (figura 4.5).

5.2.4 Estudio de biodisponibilidad relativa.

De los datos de la tabla 4.10 y la figura 4.7 se observa que los porcentajes excretados después de la administración de Prinzide y Zestoretic son muy similares (71.59% y 67.59% respectivamente) mientras que el porcentaje excretado de la solución es ligeramente superior con 81.14%.

En las gráficas de cantidad acumulada excretada vs tiempo (figura 4.7) y de velocidad de excreción vs tiempo (figura 4.8) se observa que los perfiles de los 2 productos y la solución son muy similares. En el caso de la primer gráfica se aprecia una mayor similitud entre los 2 productos comerciales y una velocidad de excreción un poco mayor de la solución aunque con el mismo patrón. En la

segunda gráfica es más notable la igualdad de respuesta entre los 2 productos y la solución.

La división de bioequivalencia de la FDA en la oficina de fármacos genéricos usualmente evalúa la bioequivalencia por comparación de la velocidad y grado de absorción in vivo de una formulación probada en relación a un patrón de referencia en sujetos sanos de tal modo que se analizan las muestras para determinar la concentración de fármacos y/o metabolitos y los parámetros farmacocinéticos (AUC, C max, T max) (34). Para el caso de estudios en orina, se evalúan los parámetros que se muestran en la tabla 4.12 donde se presenta nuevamente una mayor similitud entre los productos comerciales y una diferencia con respecto a la solución donde el tiempo de vida media de absorción es mas corto para la solución y una velocidad de excreción mayor para la misma con un tmax. menor. En la tabla 4.13 se muestran los tiempos medios de residencia que es una forma de determinar la disposición del fármaco en el organismo, en la que se observa un menor tiempo medio de residencia para la solución que para los fármacos de estudio.

La metodología estadística basada en la hipótesis nula no es apropiada para asegurar la bioequivalencia. La división de bioequivalencia ha empleado un procedimiento para determinar si los valores promedio para parámetros de biodisponibilidad medidos después de la administración de los productos de prueba y referencia son comparables. Este procedimiento involucra el cálculo de un intervalo de confianza para la relación o diferencia entre los promedios de las variables farmacocinéticas entre los productos prueba y de referencia.

Se debe realizar un análisis de varianza para los parámetros indicadores de biodisponibilidad usando programas estadísticos y modelos apropiados de tal modo que se incluyan factores para las siguientes fuentes de variación:

- 1.- Secuencia (a veces llamado grupo u orden).
- 2.-Sujetos.
- 3.- Período (o fase).
- 4.- Tratamiento (a veces llamado fármaco o formulación).

Existen otras consideraciones para efectuar un análisis de varianza:

- 1.- Distribución al azar.
- 2.- Homogeneidad de varianzas.
- 3.-Adición (linearidad) del modelo estadístico.
- 4.- Independencia y normalidad de los residuales.

Estas consideraciones pueden interpretarse como sigue:

- 1.- Los sujetos elegidos para el estudio deben asignarse al azar en las secuencias de estudio.
- 2.- Las variaciones asociadas con los 2 tratamientos así como entre los grupos de secuencia deben ser iguales o al menos comparables.
- 3.- Los efectos principales del modelo estadístico tales como sujeto, secuencia, período y efecto del tratamiento para un estudio cruzado deben ser aditivos. No debe haber interacciones entre estos efectos.
- 4.- Los residuales del modelo deben ser independientes y normalmente distribuidos, es decir que los datos de biodisponibilidad deben tener una distribución normal.

Los resultados del análisis de varianza (tabla 4.14) muestran que existen diferencias significativas en los tratamientos de sujeto(sec) ($f=3.67$) y formulación ($f=7.16$) donde la f teórica es de 2.73 .

En cuanto a los intervalos de confianza que se muestran en la tabla 4.15, se observa que el contraste de Solución/Zestoretic se encuentra fuera por escaso margen del intervalo 80-120% (se consideró este criterio que es el más aceptado y utilizado en la actualidad) mientras que el contraste Solución/Prinzide esta dentro del intervalo aunque cerca de los límites; sin embargo al hacer el contraste Prinzide/Zestoretic el intervalo de confianza que se obtiene entra dentro del intervalo establecido. Es necesario considerar que la solución tiene una mayor velocidad de absorción siendo lógico que los contrastes contra los fármacos se encuentren en los límites de la equivalencia.

VI CONCLUSIONES

- 1) Los productos estudiados cumplieron con las especificaciones de control de calidad que marca la USP XXII .
- 2) El método analítico desarrollado es lineal, repetible, reproducible y exacto en un intervalo de 0.1 a 20 $\mu\text{g/ml}$.
- 3) El método analítico es selectivo para la hidroclorotiazida. Se encontró que otros agentes antihipertensivos como lo son el lisinopril y la amilorida y otros fármacos de uso común como aspirina, acetaminofen y cafeína no interfieren en el análisis.
- 4) Tanto la hidroclorotiazida como el lisinopril no se metabolizan y son excretados inalterados en la orina en un alto porcentaje, esto permite que la metodología desarrollada sea válida en este estudio.
- 5) De acuerdo a los resultados obtenidos, la presencia de lisinopril no afecta la farmacocinética de la hidroclorotiazida.
- 6) En solución, la hidroclorotiazida se absorbe más rápidamente que en una forma farmacéutica sólida como lo es una tableta.
- 7) Los productos comerciales estudiados son bioequivalentes entre si y por lo tanto pueden ser intercambiables.

Apéndice A

HOJA DE CONSENTIMIENTO PARA EL ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA 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 biodisponibilidad relativa de productos comerciales que contienen Hidroclorotiazida y Lisinopril.

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

Contraindicaciones:

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

Precauciones:

En algunos casos se puede presentar hipotensión no complicada.

No se recomienda usarla en caso 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 cuando se administra por períodos prolongados es el mareo.

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, parestesia y astenia.

Apéndice C

PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA 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 hr del día anterior al estudio. El sujeto tomará un desayuno estándar 4 hr 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 4 hr, después del desayuno la ingesta de agua será ad libitum.

5.- Se colectarán las muestras de orina a los siguientes tiempos (hr):

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 ensaye 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 del 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 E

Excreción Urinaria de Hidroclorotiazida

Cantidad Acumulada Excretada en cada uno de los voluntarios después de los diferentes tratamientos

Voluntario 1 I

T. muestreo (hr)	Prinzide (mg HCTZ)	Zestoretic (mg HCTZ)	Solución (mg HCTZ)
0.5	0.0175	0.0099	0.0345
1	0.3974	0.2357	0.2756
2	1.7293	1.4748	3.1619
3	2.6296	2.5638	4.6511
4	3.2265	3.5570	5.6145
8	5.8189	5.2721	8.3997
10	6.1083	5.7438	9.1062
12	6.3925	6.0884	9.7469
24	7.3184	7.2035	10.9862
30	7.7317	7.7047	11.4690
38	8.2466	7.9698	12.0693
48	8.5282	8.4178	12.2940

Voluntario 2 I

T. muestreo (hr)	Prinzide (mg HCTZ)	Zestoretic (mg HCTZ)	Solución (mg HCTZ)
0.5	0.0163	0.0144	0.0158
1	0.1583	0.0805	0.4547
2	0.6689	0.8642	1.8602
3	1.9740	2.2323	3.3315
4	3.0023	3.2340	4.6826
8	5.0441	5.6976	6.1270
10	6.8824	6.1107	6.9837
12	7.2911	6.4277	7.1462
24	8.3781	7.1111	8.6068
30	8.6339	7.4114	8.7529
38	8.9369	7.6026	8.9107
48	9.3709	7.9164	9.1661

Voluntario 3 I

T. muestreo (hr)	Prinzide (mg HCTZ)	Zestoretic (mg HCTZ)	Solución (mg HCTZ)
0.5	0.0265	0.0111	0.0214
1	0.1480	0.1829	0.2709
2	2.1429	1.7456	2.6051
3	3.1692	3.0144	3.7830
4	3.9603	4.5247	5.1320
8	6.1426	6.9796	6.7577
10	7.1609	7.4536	7.1994
12	7.9995	7.9746	7.6016
24	8.2734	9.1602	8.2904
30	8.3792	9.6278	8.9949
38	8.6641	9.9982	9.4046
48	9.0971	10.1934	9.8072

Voluntario 4 II

T. muestreo (hr)	Prinzide (mg HCTZ)	Zestoretic (mg HCTZ)	Solución (mg HCTZ)
0.5	0.0334	0.0092	0.0041
1	0.1808	0.0807	0.3518
2	0.8463	0.8608	2.1010
3	2.4110	2.5135	3.4127
4	3.4638	3.9296	4.3343
8	5.8652	5.9984	6.9033
10	6.7747	6.6337	7.8552
12	7.3698	6.9579	8.4176
24	8.9684	8.2187	10.2241
30	9.4872	8.7747	10.7580
38	9.8911	9.4367	11.0757
48	10.1941	10.0753	11.3312

Voluntario 5 II

T. muestreo (hr)	Prinzide (mg HCTZ)	Zestoretic (mg HCTZ)	Solución (mg HCTZ)
0.5	0.0096	0.0125	0.0284
1	0.1383	0.1437	0.3845
2	1.6934	0.9549	1.1681
3	3.430	2.0599	2.6046
4	4.6327	2.8465	3.8627
8	5.7208	4.1021	5.1262
10	6.2426	4.5159	5.5956
12	6.6689	4.8446	5.8802
24	7.3548	5.7421	6.8608
30	7.6185	5.8813	7.1181
38	7.8633	6.0469	7.4107
48	8.6123	6.4103	7.7633

Voluntario 6 II

T. muestreo (hr)	Prinzide (mg HCTZ)	Zestoretic (mg HCTZ)	Solución (mg HCTZ)
0.5	0.0095	0.0530	0.0267
1	0.5475	0.3557	1.2376
2	2.3604	2.1415	2.4393
3	3.8017	3.1459	3.6925
4	4.5108	3.8084	4.4229
8	6.5026	5.0563	6.1940
10	6.8671	5.3812	6.7585
12	7.3608	5.6163	7.5730
24	8.0635	5.7290	7.6543
30	8.3892	6.0137	8.0563
38	8.9289	6.1544	8.5686
48	9.0105	6.3126	8.5991

Voluntario 7 III

T. muestreo (hr)	Prinzide (mg HCTZ)	Zestoretic (mg HCTZ)	Solución (mg HCTZ)
0.5	0.0210	0.0712	0.0240
1	0.2679	0.4892	0.1621
2	1.6636	2.4392	1.8784
3	3.2402	4.2984	3.1149
4	4.2108	5.3404	4.2584
8	6.6117	6.7790	8.9136
10	7.2875	7.3851	9.5131
12	7.7258	7.6156	10.0183
24	8.8499	8.6056	11.0724
30	9.3181	8.9029	11.3999
38	9.8106	9.1526	11.4804
48	10.0271	9.3023	11.6636

Voluntario 8 III

T. muestreo (hr)	Prinzide (mg HCTZ)	Zestoretic (mg HCTZ)	Solución (mg HCTZ)
0.5	0.0238	0.0103	0.0116
1	0.2947	0.2156	0.4653
2	1.5240	1.3307	2.2572
3	2.5830	2.6495	3.9104
4	3.3363	3.4162	4.8788
8	4.7676	4.9970	7.2925
10	5.4654	5.5274	7.9999
12	5.6282	5.8888	8.4725
24	6.8152	7.4659	9.7216
30	6.9640	7.7344	10.0836
38	7.1987	8.1404	10.2963
48	7.3983	8.4167	10.4626

Voluntario 9 III

T. muestreo (hr)	Priazide (mg HCTZ)	Zestoretic (mg HCTZ)	Solución (mg HCTZ)
0.5	0.0128	0.0051	0.020
1	0.3602	0.1014	0.7106
2	1.6305	1.3375	2.5997
3	2.8537	3.2685	3.9971
4	3.8555	4.6504	5.1002
8	5.5740	6.0874	7.6824
10	5.8054	6.8586	8.3969
12	6.2639	6.9970	8.8315
24	7.3857	8.1551	9.4142
30	7.7189	8.2502	9.7838
38	8.0383	8.7064	9.9357
48	8.3048	9.0020	10.1943

Bibliografia

1.- McGinity, J. W., Stavchansky, S.A., and Martin, A.; Bioavailability in Tablet Technology. En: *Pharmaceutical Dosage Forms, Volume 2*, (Lieberman, H.A., and Lachman, L., eds.), Chap. 6.

2.- Stricker, H., *In vitro* Studies on the Dissolution and Absorption Behavior of Orally Administered Drugs, and the Connection to Their Bioavailability. En: *The Quality Control of Medicines* (P. B. Deasy and R.F. Timoney, eds.), Elsevier, 1976, Chap. 16.

3.- Teorell, T., *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 57:205 (1937).

4.- Bioequivalence Requirements and *in Vivo* Bioavailability Procedures, Fed. Regist., Jan 7, 1977.

5.- Drug bioequivalence -A report of the Office of Technology Assessment Drug Bioequivalency Study Panel. Superintendent of Documents, U.S. Government Printing office, Washington, D.C., 1974.

6.- Wagner, J.G., *Generic Equivalence and Inequivalence of Oral Products*. En: *Biopharmaceutics and Relevant Pharmacokinetics*, Drug Intelligence Publications, Hamilton, 1971, pp. 166-179.

7.- Sullivan, T.J., Sakmar, E., Albert, K.S., Blair, D.C., and Wagner, J.G. *J. Pharm. Sci.*, 64:1723 (1975).

- 8.- Barr, W.H., Gerbracht, L.M., Letchen, K., Plant, M., and Strahl, N., Clin. Pharmacol. Ther., 13:97 (1972).
- 9.- Glazko, A.J., Kinkel, A.W., Alegrmani, W.C., and Holmes, E.L., Clin. Pharmacol. Ther., 9:472 (1968).
- 10.- Lindenbaum, J., N. Engl. J. Med., 285:1344 (1971).
- 11.- Brice, G.W., and Hammer, H.F., Drug Inf. Bull., 3:112 (1969).
- 12.- Bioavailability Requirement for Prescription Drugs, Fed. Regis., Jan. 3, 1973.
- 13.- Guidelines for Biopharmaceutical Studies en Man. Am. Pharm. Assoc., Academy of Pharmaceutical Sciences, Washington, D.C., 1972.
- 14.- International Open Conference, Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence. The United States Pharmacopeia, Toronto 1992, pp. 24-72.
- 15.- Skelly, J.R., Bioavailability Policies and Guidelines. En Industrial Bioavailability and Pharmacokinetics: Guidelines, Regulations and Controls (A. Martin and J.T. Doluisio, eds.). Drug Dynamics Institute, College of Pharmacy, The University of Texas at Austin, Austin, Tex., 1977.
- 16.- Mollica, J.A., Rehm, C.R., Smith, J.B., and Govon, H.K., J. Pharm. Sci., 60:1380, (1971).

- 17.- Rehm, C.R., and Smith, J.B., J. Am. Pharm. Assoc., 49:386, (1960).
- 18.- Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. 10, edit by Florey, K., Academic Press, New York, (1981), pp. 405-441.
- 19.- Meyer, M.C., Mehkian, A.P., Whyatt, P., and Sliwka, W.A., Curr. Ther. Res. 17:570, (1975).
- 20.- Meyer, J.M., Fuchs, M., and Bodi, T., Am. J. Cardiol., 3:113, (1959).
- 21.- Tannenbaum, P.J., Rosen, E., Flanagan, T., and Cresley, A.P., J. Clin. Pharmacol. Ther. 9:598, (1968).
- 22.- Federal Register. 40:26168, (1975).
- 23.- Litter, M., Farmacología Experimental y Clínica, edit. El Ateneo, Buenos Aires 1980, 5a. ed., pp. 724-727 y 826-828.
- 24.- Katzung, G.B., Farmacología Básica y Clínica, edit. El Manual Moderno S.A., México 1991, 4a. ed., pp. 194-202.
- 25.- Smit, C.M., and Reynard, A.M., Textbook of Pharmacology, edit. W.P. Saunders Company, Philadelphia 1992, pp. 577-583.

- 26.- Goodman y Gilman, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 7a. ed., edit. Panamericana, México 1990, pp. 616-620.
- 27.- Gautam, P.C., Vargas, M.L., J. of Pharm. and Pharmacol., 39 (11):929, (1987).
- 28.- Friedman, D.I., and Amdon, G.L., J. Pharm. Sci., 78(12):995, (1989).
- 29.- Swanson, B.N., Vlasses, P.H., Ferguson, R.K., and Harris, K., J. Pharm. Sci., 73:1655, (1984).
- 30.- Mojaverian, P., Rocci, M.L., Vlasses, P.H., and Ferguson, R.K., Am. Pharm. Assoc., 75:4, (1986).
- 31.- Cooper, M.J., Sinaiko, A.R., Anders, M.W., and Mirkin, B.L., Anal. Chem. 48:8, (1976).
- 32.- Shah, V.P., Walker, M.A., Prasad, V.K., and Cabana, B.E., Biopharm and Drug Dispos., 5:11, (1984).
- 33.- Barbhaiya, R.H., Craig, W.A., Corrick-West, H.P., and Welling, P.G., Am. Pharm. Assoc., 71:2 (1982).
- 34.- Federal Register, 58 (80), 25918 (1993)