

00563

1  
28



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE  
BIODISPONIBILIDAD/BIOEQUIVALENCIA DE  
TABLETAS DE TARTRATO DE METOPROLOL

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN FARMACIA (BIOFARMACIA)**

**P R E S E N T A :**

**Q.F.B. GUADALUPE CLARA ESPINOSA MARTINEZ**

**FALLA DE ORIGEN**



**Biofarmacia** MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** M. en C. Helgi Jung Cook.  
**Vocal:** M. en C. Marcela Hurtado.  
**Secretario:** M. en C. Dinora F. González E.  
**Primer Suplente:** M. en C. Inés Fuentes Noriega.  
**Segundo Suplente:** M. en C. S. Margarita Rodríguez Alvarado

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

Departamento de Desarrollo Analítico de Investigación y Desarrollo de los  
Laboratorios SYNTEX S.A. de C.V.

**ASESOR DEL TEMA:**

M. en C. Juan Manuel Rodríguez

**SUSTENTANTE:**

Q.F.B. Guadalupe Clara Espinosa Martínez



*" La Biofarmacia y el biofarmacéutico,  
al servicio de la comunidad, como una  
parte integrante de creatividad e investigación  
en el equipo de la salud "*

*A mi madre: Irene Martínez Vda. de Espinosa*

*Por su apoyo, comprensión y cariño  
a lo largo de toda mi vida personal y profesional.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Este proyecto, como toda actividad, es el resultado de un conjunto de circunstancias y de la participación directa o indirecta de varios esfuerzos. Por lo que quiero expresar mi más profundo agradecimiento, a las personas e instituciones que fueron parte importante de él.*

**A: El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).**

*Por la beca asignada, que me permitió efectuar mis estudios de posgrado y realizar este proyecto.*

**A: SYNTEX S.A. de C.V.**

*Por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación en sus instalaciones así como las facilidades necesarias para concluirlo.*

**A: M.en C. Juan Manuel Rodríguez .**

*Con mi más profundo respeto y gratitud a sus conocimientos en el área biofarmacéutica, y a la paciencia, apoyo e interés demostrados a lo largo de la dirección de esta tesis. Gracias maestro, por tratar siempre de inculcar en su cátedra y en su trato cotidiano, el sentido de la excelencia y de la responsabilidad.*

**A: Dr. Mario González de la Parra .**

*Por ser una persona de actitud positiva y gran calidad humana , que me dió no solo a mí sino a numerosos egresados de las diferentes áreas de posgrado, la oportunidad de desarrollo profesional al formar parte de su equipo de trabajo, durante su cargo de Director de Servicios Técnicos en Sintex S.A. de C.V.*

**A : M en C. Helgi Jung Cook.**

*Gracias a ti, Helgi, porque con tu sencillez y al mismo tiempo fortaleza has sido un pilar fundamental en la trayectoria biofarmacéutica de todos los que hemos tenido la suerte de conocerte.*

**A : Mis compañeros de generación:**

*Angélica Noguéz M.  
Gladys González M.  
María Teresa de Jesús Francisco D.  
Eduardo Ramírez .*

*Con quienes comparto la ilusión de la superación, a través  
del servicio de nuestra profesión.*

**A: mis amigos y compañeros de Syntex.**

*Sería injusto mencionar en particular a cada uno de ustedes, porque esperó que al leer estas líneas cada quién reconozca en mi agradecimiento el profundo recuerdo de gratitud y respeto que guardo y guardaré por siempre a sus enseñanzas, apoyo, amistad y críticas constructivas e incluso negativas que me han fortalecido como ser humano.*

**A: Las nuevas generaciones de alumnos y tesisistas, así como de profesores que se forjan en los laboratorios 112 y 113 de posgrado de la Facultad de Química, con quienes tuvé la suerte de convivir en la última etapa de este proyecto.**

*Gracias por su ejemplo de superación y su contagioso entusiasmo.*

## INDICE

<b>ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCION Y OBJETIVO</b>	<b>3</b>
<b>II. GENERALIDADES</b>	
<b>2.1 Monografías</b>	
2.1.1 Metoprolol	<b>6</b>
2.1.2 Tartrato de Metoprolol	<b>7</b>
<b>2.2 Estudios de Bioequivalencia</b>	
2.2.1 Bases Teóricas	<b>9</b>
<b>2.3 Propiedades Farmacodinámicas</b>	
2.3.1 Efectos de los $\beta$ -bloqueadores	<b>13</b>
2.3.1.1 Bloqueo de los receptores $\beta_1$	
2.3.1.2 Cardioselectividad	
2.3.2 Farmacología y mecanismo de acción	<b>14</b>
2.3.2.1 Farmacología	
2.3.2.2 Mecanismo de acción	
2.3.2.2.1 Hipertensión	
2.3.2.2.2 Infarto al miocardio	
2.3.2.2.3 Angina de pecho	
<b>2.4 Propiedades Farmacocinéticas</b>	
2.4.1 Absorción	<b>16</b>
2.4.2 Distribución	<b>17</b>
2.4.3 Eliminación	<b>17</b>
2.4.4 Usos	<b>19</b>
2.4.4.1 Hipertensión	
2.4.4.2 Infarto al Miocardio	
2.4.4.3 Angina de Pecho	
2.4.5 Efectos Secundarios y Precauciones	<b>20</b>
2.4.6 Interacciones	<b>21</b>
<b>2.5 Métodos Analíticos</b>	
2.5.1 Formas farmacéuticas	<b>22</b>
2.5.2 Fluidos biológicos	<b>22</b>
2.5.2.1. Cromatografía de gases	<b>23</b>
2.5.2.2. Cromatografía de líquidos	<b>24</b>

### **III PARTE EXPERIMENTAL**

<b>3.1 Reactivos y Materiales empleados en el estudio</b>	<b>31</b>
3.1.1 Reactivos	
3.1.2 Estándares	
3.1.3 Producto Innovador	
3.1.4 Metabolitos	
3.1.5 Material	
3.1.6 Equipo	
3.1.7 Soluciones y Fase Móvil	
3.1.8 Lavado de Material	
3.1.9 Programas computacionales	
<b>3.2 Estudios " In vitro "</b>	<b>35</b>
3.2.1. Controles Físicos	
3.2.2. Controles Químicos	
3.2.3. Pruebas de Disolución	
<b>3.3 Método Analítico</b>	<b>36</b>
3.3.1 Optimización del método analítico	
3.3.2 Método para cuantificar metoprolol en plasma.	
<b>3.4 Estudio de Bioequivalencia</b>	<b>44</b>

### **IV RESULTADOS**

<b>4.1 Control de Calidad de los Productos</b>	<b>50</b>
<b>4.2 Pruebas de Disolución</b>	<b>51</b>
<b>4.3 Optimización del Método Analítico</b>	<b>53</b>
<b>4.4 Validación del Método Analítico</b>	<b>55</b>
<b>4.5 Estudio de Bioequivalencia .</b>	<b>65</b>
<b>4.6 Resultados Farmacodinámicos</b>	<b>66</b>
<b>4.7 Reacciones Adversas</b>	<b>88</b>

### **V DISCUSION DE LOS RESULTADOS**

**90**

### **VI CONCLUSIONES**

**109**

### **VII APENDICES**

<b>1. Espectro al infrarojo del tartrato de metoprolol</b>	<b>110</b>
<b>2. Longitudes de máxima absorción al UV en diferentes disolventes.</b>	<b>111</b>
<b>3. Espectro al UV del tartrato de metoprolol</b>	<b>112</b>
<b>4. Cardiosselectividad de los <math>\beta</math>-bloqueadores</b>	<b>113</b>
<b>5. Parámetros farmacocinéticos de los principales <math>\beta</math>-bloqueadores</b>	<b>114</b>
<b>6. Carta de consentimiento de los voluntarios</b>	<b>115</b>
<b>7. Protocolo del estudio de biodisponibilidad</b>	<b>116</b>

### **VIII BIBLIOGRAFIA**

**117**

## RESUMEN

## **RESUMEN:**

El Metoprolol es un  $\beta$ -bloqueador selectivo, empleado en el tratamiento de la hipertensión y de la angina de pecho. Se administra en forma de sal como tartrato de metoprolol. Cuando se administra en forma oral, se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal. Aproximadamente 95% de la dosis se metaboliza y un 10% se transforma en  $\alpha$ -hidroximetoprolol, metabolito con actividad farmacológica de aproximadamente una décima a una vigésima parte del metoprolol.

El metabolismo del metoprolol es similar al de la debrisoquina, es decir, hay polimorfismo genético en la hidroxilación del metoprolol y por lo tanto existen reportes en la literatura, de que pacientes tratados con dosis orales estándar de metoprolol experimentan efectos tóxicos adversos o no presentan el efecto terapéutico deseado, lo cual le confiere características para clasificarse dentro de los fármacos con problemas potenciales de biodisponibilidad.

En el presente trabajo se determinó la bioequivalencia de una nueva forma farmacéutica sólida (tabletas), conteniendo 100 mg de tartrato de metoprolol, empleando como referencia el producto innovador (Lopressor<sup>®</sup>, Ciba Geigy) en 24 voluntarios sanos de acuerdo a un diseño cruzado de 2 X 2, con una dosis única y con un intervalo de una semana de lavado entre cada período de administración. Las muestras sanguíneas se colectaron en los intervalos de tiempo establecidos y se cuantificó el fármaco en plasma por medio de una técnica analítica por CLAR con detección de fluorescencia.

El método analítico empleado se validó, demostrando ser lineal en un intervalo de concentración de 3-200 ng/mL y con un límite de detección de 1 ng/mL.

El recobro analítico promedio del fármaco adicionado fue del 99.11% y la variación intra-día fue menor al 10% (CV).

Los resultados obtenidos muestran que las dos formulaciones comparadas son bioequivalentes de acuerdo a los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, en los que se observa que en los intervalos de confianza al

90% se obtiene para la relación de  $\frac{ABC}{0}$  un intervalo de confianza de 84.8% a

117.4 % y para la relación de  $C_{p_{max}}$  un intervalo de 91.3% a 121.5% ambos intervalos están dentro de lo establecido en las regulaciones internacionales vigentes.

## **ABSTRACT:**

Metoprolol is a cardioselective beta adrenergic blocking agent used in the treatment of hypertension and angina pectoris. The drug is administered as metoprolol tartrate. When orally administered, metoprolol is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract approximately 95%. The systemic availability of metoprolol from conventional tablets is 35-85% due to extensive first-pass metabolism.

A relatively minor metabolite,  $\alpha$ -hydroximetoprolol, is produced from about 10% of an administered dose, which has a pharmacological activity of one tenth or twentieth that of metoprolol.

The metabolic oxidation of metoprolol exhibits polymorphism of the debrisoquine type, and there are reports on literature indicating that patients treated with oral doses of the drug can show toxic effects or decreased activity; therefore it is important to establish the bioequivalence of oral formulations containing this drug.

In the present study a comparison of the bioavailability of two oral formulations containing 100 mg of metoprolol tartrate (Matrol<sup>R</sup> of Syntex and Lopressor<sup>R</sup> of Ciba Geigy) was carried out in 24 healthy volunteers. The medication was administered in a single dose under fasting conditions using a 2X2 crossover design with a one week washout interval between periods. Blood samples were taken at fixed time intervals and plasma concentrations of metoprolol were determined by HPLC.

A high-performance liquid chromatography method using fluorescence detection for the assay of metoprolol was validated. The method was linear in the range of 3-200 ng/mL for metoprolol, and the sensitivity lower limit was of 1 ng/mL. Analytical recovery of drug added to plasma was about 99.11% and within-day variation was less than 10% (C.V.)

The concentrations obtained were similar for both formulations and this was reflected in similar mean pharmacokinetic and pharmacodynamic (reduction in pulse and systolic blood pressure) parameters. The results of applying the bioequivalence test based on the classic 90% confidence intervals were for the ratio of mean AUCs an interval from 84.8% to 117.4% and for the ratio of means C<sub>max</sub> an interval from 91.3% and 121.5%. Both of these intervals are within the ranges accepted in the current European, Canadian and FDA guidelines. Thus the results obtained show that the two formulations compared are bioequivalents under the current international regulations.

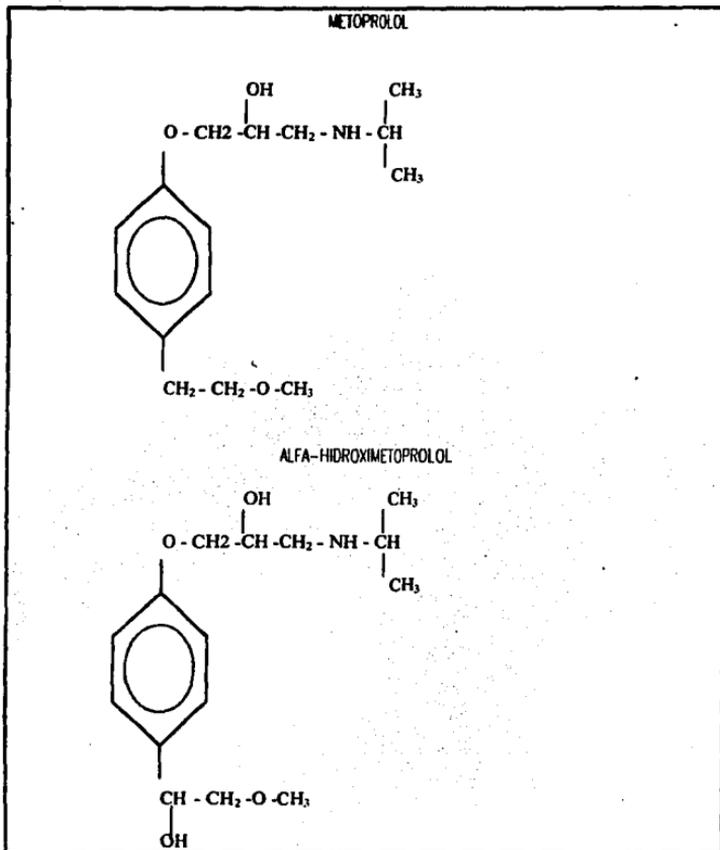
**C A P I T U L O I**  
**INTRODUCCION Y OBJETIVO**

## **INTRODUCCION:**

El Metoprolol (**figura 1**) es un  $\beta$ -bloqueador selectivo, empleado en el tratamiento de la hipertensión y de la angina de pecho, así como en la prevención del infarto al miocardio<sup>(1)</sup>. Se administra en humanos en forma de sal, generalmente como tartrato de metoprolol y con una dosificación de 100 mg por día en tomas únicas o divididas, generalmente en forma de tabletas. Aproximadamente 95% de la dosis se metaboliza en el hombre, produciéndose principalmente el metabolito hidroxilado; el  $\alpha$ -hidroximetoprolol (**figura 1**), con una actividad farmacológica de una décima a vigésima parte del metoprolol<sup>(2)</sup>.

En México existen seis diferentes marcas comerciales en forma de tableta que contienen este principio activo<sup>(3)</sup>. Sin embargo, existen reportes en la literatura<sup>(4)</sup>, que pacientes tratados con dosis orales estándar de metoprolol experimentan efectos tóxicos adversos o no presentan el efecto terapéutico deseado. Puesto que a) el metabolismo del metoprolol es similar al de la debrisoquina, es decir, hay polimorfismo genético en la hidroxilación del metoprolol, presentándose individuos clasificados como hidroxiladores lentos y rápidos, en los que se observa una variación sustancial en sus parámetros farmacocinéticos y b) los estudios de disolución para predecir la biodisponibilidad "in vivo", aún no han sido aceptados para sustituir los estudios de bioequivalencia<sup>(5)</sup>, a este fármaco se le confieren características para clasificarse dentro de los fármacos con problemas potenciales de biodisponibilidad. De tal manera que, cuando se desarrolla una forma farmacéutica, es necesario realizar estudios de biodisponibilidad comparativa con el objeto de demostrar su bioequivalencia con respecto al producto innovador.

En este trabajo se pretende evaluar la biodisponibilidad/bioequivalencia de una nueva formulación en su forma farmacéutica sólida (tabletas) que contiene tartrato de metoprolol, usando como innovador al producto Lopressor de Ciba Geigy<sup>®</sup>. Para llevar a cabo el análisis se empleará un método de cuantificación por CLAR con detección de fluorescencia, el cual es una modificación de varios métodos ya reportados<sup>(6,7,8,9)</sup> y aplicando un diseño cruzado de 2 x 2 con 24 voluntarios clínicamente sanos.



**FIGURA 1**

Estructura química del metoprolol y su principal metabolito el alfa-hidroximetoprolol

**OBJETIVO:**

**Evaluar la Biodisponibilidad/Bioequivalencia de una nueva formulación de tabletas de tartrato de metoprolol con respecto al producto innovador en voluntarios clínicamente sanos.**

**C A P I T U L O    I I**  
**GENERALIDADES**

## 2.1 MONOGRAFÍAS

### 2.1.1 Metoprolol (2,10,11)

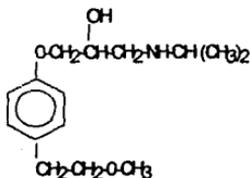
#### 2.1.1.1 Nombre químico

2-propanol-1-4-(2-metoxietil)fenoxi-3-(1-metiletil)amino(±)

#### 2.1.1.2 Fórmula condensada



#### 2.1.1.3 Fórmula desarrollada



#### 2.1.1.4 Peso molecular

267.4

#### 2.1.1.5 Propiedades fisicoquímicas

**De manera comercial se encuentra disponible en forma de sal de tartrato de metoprolol**, la cual es muy soluble en agua y libremente soluble en alcohol. El coeficiente de partición de la base, en un sistema n-octanol/agua es de 93 y tiene un pKa de 9.7 que corresponde al de una base débil.

**2.1.2 Tartrato de Metoprolol<sup>(12, 13)</sup>**

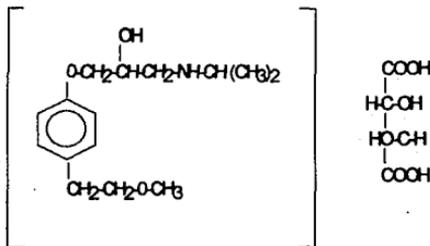
**2.1.2.1 Nombre químico**

Tartrato de ( $\pm$ )-1-Isopropilamino-3-p-(2-metoxietil)fenoxi  
propanol-2.

**2.1.2.2 Fórmula Condensada**



**2.1.2.3. Fórmula desarrollada.**



**2.1.2.4. Peso Molecular**

684.82

**2.1.2.5 Propiedades Fisicoquímicas**

**2.1.2.5.1. Descripción:** Polvo cristalino blanco de sabor amargo.

**2.1.2.5.2. Solubilidad:** Muy soluble en agua.  
Libremente soluble en cloruro de metileno,  
cloroformo y en alcohol.  
Ligeramente soluble en acetona.  
Insoluble en éter.

**2.1.2.5.3. Identificación:** El espectro infrarrojo determinado en pastilla de KBr presenta picos principales a las siguientes longitudes de onda: 1510, 1245, 1108, 1028, 1175, 810. (**apéndice 1**)

**2.1.2.5.4. Espectro de Absorción al UV:**

El espectro de absorción al UV presenta una longitud de onda de máxima absorción a 223 nm ( $\epsilon=23400$ ), en agua. La longitud de máxima absorción ( $\lambda_{max}$ ) y la absorptividad molar del metoprolol en varios disolventes se enlistan en el **apéndice 2** así como un espectro característico de tartrato metoprolol en 0.1 N HCl, obtenido en un espectrofotómetro Hewlett, Packard modelo 8450A se muestra en el **apéndice 3**.

**2.1.2.5.5 pH:**

6-7 en una solución acuosa 1 en 10

**2.1.2.5.6 pka:**

pka de 9.68

## 2.2. ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA

### 2.2.1. Bases teóricas

En los últimos veinte años los estudios de bioequivalencia han sido objeto de gran interés en la industria farmacéutica, desarrollándose paralelamente con el avance científico y tecnológico, apoyándose en disciplinas tales como la farmacocinética, estadística, farmacología, computación y otras<sup>(14)</sup>, logrando con ello una reglamentación internacional más eficiente y acorde a las necesidades del mercado actual<sup>(15)</sup>. En diferentes países se ha tratado de encontrar una armonización de términos y lineamientos<sup>(16, 17, 18)</sup> considerando siempre que el desarrollo, fabricación, prescripción y administración de un medicamento debe tener como objetivo común la obtención de una eficacia terapéutica<sup>(19)</sup>. En los Estados Unidos de Norteamérica, para garantizar lo anterior y con la aparición en el mercado de diferentes marcas de formas farmacéuticas iguales conteniendo el mismo principio activo, se ha requerido el comparar a los productos genéricos con respecto al producto innovador a través de estudios de este tipo.

Sin embargo, ya que no es posible ni deseable efectuar estudios de biodisponibilidad a todos los fármacos, es necesario seleccionar aquéllos para los cuales es crítica, tomando en consideración su importancia clínica, índice terapéutico, así como sus características fisicoquímicas y farmacocinéticas. Es importante hacer notar que aunque la prueba de disolución ha adquirido una gran significancia en la última década como herramienta para predecir problemas de biodisponibilidad de un fármaco, todavía no se considera como sustituta, en **ciertas condiciones**, de este tipo de estudios.<sup>(8, 20)</sup>

Por lo que se ha escrito y hablado mucho desde la introducción del concepto de biodisponibilidad (en un principio llamado disponibilidad fisiológica) y a partir del 1 de julio de 1977, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA) reglamentó los estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia que aparecen en el 21 CFR parte 320<sup>(21)</sup>, estableciendo también, las siguientes definiciones:

La **biodisponibilidad**<sup>(21)</sup> se define como la **velocidad** y la **cantidad** de una sustancia activa que se absorbe de un producto farmacéutico y se convierte en disponible para el sitio o sitios de acción.

La definición también implica que la **biodisponibilidad**<sup>(21)</sup> de un producto farmacéutico es una medida comparativa con respecto a una referencia: intravascular (**absoluta**) o extravascular (**relativa**). Es decir, un estudio de **biodisponibilidad comparativa** se refiere a la comparación de biodisponibilidades de diferentes formulaciones del mismo fármaco o de diferentes productos del fármaco. Cuando se dice que dos formulaciones del mismo fármaco o dos productos con el mismo principio activo son **bioequivalentes** es porque ellos tienen el mismo efecto terapéutico o son **terapéuticamente equivalentes**. Dos productos farmacéuticos son **equivalentes farmacéuticos**, cuando ellos contienen cantidades idénticas del mismo principio activo y son **alternativas farmacéuticas** aquellos productos que contienen el mismo principio activo o su precursor, pero no necesariamente en la misma cantidad o forma de dosificación o como la misma sal o éster.

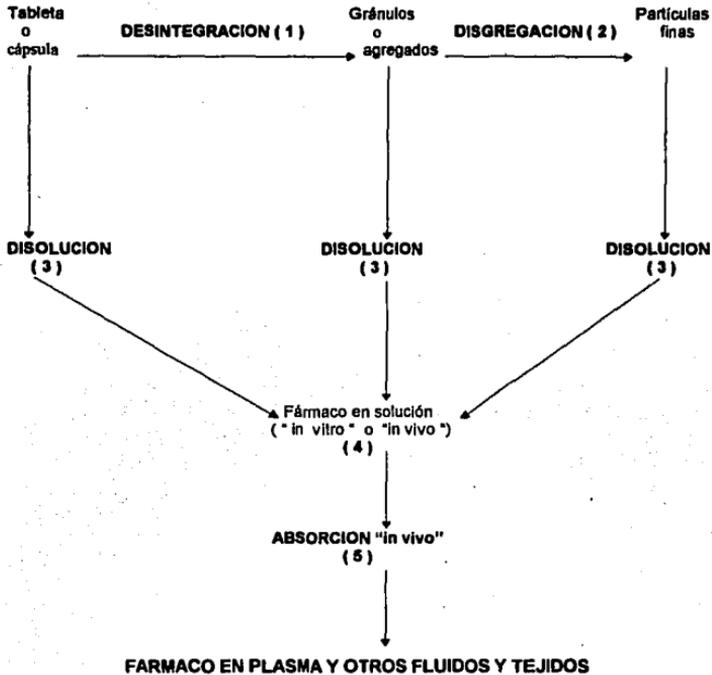
Por lo tanto un estudio de bioequivalencia se basa en la consideración<sup>(23)</sup> de que el efecto terapéutico de un medicamento está en función de la concentración del principio activo en la circulación sistémica y por lo tanto está relacionada a su **biodisponibilidad**. Así, si dos formas farmacéuticas iguales contienen cantidades equivalentes del mismo fármaco y producen concentraciones similares del fármaco en la sangre, ellas son bioequivalentes y por lo tanto, son equivalentes terapéuticamente.

En la mayoría de los estudios se sigue una administración por vía oral (tabletas o cápsulas) en la que existe un proceso de absorción antes de que el fármaco pueda llegar al torrente circulatorio, estar "disponible"<sup>(24)</sup> en los fluidos biológicos y llegar al sitio receptor (*figura 2*). En general en la práctica se cuantifica la concentración del fármaco y/o metabolitos en plasma con respecto al tiempo, obteniéndose una gráfica como la representada en la *figura 3* con la cual se pueden determinar los principales parámetros farmacocinéticos con los que se evalúa la biodisponibilidad en un estudio de bioequivalencia: ABC (área bajo la curva),  $C_{pmax}$  (concentración plasmática máxima) y  $t_{max}$  (tiempo al cual se alcanza la concentración plasmática máxima).

El tartrato de metoprolol es un  $\beta$ -bloqueador clasificado dentro de los de características liposolubles que se absorben rápidamente por vía oral, pero que sufre el efecto del primer paso por el hígado. De allí que se puedan obtener respuestas variables entre distintos individuos y que se presenten con mayor frecuencia efectos adversos a nivel del sistema nervioso central<sup>(24)</sup>. Además presenta un metabolismo regulado genéticamente, semejante al del tipo de la debrisoquina/espartina<sup>(25)</sup>, por lo que a los individuos a quienes se les administra pueden ser clasificados como hidroxiladores lentos o rápidos.

Estudios como los de Horai<sup>(26, 27)</sup>, Rutledge<sup>(28)</sup> y Lennard<sup>(29, 30)</sup> y cols establecen la importancia de esta característica que puede repercutir en fallas terapéuticas sobre todo en pacientes geriátricos<sup>(31)</sup>. Dada la importancia que presenta este fármaco en diversas terapias como la de la hipertensión leve y moderada<sup>(31, 32)</sup> así como en la prevención del infarto al miocardio<sup>(33)</sup> y en el tratamiento de la angina de pecho<sup>(34)</sup>, se ha estudiado incluso su impacto económico comparativo y de costo beneficio con otros medicamentos como lo reportado por Holford<sup>(35)</sup> y se han reportado estudios de biodisponibilidad realizados por Sandberg<sup>(36)</sup>, Houtzager<sup>(37)</sup>, Briant<sup>(38)</sup>, Van den Berg<sup>(39)</sup> y cols.

Puesto que en nuestro país no hay una reglamentación establecida para efectuar estudios de bioequivalencia, para realizar este trabajo se consideró lo establecido por las guías específicas emitidas por la Oficina de Productos Genéricos de la División de Estudios de Bioequivalencia, las cuales se reconocieron oficialmente en la nueva edición de la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica USP XXIII<sup>(40)</sup> en ésta se indica que a partir del 1 de Julio de 1992 se apliquen dichas guías para fármacos candidatos a estudios de bioequivalencia. Así, la guía con recomendaciones específicas para tabletas de tartrato de metoprolol<sup>(41)</sup> indica que hay que utilizar al Lopressor (producto innovador); recomienda utilizar un diseño cruzado de 2x2 y emplear un método analítico específico que permita diferenciarlo de su principal metabolito, el  $\alpha$ -hidroximetoprolol.



**FIGURA 2**

Secuencia que sigue un principio activo contenido en una forma farmacéutica sólida oral para llegar al sitio de acción

Estudio de Bioequivalencia

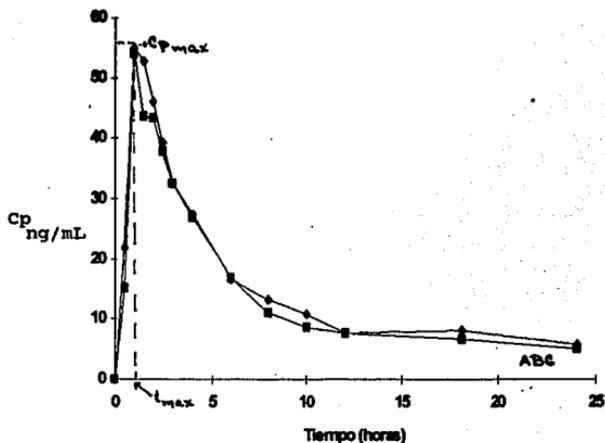


FIGURA 3

Gráfica característica de concentración plasmática contra tiempo de dos productos bioequivalentes y de los principales parámetros farmacocinéticos:

$$ABC \int_0^{\infty} ABC \int_0^t t_{max}, Cp_{max}.$$

## 2.3 PROPIEDADES FARMACODINAMICAS

### 2.3.1.Efectos de los $\beta$ -bloqueadores

Los receptores beta adrenérgicos se encuentran en el corazón, vasos sanguíneos, bronquios, hígado, pulmón, páncreas, tejido adiposo, músculo liso gastrointestinal y uterino, además, de otros tejidos. Existen dos tipos de beta receptores los  $\beta_1$  y los  $\beta_2$  <sup>(1)</sup>. El metoprolol es un fármaco  $\beta$ -bloqueador cardioselectivo lipofílico, es decir, que actúa a dosis bajas sobre los receptores  $\beta_1$  localizados principalmente en el corazón, pero no en los receptores  $\beta_2$  que se encuentran sobre todo en los bronquios y en los vasos periféricos.

#### 2.3.1.1. Bloqueo de los receptores $\beta_1$ . <sup>(42)</sup>

Los  $\beta$ -bloqueadores se combinan reversiblemente con los beta receptores para bloquear la respuesta a los impulsos nerviosos simpáticos y de las catecolaminas circulantes. El bloqueo de los receptores  $\beta_1$  reduce la frecuencia cardíaca, la contractilidad del miocardio y el gasto cardíaco. También suprimen la secreción de la renina y la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo provocada por la acción estimulante de las catecolaminas.

#### 2.3.1.2.Cardioselectividad <sup>(43)</sup>.

Los beta bloqueadores son clasificados como cardioselectivos o noselectivos en base a su relativa afinidad por los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . Los fármacos no selectivos (propranolol, nadolol, penbutolol, pindolol, labetalol, timolol), bloquean los receptores beta en todos los sitios mientras que los fármacos cardioselectivos (acebutolol, atenolol, metoprolol) bloquean los receptores  $\beta_1$  y tienen menos efecto sobre los receptores  $\beta_2$  cuando se usan en dosis bajas. Así, un fármaco cardioselectivo puede ser más seguro al ser administrado en un paciente asmático o propenso a la hipoglucemia. Sin embargo, todos los beta bloqueadores deben ser usados cautelosamente puesto que la cardioselectividad no es absoluta y ocasionalmente se puede presentar una pérdida de ésta, a dosis terapéuticas.

### **2.3.2. Farmacología y mecanismo de acción<sup>(4, 43)</sup>**

#### **2.3.2.1 Farmacología**

A dosis bajas el metoprolol es un inhibidor selectivo de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos. Como el propranolol, el metoprolol inhibe la respuesta a estímulos adrenérgicos por bloqueo competitivo de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos dentro del miocardio. A diferencia del propranolol, el metoprolol bloquea los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos que se encuentran en los bronquios y en el músculo vascular liso, únicamente a dosis altas.

Debido a su bloqueo  $\beta_1$ -adrenérgico en el miocardio, el metoprolol disminuye el gasto cardíaco y la taquicardia en el descanso. Inhibe el incremento en la frecuencia cardíaca durante el ejercicio inducido, decrece la contractilidad del miocardio y el gasto cardíaco tanto durante el descanso como en el ejercicio sin aumentar significativamente la resistencia periférica. El fármaco incrementa el tiempo de expulsión sistólica y el volumen cardíaco. El metoprolol reduce la velocidad de conducción a través de los nodos sinoatrial (SA) y atrioventricular (AV) así como la automatismo del miocardio. No tiene una actividad simpaticomimética intrínseca y poco o ningún efecto estabilizante de la membrana del corazón.

#### **2.3.2.2 Mecanismo de acción**

##### **2.3.2.2.1 Hipertensión**

Como el propranolol, el metoprolol decrece la presión sanguínea tanto en la postura de pie como en la supina. No se ha determinado el mecanismo preciso de su acción hipotensiva pero se ha planteado que los agentes bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos reducen la presión sanguínea por bloqueo de los receptores periféricos (especialmente cardíacos) reduciendo el gasto cardíaco por descenso de los neurotransmisores del Sistema Nervioso Central y/o suprimiendo la liberación de renina. También, se ha sugerido que ocurre una reducción en la resistencia periférica por la inhibición de la liberación de norepinefrina.

En pacientes hipertensos se ha reportado una reducción en la presión sistólica durante el ejercicio a los 15 min después de una dosis oral única de 50 - 80 mg de tartrato de metoprolol y el efecto persiste por 6 horas.

Dosis diarias de 150-450 mg causan una disminución promedio de 20 mm Hg en la presión sistólica alcanzando el efecto máximo en una semana tanto para voluntarios sanos como hipertensos durante el descanso y el ejercicio. Las mismas dosis causan una reducción menor pero apreciable en la presión diastólica con promedio de 10-15 mmHg.

En la terapia crónica, el efecto hipotensivo puede persistir durante 4 semanas aún después de un lavado del fármaco, probablemente como resultado de su enlace a tejidos.

Cuando se administra en individuos sanos una infusión IV de una dosis única de metoprolol de 5 ó de 15 mg, ocurre una disminución en el gasto cardíaco aproximadamente de 10 a 15%, a los 10 min, respectivamente durante el ejercicio inducido. Este efecto decrece linealmente con el tiempo a la misma velocidad para ambas dosis y persiste aproximadamente durante 5 horas para la dosis de 5 mg y 8 horas para la de 15 mg.

La duración de los efectos bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos (medidos por la disminución del gasto cardíaco en el ejercicio) esta relacionada con la dosis, incrementandose cuando se incrementa la dosis.

#### **2.3.2.2.2 Infarto al miocardio**

Tampoco se ha establecido el mecanismo exacto de acción del metoprolol en pacientes propensos a sufrir ataques cardíacos o con ataque cardíaco declarado pero se ha observado en pacientes con infarto del miocardio que el metoprolol reduce la presión sistólica y el gasto cardíaco sin cambiar la presión diastólica, la arterial y la pulmonar así como una disminución en la fibrilación ventricular.

#### **2.3.2.2.3 Angina de pecho**

En la angina de pecho se propone que el mecanismo de acción es através del bloqueo de la acción estimulante de las catecolaminas sobre el corazón, disminuyendo la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea y la contractilidad del miocardio. Encontrándose una una relación entre las concentraciones plasmáticas del fármaco y la disminución de la frecuencia cardíaca y de la isquemia ventricular izquierda durante el ejercicio inducido

## **2.4 PROPIEDADES FARMACOCINETICAS**

### **2.4.1. Absorción<sup>(4, 44, 45, 46, 47)</sup>**

El tartrato de metoprolol es absorbido rápidamente y casi por completo del tracto gastrointestinal. Sin embargo, aproximadamente el 50% del fármaco sufre el efecto de primer paso. La velocidad de absorción depende de la forma farmacéutica en que se administre así la absorción de una dosis oral única de 20-100 mg se completa de 2.5 a 3 horas y el metoprolol aparece en el plasma después de 10 min alcanzando su concentración plasmática máxima a los 90 min. Obteniéndose el doble de concentración cuando se administra en forma intravenosa (IV) y una respuesta farmacológica máxima a los 20 min.

La biodisponibilidad del tartrato de metoprolol administrado en forma oral, se incrementa cuando se aumenta la dosis. Indicando, probablemente, un proceso saturable de baja capacidad como por ejemplo un enlace a tejidos en el hígado, y cuando se administra conjuntamente con los alimentos, el grado de absorción aumenta y por lo tanto las concentraciones plasmáticas máximas son más altas.

Debido a que el metabolismo del metoprolol está regulado genéticamente las concentraciones plasmáticas de este fármaco pueden variar grandemente entre individuos por lo que se ha reportado que si bien después de una dosis oral de metoprolol, las concentraciones plasmáticas obtenidas son completamente variables particularmente en pacientes geriátricos y aparentemente sin correlación con sus efectos hipotensivos existe una relación lineal entre las concentraciones plasmáticas con respecto a la dosis en un intervalo de 50-400 mg. Presentándose, también, en este intervalo de dosificación una relación entre la dosis y la disminución de la frecuencia cardíaca así como de la presión sistólica durante el ejercicio inducido en los pacientes.

En la administración oral de 100 mg de tartrato de metoprolol en 8 sujetos sanos se obtuvieron concentraciones plasmáticas máximas de **30 a 280** ng/ml (promedio de 130 ng/mL) después de 2.5 horas y en otro estudio con el mismo número de voluntarios y con la misma dosis se encontró una concentración plasmática máxima promedio para el tartrato de metoprolol de **120** ng/mL de 2 a 3 horas y para el  $\alpha$ -hidroximetoprolol de 70 ng/mL en un tiempo promedio de 3 horas. Para una administración oral de dosis múltiples de tartrato de metoprolol de 50 a 80 mg durante 3 veces diariamente las concentraciones plasmáticas se encuentran entre 20 a 340 ng/ml.

#### 2.4.2. Distribución <sup>(4)</sup>

El metoprolol se distribuye ampliamente dentro de los tejidos del cuerpo. La concentración del fármaco es mayor en el corazón, hígado, pulmones y saliva que en el plasma. Aparentemente su unión a proteínas plasmáticas se realiza solamente con la albúmina de un 11 a un 12 %. Siguiendo las dosis terapéuticas, las concentraciones de metoprolol en eritrocitos son aproximadamente 20 % más altas que aquellas encontradas en el plasma, pero el fármaco está disponible para la eliminación de ambos sitios a la misma velocidad. El metoprolol atraviesa la placenta por lo que las concentraciones maternas y las de la sangre del feto son aproximadamente iguales. También atraviesa la barrera hematoencefálica, la concentración de metoprolol en líquido cefalorraquídeo (LCR) es aproximadamente 78% de la concentración en plasma. La distribución del metoprolol hacia la leche es de 3 a 4 veces la concentración plasmática materna, pero la cantidad distribuida dentro de la leche parece ser muy pequeña.

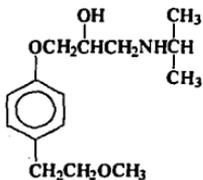
#### 2.4.3. Eliminación <sup>(4)</sup>

La eliminación del metoprolol sigue una cinética de primer orden y ocurre, principalmente en el hígado; el tiempo requerido para el proceso, aparentemente es independiente de la dosis y de la duración de la terapia. En individuos sanos y pacientes hipertensos, la vida media de eliminación tanto del fármaco inalterado como de los metabolitos es aproximadamente de 3 a 4 horas. En hidroxiladores lentos, la vida media de eliminación del fármaco se prolonga aproximadamente de 6 a 7 horas. Existe una mayor variabilidad interindividual en las vidas medias de eliminación en pacientes geriátricos que en individuos jóvenes sanos. La vida media del metoprolol no se incrementa apreciablemente con función renal dañada.

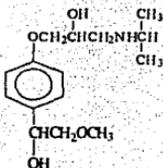
El metoprolol no inhibe o retarda su propio metabolismo. Los tres metabolitos principales del fármaco formados por desaminación oxidativa (O-dealquilación con subsecuente oxidación y hidroxilación alifática), representan un 85% de los metabolitos totales excretados en la orina.

Los metabolitos aparentemente no tienen actividad farmacológica. La velocidad de hidroxilación da como resultado el  $\alpha$ -hidroximetoprolol y dado que está controlada genéticamente, ocasiona la variabilidad interindividual. En los trabajos de Hoffmann y col., se reportaron los principales metabolitos del metoprolol en el hombre (figura 4) y en la rata.

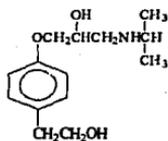
**METOPROLOL**



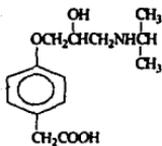
**ALFA-HIDROXIMETOPROLOL**



**O-DIMETILMETOPROLOL**



**METABOLITO ACIDO**



**FIGURA 4**

Principales metabolitos del metoprolol en el hombre

Los hidroxiladores lentos de metoprolol presentan incrementos en sus áreas bajo la curva (ABC), prolongadas vidas medias de eliminación (aproximadamente 6-7 horas), altas concentraciones en la orina de fármaco inalterado y concentraciones despreciables del  $\alpha$ -hidroximetoprolol en la orina en comparación con las que presentan los hidroxiladores rápidos. El bloqueo de los  $\beta$ -adrenérgicos, persiste por lo menos 24 horas después de la administración de una dosis oral única de 200 mg en los hidroxiladores lentos.

El metoprolol y sus metabolitos son excretados en orina principalmente vía filtración glomerular, sin embargo también se elimina por secreción tubular y por reabsorción. Aproximadamente el 95% de una dosis oral se excreta en orina dentro de 72 horas. Menos del 5% y aproximadamente el 10% de una dosis de metoprolol se excreta inalterada en orina siguiendo una administración intravenosa del fármaco.

Los parámetros farmacocinéticos más importantes de algunos de los  $\beta$ -bloqueadores más empleados se enlistan en el **apéndice 5**

## **2.4.4 Usos**

### **2.4.4.1. Hipertensión <sup>(4)</sup>**

El metoprolol se utiliza en la hipertensión y se administra en la monoterapia o en combinación con otra clase de agentes hipertensivos. Su eficacia es similar a la de otros agentes  $\beta$ -bloqueadores adrenérgicos, pero dada su característica de cardioselectividad se prefiere a la de otros agentes no selectivos, como el propranolol, sobre todo en pacientes con ciertas patologías ( feocromocitoma, hipoglucemia, bronquitis). La posología en la hipertensión puede ser individualizada y ajustada en base tanto a la severidad de la enfermedad como a la respuesta a la terapia ( mono o politerapia) y tolerancia al fármaco. Se recomienda para pacientes a los que se les administra otros fármacos al estar, por ejemplo, en tratamiento por dieta o por alcoholismo. El metoprolol puede ser empleado como monoterapia inicial en la hipertensión, como una segunda alternativa para sustituir a otro fármaco ineficaz o intolerado por el paciente en una monoterapia secuencial o como parte de una múltiple.

#### **2.4.4.2. Infarto al Miocardio<sup>(4)</sup>**

El Metoprolol se emplea tanto por vía oral como intravenosa para reducir el riesgo a la mortalidad cardiovascular en pacientes que han tenido un infarto al miocardio o son propensos a ellos y están hemodinámicamente estables. El tratamiento con metoprolol intravenosamente deberá iniciarse tan pronto como las condiciones clínicas del paciente lo permitan. Alternativamente, el tratamiento puede empezar dentro de los 3-10 días seguidos al infarto agudo al miocardio.

#### **2.4.4.3. Angina de Pecho<sup>(4)</sup>**

El metoprolol se utiliza para el tratamiento de la angina de pecho crónico estable. En estudios placebo-controlado, el metoprolol reduce la frecuencia de los ataques de angina, reduciéndose la administración de nitroglicerina e incrementando la tolerancia al ejercicio.

#### **2.4.5. Efectos secundarios y precauciones<sup>(4)</sup>**

El metoprolol causa cierta reducción del volumen espiratorio forzado (VEF<sub>1</sub>) en pacientes asmáticos, pero el efecto es menor que el producido por el propranolol cuando los fármacos se administran en dosis que causan igual grado de bloqueo adrenérgico beta<sub>1</sub>. A diferencia del propranolol, el metoprolol no inhibe mayormente la broncodilatación inducida por el isoproterenol. Sin embargo, se ha producido exacerbación de los síntomas respiratorios en pacientes asmáticos que recibieron dosis relativamente altas de metoprolol. Estas personas no deben tratarse simultáneamente con metoprolol, excepto si la broncoconstricción se controla simultáneamente con un agonista adrenérgico beta<sub>2</sub> u otro fármaco antiasmático. Existen evidencias de que el metoprolol puede deteriorar la tolerancia a la glucosa en los pacientes diabéticos y quizá en los individuos normales, implicando que la liberación de insulina mediada por betarreceptores se inhibe hasta cierto punto con este fármaco.

Los efectos secundarios más comunes propios de la administración de metoprolol son fatiga, cefalalgia, mareo e insomnio. Lo mismo que todos los antagonistas beta adrenérgicos, el metoprolol no debe usarse si hay riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva, a menos que el paciente se supervise cuidadosamente; puede ser necesaria la administración de otro

fármaco como digital. Del mismo modo, el fármaco debe usarse con precaución en individuos con trastornos de la conducción cardíaca.

Las contraindicaciones incluyen bradicardia con menos de 45 latidos por minuto, bloqueo cardíaco mayor que el de primer grado, presión sistólica menor de 100 mm Hg o insuficiencia cardíaca de moderada a grave. El tartrato de metoprolol se vende para uso oral en tabletas de 50 y 100 mg por día.

El metoprolol también se vende en forma de inyectable (5 mg/5ml) para usar en la primera etapa de infarto de miocardio sospechado o agudo definido.

#### **2.4.6. Interacciones <sup>(48)</sup>**

##### ***Fármacos Cardiovasculares.***

Cuando el metoprolol es administrado con diuréticos u otros fármacos hipotensivos se puede incrementar el efecto del metoprolol. Esto se emplea como una ventaja terapéutica, pero la dosis debe ser ajustada cuidadosamente.

Cuando se administra con fármacos antiarrítmicos tales como disopiramida, lidocaina, quinidina, fenitoina, procainamida, los efectos cardíacos pueden verse aumentados y pueden presentarse efectos tóxicos, requiriendo un ajuste de dosis. El metoprolol puede aumentar la bradicardia producida por glucosidos cardíacos y debe ser administrado con precaución en pacientes que reciben este fármaco. El Verapamil puede incrementar sustancialmente la biodisponibilidad del metoprolol, de manera que se debe evitar, en lo posible, administrar metoprolol-verapamil en conjunto.

## 2.5 METODOS ANALITICOS PARA DETERMINAR METOPROLOL

La molécula del metoprolol (*figura 1*) presenta características de alta absorción en la región ultravioleta, así como la aromaticidad de su anillo y los grupos: -OH-, -O-CH<sub>3</sub> y -NH<sub>2</sub> le dan propiedades que la sitúan dentro de las estructuras propensas para presentar fluorescencia<sup>(60)</sup>, lo cual ha sido aprovechado para cuantificarlo tanto en formas farmacéuticas en análisis rutinario de control de calidad como en fluidos biológicos.

### 2.5.1 Formas farmacéuticas.

El tartrato de metoprolol puede ser titulado en ácido acético glacial 0.1N en dioxano. El punto final de la titulación se determina potenciométricamente empleando un electrodo de vidrio y un electrodo de calomel conteniendo ácido acético glacial saturado con cloruro de litio<sup>(13)</sup>.

Uno de los métodos farmacopéicos<sup>(12)</sup> reportados se basa en la acidificación del tartrato de metoprolol con ácido clorhídrico (HCl) 0.1N y después de alcalinizar el extracto acuoso, el metoprolol es extraído en la fase clorofórmica para cuantificarlo por medio de una determinación espectrofotométrica en la región ultravioleta.

Su cuantificación también puede realizarse con una extracción del principio activo por medio de ácido clorhídrico (HCl) 0.1N y su subsecuente determinación al UV. También se ha reportado por Gustavii y Schill<sup>(61)</sup> la determinación de aminas cuaternarias por formación de par iónico con picrato, la cual se basa en disolver la sustancia activa en agua y diluirla con un buffer de fosfato de pH 6.5. El metoprolol es extraído con cloruro de metileno como par iónico de picrato, el cual es determinado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 347 nm.

### 2.5.2. Fluidos biológicos

Para la determinación en fluidos biológicos tanto del metoprolol como de su principal metabolito, el  $\alpha$ -hidroximetoprolol se han reportado<sup>(62-77)</sup> numerosos métodos. Dado a que se requieren de técnicas analíticas muy sensibles y específicas ya que los niveles de concentración son bajos encontrándose en ng/ml, y en algunos casos<sup>(6)</sup> se requiere también de la cuantificación de su principal metabolito, los principales métodos empleados se han enfocado al análisis por **Cromatografía de Gases**<sup>(62-66)</sup> y por **Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución**<sup>(67-77)</sup>.

### 2.5.2.1 Cromatografía de gases (CG).

Borg y cols.<sup>(62)</sup> reportan uno de los primeros estudios del metoprolol estableciendo un método por cromatografía de gases y espectrometría de masas por medio del cual se identificaron en la orina, los principales metabolitos del fármaco, en el hombre, el perro y la rata comparandose con sustancias de referencia sintetizadas.

Este trabajo dió las bases para que posteriormente Gyllenhaal y cols.<sup>(63)</sup>, determinarán en orina al metoprolol y sus metabolitos en forma de derivados trimetilsilizados por cromatografía de gases con columnas capilares.

Este último método está basado en la derivatización de la cadena del aminopropanol con fosgeno a un pH alcalino y aislado en una fase orgánica a un pH ácido.

Después de la trimetilsililación, la separación y la cuantificación se analizan por cromatografía de gases con columna capilar y con detección de ionización a la flama. La reacción se efectúa a un pH 12 con 60 µL de fosgeno 2 M en tolueno adicionado en tres porciones, como medio de extracción se emplea éter dietílico/diclorometano y como agente silante la bis (trimetilsilil)acetamida.

Maurer y Pfeifer<sup>(66)</sup> reportan una técnica para cuantificar y diferenciar los beta bloqueadores y sus principales metabolitos en orina por medio de cromatografía de gas computarizada y espectrometría de masas, la cual se basa en una hidrólisis ácida de la orina con ácido clorhídrico(HCl) al 37%, seguida de una alcalinización con hidróxido de potasio y una solución acuosa de sulfato de amonio al 30 % para obtener un pH entre 8 y 9; se extrae con una mezcla de metanol-isopropanol-acetato de etilo (1:1:3), evaporándose a sequedad y redisolviéndose con 0.1 mL de metanol, acetilándose después con anhídrido acético y piridina.

En 1988 los β-bloqueadores se incluyen en la lista de sustancias prohibidas por el Comité Olímpico Internacional, por lo que Delbeke y cols.<sup>(64)</sup>, desarrollan una técnica cualitativa para identificar a compuestos pertenecientes a los β-bloqueadores en orina, por medio de cromatografía de gas y espectrometría de masas, después de una extracción en fase sólida empleando columnas Extrelut-1.

Un año después Leloux y cols.<sup>(69)</sup>, presentaron una técnica específica y sensible para detectar a varios β-bloqueadores clasificados como prohibidos (entre ellos el metoprolol), en la orina después de 48 horas de la administración de la dosis. Esta técnica se basa en una hidrólisis enzimática y una extracción en fase sólida.

**2.5.2.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).**

Para la cuantificación del metoprolol y de su principal metabolito el  $\alpha$ -hidroximetoprolol en plasma, los métodos más empleados son los de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución<sup>(61-77)</sup>. Los más sensibles son los que emplean un detector de fluorescencia.

Rosell y cols.<sup>(61)</sup> en 1982 reportan un método para determinar metoprolol en plasma, por medio de cromatografía de par iónico en fase reversa y detección por fluorescencia, reportando un límite de detección de aproximadamente 5 ng/mL. El procedimiento de extracción es muy parecido al que seguirían la mayoría de los métodos futuros: alcalinización de la muestra plasmática para liberar la base, extracción con un disolvente orgánico, evaporación del disolvente, reconstitución en fase móvil e inyección en el sistema cromatográfico, la detección se realiza por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 220 nm y una de emisión de 295 nm.

En 1984, Gengo y cols.<sup>(62)</sup>, reportan una técnica para ser empleada en suero, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR) en el cual las muestras son cargadas con pronetolol como estándar interno, las proteínas son precipitadas con una solución de ácido tricloroacético al 30% , después de agitar y centrifugar la muestra, el líquido sobrenadante es alcalinizado con hidróxido de sodio (NaOH) 1 M , se extrae con diclorometano, el cual se evapora a sequedad y se reconstituye en fase móvil. La detección se lleva a cabo con detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 230 nm y 300 nm de emisión.

Una modificación a estos métodos la presentan Harrison y cols.<sup>(66)</sup> al emplear para la limpieza de la muestra un cartucho, Bond-Elut que contiene ODS-sílica modificada para evitar exponer a la muestra a condiciones drásticas de alcalinización, reportando un límite de detección de 2 ng/mL. También, en un intento de evitarse los procedimientos largos en la limpieza de la muestra, Lecaillon y cols.<sup>(67)</sup>, reportan un método de acoplamiento de columnas, en el cual la muestra es inyectada y después pasa por un sistema en donde la muestra va limpiándose conforme va pasando a través de diferentes cartuchos, antes de llegar a la columna principal donde se realiza la separación analítica.

Rutledge y Garrick<sup>(8)</sup>, con objeto de obtener un método útil para ser empleado en estudios farmacocinéticos del metoprolol así como en el monitoreo en determinados grupos de pacientes, desarrollaron una técnica en la cual el metoprolol y su principal metabolito se extraen en dos pasos, primero la adición de estándar interno (propranolol), alcalinización con hidróxido de sodio (NaOH) 4M y 5 mL de éter dietílico, centrifugación y separación de la fase orgánica, segundo la acidificación de ésta última con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.01N e inyección al sistema cromatográfico.

Horai y cols.<sup>(6)</sup> presentan una técnica básicamente con las mismas condiciones generales de los antes mencionados, es decir alcalinización de la muestra plasmática, extracción con disolvente orgánico (diclorometano), evaporación de ésta fase, reconstitución en fase móvil e inyección a un sistema cromatográfico de fase reversa y detección por fluorescencia, que serán las condiciones empleadas en la mayoría de los métodos. Lo relevante es que esta técnica la emplearon en la clasificación de hidroxiladores lentos y rápidos en población japonesa de acuerdo a un estudio de distribución de datos de 183 pacientes con base a la relación logarítmica de concentración plasmática de metoprolol contra concentración plasmática de  $\alpha$ -hidroximetoprolol.

Los métodos<sup>(74-77)</sup> más recientes reportan la cuantificación de los enantiómeros del metoprolol en el plasma humano por cromatografía de líquidos de alta resolución. Uno de ellos es el reportado por Straka y Johnson<sup>(78)</sup> en el cual se logró la separación de los enantiómeros por medio de una fase estacionaria quiral de celulosa-tris(3,5-dimetilfenilcarbamato), en fase reversa y por medio de una detección de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 275 nm y de emisión de 315 nm.

En las tablas 2.1 a 2.5 se enlistan los principales métodos reportados para la cuantificación del metoprolol y/o su principal metabolito el  $\alpha$ -hidroximetoprolol en diferentes fluidos biológicos y por diferentes técnicas analíticas.

**TABLA 2.1**  
Métodos analíticos para cuantificar metoprolol en plasma por  
cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

DETERMINACION	METODO	DETECCION	LIMITE DE DETECCION	REFERENCIA
Metoprolol (M) $\alpha$ -Hidroximetoprolol	CLAR Plasma	Fluorescencia	3 ng/mL	J. Chromatogr. 228:215-22 (1982)
Metoprolol (M)	CLAR Plasma	Fluorescencia	5 ng/mL	J. Chromatogr 71(1):114-15 (1982)
Metoprolol (M)	CLAR Plasma	Fluorescencia	—	Chromatographia 16:153-61 (1982)
Metoprolol (M)	CLAR Plasma	Fluorescencia	2 ng/mL	J. Chromatogr. 278(1):204-8 (1983)
Metoprolol (M)	CLAR Plasma	Fluorescencia	10 ng/mL (M) 8 ng/mL (HM)	J. Chromatogr. 305(2):411-17 (1984)
Metoprolol (M)	HPLC Plasma	Fluorescencia	2 ng/mL	J. Chromatogr. 339(2):429-33 (1985)
Metoprolol (M)	CLAR Plasma	Fluorescencia	—	J. Liq. Chromatogr. 9(2-3):269-90 (1986)
Metoprolol (M)	CLAR Plasma	Fluorescencia	0.5 ng/mL	J. Chromatogr. 417(2):357-65 (1987)
Metoprolol (M)	HPLC Plasma	Fluorescencia	5 ng/mL	J. Chromatogr 434(1):265-70 (1988)
Metoprolol (M)	CLAR Plasma	Fluorescencia	—	J. Pharm. Biomed. Anal. 7(4):483-97 (1989)
Metoprolol (M)	CLAR Plasma	Fluorescencia	5 ng/mL (M)	J. Chromatogr. 488(2):498-502 (1989)
Metoprolol (M)	CLAR Plasma	Fluorescencia	—	J. Chromatogr 506:593-9 (1990)
Metoprolol (M)	CLAR Plasma	Fluorescencia	5 ng/mL	J. Liq. Chromatogr. 14(4):777-93 (1991)

**TABLA 2.2**

Métodos analíticos para cuantificar metoprolol en diferentes fluidos biológicos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y cromatografía en capa fina (CCF)

DETERMINACION	METODO	DETECCION	LIMITE DE DETECCION	REFERENCIA
Metoprolol (M)	CLAR plasma/tejido	Fluorescencia	2 ng/mL (plasma) 5 ng/mL (tejido)	J. Chromatogr. 228:223-34 (1982)
Metoprolol (M) $\alpha$ -Hidroxi metoprolol	CLAR Suero, orina, Fluido cerebro espinal	Fluorescencia	5 ng/mL (M) 4 ng/mL (HM)	J. Pharm Sci. 73(7):961-3 (1984)
Metoprolol (M)	CCF orina	—	—	J. Anal. Toxicol. 9(4):180-2 (1985)
Metoprolol (M) $\alpha$ -Hidroxi metoprolol(HM) O-dealquilado (OM) Derivado Acido carboxilado(AM)	CLAR  Orina y microsomas hepáticos	Fluorescencia	50 ng/mL (M) 10 ng/mL (HM) 20 ng/mL (OM) 500 ng/mL (AM)	J. Chromatogr. 342(1):199-205 (1985)
Metoprolol	CLAR orina/extracto de hígado	Fluorescencia	—	J. Anal. Toxicol. 12(2):108-110 (1988)
Metoprolol (M)	HPLC sangre de conejo	Fluorescencia	5 ng/mL	Sepu 6(2):103-5 (1988)
Metoprolol (M)	CLAR suero	UV	200 ng/mL	Beitr. Gerichtl. Med 44:253-61 (1986)
Metoprolol (M)	CLAR suero	UV	2.3 ng/mL	Analisis 14(8):421-6 (1986)
Metoprolol (M) $\alpha$ -Hidroxi metoprolol	CLAR Suero	Fluorescencia	2 ng/mL	J. Chromatogr. Sci. 27(9):561-5 (1989)
Metoprolol (M)	CLAR Suero	Fluorescencia	5 ng/mL	J. Chromatogr. 530(1):83-93 (1990)

**TABLA 2.3**

**Métodos analíticos para cuantificar enantiómeros de metoprolol en plasma y/o suero por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)**

<b>DETERMINACION-</b>	<b>METODO</b>	<b>DETECCION</b>	<b>LIMITE DE DETECCION</b>	<b>REFERENCIA</b>
Metoprolol (M) enantiómeros	HPLC Plasma	Fluorescencia	61 ng/mL	J. Chromatogr. 474(1):257-63 (1988)
Metoprolol (M) enantiómeros	HPLC Suero	Fluorescencia	—	J. Chromatogr. Biomed. Appl 497:181-90 (1989)
Metoprolol (M) enantiómeros	HPLC Plasma	Fluorescencia	—	J. Chromatogr. Biomed. Appl 497:313-318 (1989)
Metoprolol (M) enantiómeros	HPLC Plasma	Fluorescencia	—	J. Chromatogr. 473(2):371-9 (1989)
Metoprolol (M) enantiómeros	HPLC Suero	Fluorescencia	—	J. Chromatogr. Biomed. Appl. 530:83-93 (1990)
Metoprolol (M) enantiómeros	HPLC Plasma	Fluorescencia	10 ng/mL	J. Chromatogr. Biomed. Appl. 567(1):221-7 (1991)

**TABLA 2.4**  
**Métodos analíticos para cuantificar metoprolol en plasma y/o orina por**  
 **cromatografía de gases (CG)**

<b>DETERMINACION DE</b>	<b>METODO</b>	<b>DETECCION</b>	<b>LIMITE DE DETECCION</b>	<b>REFERENCIA</b>
Metoprolol (M) α-Hidroxi metoprolol (HM) 10-demethyl - metoprolol	GC plasma/orina	Espectrometría de Masas	0.3 ng/mL	Biomcd. Mass Spectrum 8(7):322-6 (1981)
Metoprolol (M)	GC plasma	Captura de electrones	Abojo de 10ng/mL	J. Chromatogr. 272(1):103-10 (1983)
Metoprolol (M)	GC plasma	Nitrógeno	2.9 ng/mL	J. Chromatogr. 273(1):129-139 (1983)
Metoprolol (M)	GC plasma	Captura de electrones	5 ng/mL	Fresenius 'Z. Anal. Chem. 318(6):425-7 (1984)
Metoprolol (M)	GC plasma	Captura de electrones	5 ng/mL	Methodol. Anal. Toxicol 3:117-20 (1985)
Metoprolol (M)	GC plasma	Espectrometría de Masas	5 ng/mL	J. Chromatogr. 339(2):404-9 (1985)
Metoprolol	GC plasma/orina	Captura de electrones	2.9 ng/mL	J. Chromatogr. 381(1):168-74 (1986)
Metoprolol (M)	GC plasma	Captura de electrones	2.9 ng/mL	J. Chromatogr. 381:168-74 (1986)
Metoprolol (M)	GC plasma	Captura de electrones	1 ng/mL	Yaouxue Xuebao 25(6):457-61 (1990)
Metoprolol (M)	GC plasma/orina	Espectrometría de Masas	—	Yaouxue Xuebao 26(5):351-7 (1991)

**TABLA 2.5**  
**Métodos analíticos para cuantificar metoprolol en orina por**  
**cromatografía de gases (CG)**

DETERMINACION DE	METODO	DETECCION	LIMITE DE DETECCION	REFERENCIA
Metoprolol(M) y sus principales metabolitos en el hombre, en el perro y en la rata.	GC orina	Espectrometría de Masas	—	Acta Pharmacol et toxicol. 36(V):125-135 (1975)
Metoprolol (M) α-Hidroximetoprolol (HM)	GC orina.	Ionización a la Flama	1-5 ng/mL	J. Chromatogr. 309(2): 317-328 (1983)
Metoprolol (M) α-Hidroximetoprolol (HM)	GC orina	Espectrometría de Masas	20 ng/mL	J. Chromatogr. 426:191-201 (1984)
Metoprolol (M)	GC orina	Ionización de la Flama	—	J. Chromatogr. 382:147-65 (1986)
Metoprolol (M)	GC Orina	N <sub>2</sub>	—	Biomed. Environ. Mass Spectrom. 14(10):543-8 (1987)
Metoprolol (M)	GC Orina	Captura de electrones	1 ng/mL	J. High. Resolut. Chromatogr. Commun 11(79):528-32 (1988)
Metoprolol (M)	GC Orina	Espectrometría de masas	—	J. Chromatogr. 488(2):357 -67 (1989)

# C A P I T U L O    I I I

## PARTE EXPERIMENTAL

## **3.1 REACTIVOS Y MATERIALES EMPLEADOS EN EL ESTUDIO**

### **3.1.1 Reactivos**

- 3.1.1.1 Acetonitrilo grado cromatográfico, Mallinckrodt.
- 3.1.1.2 Agua grado cromatográfico, Waters System Reagent.
- 3.1.1.3 Diclorometano, grado UVASOL, Merck
- 3.1.1.4 Fosfato monobásico de potasio R.A., J.T. Baker.
- 3.1.1.5 1-Heptansulfonato de Sodio, Aldrich Chemical Co.
- 3.1.1.6 Hidróxido de Sodio R.A., J.T. Baker.
- 3.1.1.7 Metanol R.A., J.T. Baker.
- 3.1.1.8 Plasma Humano, libre de pirógenos y certificado de pruebas de VDRL, VIH, factor Rh y grupo sanguíneo, procedente del banco de plasma de la Unidad de Investigación del Hospital Infantil de México.

### **3.1.2 Estándares**

- 3.1.2.1 Acebutolol estándar interno, Sigma.
- 3.1.2.2 Tartrato de metoprolol, estándar secundario de referencia Syntex.

### **3.1.3 Producto Innovador**

Lopressor<sup>®</sup>  
Ciba Geigy

### **3.1.4 Metabólitos**

- 3.1.4.1** Para-hidroxibenzoato de ( $\alpha$ -OH metoprolol)
- 3.1.4.2** Acido (2-hidroxi-3-(4-metoxietil-fenoxi)-propanoico.
- 3.1.4.3** Clorhidrato del (4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi) fenil acético.

Amablemente donados por los laboratorios de Astra Hässle AB Mölndal, Suecia.

### **3.1.5 Material**

- 3.1.5.1** Baño de ultrasonido modelo B-52, Branson.
- 3.1.5.2** Balanza analítica Modelo 1712, Sartorius.
- 3.1.5.3** Bomba de vacío y presión con gradilla para evaporación, BARNANT.
- 3.1.5.4** Centrifuga Modelo K, IEC.
- 3.1.5.5** Micropipeta automática de 001 - 5 mL, con puntas de propileno de capacidad de 1 mL, Eppendorf.
- 3.1.5.6** Micropipeta de 100 - 1000  $\mu$ L con puntas de propileno de capacidad de 1 mL, Labsystemse equivalente.
- 3.1.5.7** Membranas de filtración tipo HA (0.45 micras) y GVWP (0.22 micras), Millipore.
- 3.1.5.8** Homogenizador Vortex modelo 16700, Thermolyne.
- 3.1.5.9** Soporte para membranas de filtración modelo OM 39, Millipore.
- 3.1.5.10** Potenciometro Modelo  $\phi$  45, Beckman.

### **3.1.6 Equipo**

- 3.1.6.1** Cromatógrafo de líquidos, equipado con bomba e inyector automático Hewlett Packard modelo 1050 y detector de fluorescencia de longitud de onda variable, modelo Hewlett Packard 1046A.
- 3.1.6.2** Integrador modelo 3396-A, Hewlett-Packard
- 3.1.6.3** Columna Licrosphere 60 RP-Select B, 5 micras, de 125 x 4.6 mm Merck.
- 3.1.6.4** Precolumna empacada con VYDAC SC-201 RP, tamaño de partícula de 30-40  $\mu\text{m}$ , MachereyNagel.
- 3.1.6.5** Disolutor Hanson-Research, Modelo SR-2
- 3.1.6.6** Baño de Agua Hanson-Research Modelo 64-100-160
- 3.1.6.7** Control de Temperatura y velocidad Modelo 47
- 3.1.6.8** Motor Hanson-Research Modelo 72-600-400
- 3.1.6.9** Espectrofotómetro Hewlett-Packard Modelo 8451A
- 3.1.6.10** Impresora Hewlett-Packard Modelo 2225 AK
- 3.1.6.11** Interfase válvula bomba Hewlett - Packard Modelo 89023B
- 3.1.6.12** Controlador Manual Interfase Vici Modelo E-H8
- 3.1.6.13** Bomba Peristáltica Isco, Modelo N/A

### **3.1.7 Soluciones y Fase Móvil**

#### **3.1.7.1 Solución de Hidróxido de Sodio 2M**

Pesar 8 g de hidróxido de sodio (NaOH) dentro de un vaso de precipitado. Disolver en aproximadamente 50 mL de agua destilada, dejar enfriar a temperatura ambiente y transferir a un matraz volumétrico de capacidad de 100 mL y llevar al aforo con agua destilada.

### **3.1.7.2 Fase móvil**

#### **3.1.7.2.1 Preparación**

Pesar 2.17 g de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y depositarlos en un frasco para fase móvil de capacidad de 1.5 litros. Adicionar 252 mg de 1-Heptansulfonato de sodio. Disolver con 800 mL de agua filtrada a través de membrana de 0.45 micras y perfectamente medida. Añadir 200 mL de acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) grado cromatográfico, filtrado por membrana de 0.22 micras.

Se obtiene una mezcla final con la siguiente proporción :

$\text{CH}_3\text{CN}$  :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  con 1-Heptansulfonato de Sodio  
(20 : 80)

#### **3.1.7.2.2 Desgasificación**

Desgasificar la fase móvil por burbujeo con con helio o con agitación y vacío durante 10 min.

### **3.1.8 Lavado de Material**

El material empleado deberá ser lavado con una solución de Sigmaclean o su equivalente. Enjuagado con abundante agua calidad HPLC y dejarlo sumergido durante 12 horas en una solución de ácido nítrico diluido<sup>(12)</sup>, enjuagado finalmente con agua HPLC y secado antes de su uso.

### **3.1.9 Programas Computacionales**

STATGRAPHICS<sup>R</sup>  
DESIGN EASE<sup>R</sup>  
PC NONLINE<sup>R</sup>  
JANA<sup>R</sup>  
BIOPAK<sup>R</sup>

## **3.2 PRUEBAS "IN VITRO"**

Las pruebas "in vitro" efectuadas a los productos bajo estudio fueron:

### **3.2.1 Controles Físicos (93)**

- 3.2.1.1 Apariencia: De acuerdo a especificaciones internas del proveedor.
- 3.2.1.2. Peso Promedio
- 3.2.1.3 Variación de Peso
- 3.2.1.4 Dureza
- 3.2.1.5 Desintegración
- 3.2.1.6 Friabilidad

### **3.2.2 Controles Químicos (12, 93)**

- 3.2.2.1 Contenido de Tartrato de Metoprolol  
Se utilizó un método cromatográfico por CLAR con detección al UV a 254 nm y con un criterio de aceptación de 90 a 110 % de lo establecido en el marbete.
- 3.2.2.2 Uniformidad de Contenido  
Se utilizó un método espectrofotométrico UV a una longitud de onda de 276 nm y con un criterio de aceptación de 85 a 115 % de lo establecido en el marbete.

### **3.2.3 Pruebas de Disolución (12, 93)**

- 3.2.3.1 Medio de Disolución: Fluido Gástrico Simulado
- 3.2.3.2 Aparato: Tipo II (Paletas) 100 rpm
- 3.2.3.3 Tiempo: 30 min
- 3.2.3.4 Criterio de Aceptación: No menos del 75% (Q) de la cantidad marcada de tartrato de metoprolol se disuelve en 30 min.

### 3.3 METODO ANALITICO

#### 3.3.1 Optimización del método analítico para cuantificar metoprolol en plasma

La optimización del método (6,7,8 y 9) se realizó por medio de un diseño experimental del tipo factorial de  $2^3$ , con el propósito de encontrar las mejores condiciones cromatográficas para la técnica analítica seleccionada. Por lo que se planteó un estudio de tres factores: la velocidad de flujo de la fase móvil, el volumen de inyección de la muestra y la potencia de la lámpara del detector de fluorescencia (PMT) sobre una variable de respuesta seleccionada, en este caso la simetría de las respuestas cromatográficas en alturas del metoprolol y del acebutolol (estándar interno). Se preparó una muestra adicionada de metoprolol de 200 ng/mL a la cual se le aplicó el procedimiento de extracción reportado en 3.3.2.4. Inyectando las muestras al sistema cromatográfico según las condiciones enlistadas en 3.3.2.1., variando los factores establecidos en la Tabla 3.1, en la cual se puede apreciar que se efectuaron 8 corridas experimentales, inyectándose las muestras aleatoriamente de acuerdo al número del experimento considerando un valor bajo (-) y uno alto (+) para los factores en estudio y clasificándose como:

a= Volumen de inyección: 10  $\mu$ L (-),            20  $\mu$ L (+)  
b= Velocidad de flujo : 1.0 mL/min (-), 1.5 mL/min (+)  
c= Potencia de la lámpara: 10 PMT (-),    14 PMT (+)

Los resultados obtenidos se analizaron por medio del programa computacional DESIGN-EASE<sup>®</sup>.

**TABLA 3.1**

Diseño factorial de  $2^3$  para encontrar condiciones óptimas de separación cromatográficas.

Bloques:1      Factores: 3      Experimentos: 8

EXPERIMENTO	a	b	c
1	-	-	-
7	+	-	-
8	-	+	-
5	+	+	-
6	-	-	+
2	+	-	+
4	-	+	+
3	+	+	+

**FACTORES ESTUDIADOS:**

- a) Volumen de inyección ( 10, 20 mL)
- b) Velocidad de flujo (1.0, 1.5 mL/ min)
- c) Potencia de la lámpara del detector de fluorescencia (10 PMT , 14 PMT)

### **3.3.2 Método para Cuantificar Metoprolol en Plasma.**

#### **3.3.2.1 Condiciones Cromatográficas**

Columna LiChospher 60 RP-Select B, 5 micras de 12.5 x 4.6 mm., Merck o equivalente y precolumna empacada VYDAC SC - 201 RP de tamaño de partícula de 30-40  $\mu\text{m}$ .

Velocidad de Flujo	1.5 mL/min
Presión	132 bar
Temperatura	ambiente
Tiempo de corrida	10 min
Velocidad de carta	0.2 cm/min
Longitud de onda de excitación	230 nm
Longitud de onda de emisión	306 nm
Volumen de inyección	20 $\mu\text{L}$
PMT del detector	10

#### **3.3.2.2 Preparación de Soluciones.**

##### **3.3.2.2.1 Solución patrón del estándar interno**

Pesar exactamente 25 mg de acebutolol, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de una capacidad de 50 mL, disolver y llevar a volumen con agua destilada, obteniéndose una concentración final de 500  $\mu\text{g/mL}$ .

##### **3.3.2.2.2 Solución patrón del estándar de referencia**

Pesar exactamente una cantidad de 25.7 mg de tartrato de metoprolol estándar de referencia, equivalente a 10 mg de metoprolol base ( el peso molecular del tartrato de metoprolol es de 685 y el del metoprolol base de 267 ), transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, añadir aproximadamente 50 mL de agua destilada. Agitar y llevar al baño de ultrasonido durante 2 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua grado cromatográfico. Homogenizar por un minuto con agitador. Se obtiene una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$  de metoprolol base.

### **3.3.2.3 Preparación de la curva de calibración en plasma.**

De la solución **3.3.2.2** realizar las diluciones correspondientes para tener una concentración final en plasma de 3, 30, 50, 100 y 200 ng/mL de metoprolol base, aplicar el procedimiento **3.3.2.4** e inyectar al sistema cromatográfico bajo las condiciones enlistadas en **3.3.2.1**. Determinar la relación de alturas de las muestras plasmáticas, dividiendo la respuesta cromatográfica del metoprolol entre la respuesta del estándar interno:

$$FR = \frac{Am}{Aa}$$

Donde:

FR=Factor de Respuesta

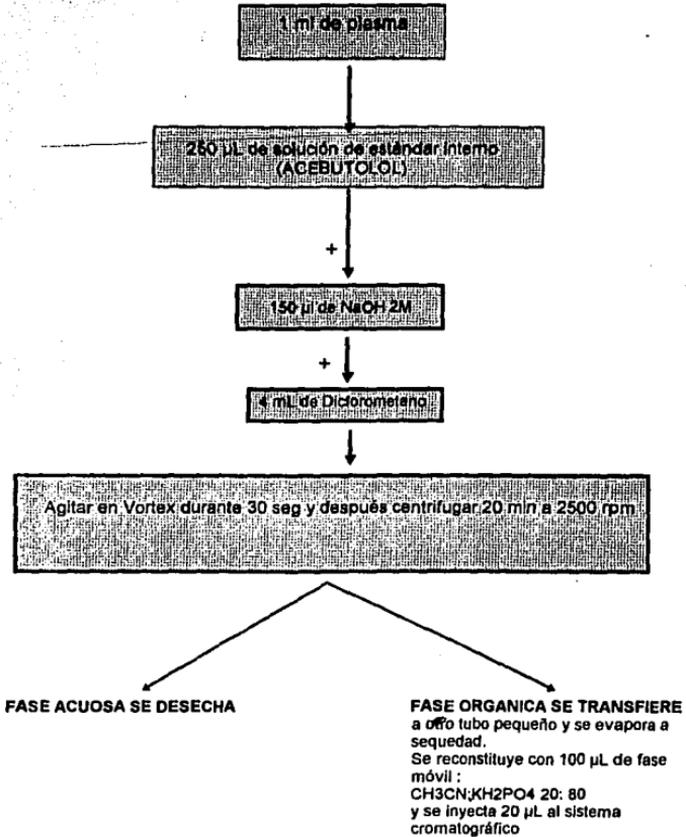
Am=Respuesta en altura de metoprolol

Aa=Respuesta en altura de acebutolol

Grficar la relación de alturas de las respuestas obtenidas en el eje de las ordenadas y las concentraciones de las mismas en el eje de las abscisas, para obtener la curva patrón.

### **3.3.2.4. Procedimiento**

A 1 mL de plasma, adicionar 250  $\mu$ L de la solución de estándar interno (**acebutolol**). Agregar 150  $\mu$ L de solución de hidróxido de sodio 2M y 4 mL de diclorometano. Agitar durante 30 seg en un agitador mecánico (Vortex), centrifugar a 2500 rpm por 20 min. Descartar con pipeta pasteur la fase acuosa (capa superior) y transferir la fase orgánica a un tubo de ensayo de 10 mL. Evaporar la fase orgánica con ayuda de una corriente de aire o de nitrógeno y reconstituir con 100  $\mu$ L de fase móvil. Agitar vigorosamente por dos minutos (Vortex) e inyectar al sistema cromatográfico bajo las condiciones enlistadas en **3.3.2.1**. La secuencia del método empleado se presenta en la **FIGURA 5**.



**FIGURA 5**

Secuencia empleada para la extracción de tartrato de metoprolol de las muestras plasmáticas (Método CLAR con detección por fluorescencia)

### **3.3.2.5 Identificación y cuantificación de metoprolol en las muestras plasmáticas.**

La identificación del metoprolol base se estableció por la comparación de los tiempos de retención encontrados en la solución estándar y en la solución de la muestra (figura 9). La cuantificación se realiza interpolando la relación de respuestas (alturas) de las muestras correspondientes en la gráfica de la curva patrón para determinar la concentración en ng/mL de metoprolol en la muestra original.

### **3.3.3 Validación del Método Analítico**

#### **3.3.3.1 Especificidad**

La especificidad del método se determinó probando la no interferencia de la matriz biológica (plasma), de los anticoagulantes principales: heparina, ácido cítrico, citrato de sodio, glucosa, así como de los reactivos hidróxido de sodio y diclorometano y de los tres metabolitos del metoprolol: p-OH benzoato de ( $\alpha$ -OH metoprolol), ácido (2- hidroxi-3- (4-metoxietil-fenoxi) propanoico y clorhidrato del (4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenil acetico, para llevarlo a cabo se trabajaron en forma independiente y por duplicado, muestras de 1 mL de plasma de diferentes donadores (3.1.1.8.), de agua(3.1.1.2), de plasma adicionada con los metabolitos, y de los anticoagulantes las cuales se trataron según a 3.3.2.4.e inyectaron de acuerdo a 3.3.2.1.

#### **3.3.3.2 Linealidad**

La linealidad del método se determinó preparando cuatro curvas patrón siguiendo lo establecido en 3.3.2.3 , gráficando la relación de alturas ( de metoprolol y del estándar interno) contra la concentración del fármaco en un intervalo de 3 a 200 ng/mL y evaluando el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto.

### **3.3.3.3 Límite de Detección y Cuantificación**

El límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fue estimado con 2 curvas de calibración, en el intervalo de concentración de 2.5 a 200 ng/mL por medio de dos métodos:

#### **3.3.3.3.1 Método I<sup>(78)</sup>**

Determinar las alturas de las respuestas de tartrato de metoprolol en mm.

Gráficar las respuestas contra las concentraciones.

Calcular la pendiente de la curva de calibración.

Realizar 3 determinaciones de la "señal de ruido del sistema cromatográfico" (medidas en mm).

Obtener la desviación estándar.

Determinar el límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) aplicando las siguientes ecuaciones:

$$\text{LOD} = 3 \text{ Sb/S}$$

$$\text{LOQ} = k \text{ Sb/S}$$

Donde:

Sb = Desviación estándar

S = Pendiente de la curva

k = 10 para 10% de RSD (Desviación estándar relativa)

#### **3.3.3.3.2 Método II<sup>(82)</sup>**

Convertir las respuestas de metoprolol de mm a AUFS.

(0 atenuación = 1mv = 0.001 V = 0.01 AUFS).

Gráficar los valores en AUFS contra las concentraciones.

Obtener el valor promedio del "nivel de ruido del sistema cromatográfico (mm)".

Determinar su equivalencia en AUFS.

Multiplicar este valor por 3 o 10 (el límite de detección (LOD) se considera como 3 veces el valor del nivel del ruido y para el límite de cuantificación (LOQ) de 10 veces ese valor).

Interpolar en la curva de regresión lineal y obtener la cantidad correspondiente en ng/mL.

#### **3.3.3.3.3 Verificación del límite de cuantificación.**

Una vez obtenido la cantidad correspondiente al límite de cuantificación, se verificó el valor, preparando 5 muestras independientes adicionadas con la cantidad de metoprolol determinada para tal límite, procesando las muestras de acuerdo a 3.3.2.4. e inyectando conforme a 3.3.2.1. Calcular su coeficiente de variación.

#### **3.3.3.4 Exactitud y Precisión**

La exactitud y la precisión del método fué evaluada con cinco concentraciones de calibración (3 a 200 ng/mL) en dos diferentes días con 4 replicas para cada concentración.

El porcentaje de recobro se determino, preparando tanto muestras de plasma como en solución acuosa, adicionadas con metoprolol a los cinco niveles de concentración establecido, realizando el proceso de extracción e interpolando en una curva patrón de plasma. También se determinó el valor para las muestras acuosas sin someterlas al proceso de extracción.

#### **3.3.3.5 Reproducibilidad**

La reproducibilidad del método se llevó a cabo evaluando un solo nivel de concentración (100%) con tres réplicas, dos analistas en dos diferentes días.

#### **3.3.3.6 Estabilidad**

La estabilidad del metoprolol en plasma, se verificó de dos maneras:

##### **3.3.3.6.1 Estabilidad a largo plazo.**

Se preparó una solución de plasma adicionada con metoprolol (50 ng/mL), se repartió una cantidad de 1 mL de esta solución, en tubos de ensayo con una capacidad de 25 mL. Se efectuó el análisis inicial para 4 tubos de acuerdo al procedimiento 3.3.2 y los tubos restantes se mantuvieron en congelación a una temperatura de -15 °C, analizándose cuatro tubos cada semana, durante un período de un mes, siguiendo el mismo procedimiento.

##### **3.3.3.6.2 Estabilidad en fase móvil.**

Se preparó una muestra de plasma adicionada con aproximadamente 100 ng/mL de metoprolol. Se transfirió, individualmente, 1 mL a quince tubos de ensayo con capacidad de 25 mL. Se analizarón 3 de estas muestras de acuerdo a 3.3.2 y las restantes se procesaron hasta el último paso de reconstituir con 100 µL de fase móvil y se guardaron a 5 °C. Analizando 3 de estas últimas muestras, a las 24, 36 y 48 horas.

### **3.4 Estudio de Bioequivalencia**

#### **3.4.1 Diseño Experimental del Estudio**

El estudio se realizó de acuerdo a un diseño aleatorizado cruzado de dos períodos, dos secuencias. La aleatorización fue balanceada en bloques de doce sujetos cada uno. El producto a probar fue asignado como formulación A y el producto innovador como formulación B.

#### **3.4.2 Número de Voluntarios**

En el estudio participaron 24 voluntarios sanos, con edades comprendidas entre 18 y 40 años y un peso aproximado de 55 a 80 kg. Los sujetos se encontraban en buen estado físico, lo cual se estableció en base a los resultados de su historia médica, en los exámenes físicos y en las pruebas de laboratorio, que incluyeron: biometría hemática, química sanguínea, orina, HIV, prueba de enfermedades venéreas y evaluación coproparasitaria.

#### **3.4.3 Criterios de Inclusión**

Voluntarios del sexo masculino con edades entre 18 y 40 años, con pesos comprendidos entre 55 y 80 Kg. Los pesos deben ser proporcionales a las estaturas, teniendo en cuenta como un peso ideal un +/- 10% de su estatura (94).

Disponibilidad del sujeto para participar en el estudio.

Buena salud avalada por los resultados de su historial clínico, examen físico y 12 electrocardiogramas.

Valores de resultados de laboratorio no más de 10% fuera de condiciones normales.

Signos vitales normales desde la selección hasta el final del estudio considerando como una presión sanguínea normal en la posición de reposo para la sistólica de 90 a 140 mmHg y para la diastólica de 60 a 90 mm Hg y como pulso normal 55 a 100 pulsaciones por minuto.

#### **3.4.4. Criterios de Exclusión**

Los sujetos con antecedentes de hipersensibilidad a cualquier fármaco (en particular a un agente  $\beta$ -bloqueador).

Personas con daño significativo cardiovascular, renal, hepático, metabólico, gastrointestinal, endocrino, neurológico (incluso epilepsia), cualquier tipo de anemia u otro trastorno orgánico incluyendo enfermedad mental.

Los sujetos que requieran administración de cualquier tipo de fármaco durante el estudio y/o que en los estudios clínicos presenten resultados fuera de los valores normales a menos que a criterio del responsable médico lo juzgue como no significativo.

Sujetos que por cualquier razón han sido hospitalizados durante las 8 semanas previas al estudio o han tenido enfermedades clínicamente importantes en las cuatro semanas anteriores y/o se les haya administrado cualquier medicamento (excepto aspirina) durante los 14 días o cinco vidas medias de eliminación del fármaco en estudio así como aquellos a los que se le haya administrado en los 3 meses anteriores cualquier medicamento del cual no se tenga bien definida su toxicidad sobre el voluntario.

#### **3.4.5 Carta de Consentimiento de los voluntarios**

Todos los voluntarios que participaron fueron informados claramente del propósito del estudio, así como de los riesgos del mismo y después de ello, firmaron una carta de consentimiento.  
**Apéndice 6**

#### **3.4.6 Análisis Clínicos**

Los análisis realizados a los voluntarios fueron:

Biometría hemática: hemoglobina, hematócrito, conteo de células rojas, conteo total de células blancas, conteo estimado de plaquetas.

Química sanguínea: sodio, potasio, urea sanguínea, ácido úrico, creatinina, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, gama GT, bilirrubina total, glucosa, colesterol, triglicéridos, proteínas totales, albúmina y virus del hepatitis.

HIV, prueba para enfermedades venéreas, coproparasitarias y entéricas.

Orina: gravedad específica, pH, proteína, cetonas, urobilinogeno, glucosa y un examen microscópico.

12 electrocardiogramas al final del estudio.

### **3.4.7 Reacciones Adversas**

Todos los signos o síntomas de reacciones adversas que ocurrieron durante el estudio se reportaron en detalle en el informe de cada paciente, la descripción incluyó la naturaleza de los signos y/o síntomas, la fecha en que se detectó, el tiempo al cual se presentó, la duración del efecto, la severidad de la reacción, si se requirió otra terapia o no y si los signos o síntomas que fueron detectados se relacionaron a la administración del fármaco o no. Cualquier sintoma anormal o reacción severa fue informada al responsable médico y se reportó por escrito.

### **3.4.8 Muestras Sanguíneas**

Se colectaron muestras de 10 mL de sangre en tubos heparinizados. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 RPM por 30 min. El plasma se transfirió a tubos de polipropileno, limpios y etiquetados.

Cada muestra se dividió en dos tubos, se congelaron sin conservadores y se guardaron a  $-15^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4.9 Etiquetado y Congelamiento de Muestras**

Los tubos conteniendo las muestras fueron identificados con etiquetas autoadheribles.

Cada etiqueta incluía el número del protocolo, la clave de identificación de la muestra, el número asignado a cada voluntario, el período, la fecha y el código correspondiente al horario de la toma de muestra.

Se empleó tinta negra indeleble para anotar todos los datos anteriores.

### **3.4.10 Horario de Toma de Muestras**

El horario de muestreo fué el siguiente: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 18, y 24 horas, posteriores a la administración de las formulaciones.

Entre los dos periodos de administración de las formulaciones A y B se dejó un período de lavado de una semana para asegurar la completa eliminación del fármaco administrado en el primer período.

### **3.4.11 Secuencia y Dosis de Administración de los Medicamentos.**

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a cada una de las dos secuencias. La aleatorización fue balanceada en bloques de 12 sujetos cada uno (Tabla 3.2).

**El producto innovador fue designado como formulación B (tableta de 100 mg) y el producto de prueba como formulación A (tableta de 100 mg).**

Se administró una dosis única de 100 mg de tartrato de metoprolol.

El estudio fue de tipo doble ciego, de manera que los voluntarios desconocían cual de las dos formulaciones se le había administrado en cada período. El médico que evaluó los efectos clínicos, tampoco estuvo enterado de la identidad de ellas y los químicos analistas que realizaron el análisis de las concentraciones plasmáticas desconocían la secuencia de administración de las formulaciones así como el tiempo de muestreo, hasta la etapa final del estudio.

### **3.4.12 Análisis de las Muestras plasmáticas**

Las muestras se analizaron de acuerdo al procedimiento descrito en 3.3.2.

Las concentraciones plasmáticas de metoprolol para los 24 voluntarios a los diferentes tiempos de muestreo fueron determinadas por interpolación de la relación de respuestas en una curva de calibración. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

### **3.4.13 Análisis Estadístico de los datos del estudio de Bioequivalencia.**

Los parámetros calculados para cada sujeto fueron los siguientes:

El área bajo la curva hasta el último tiempo de muestreo ( $ABC_0^t$ )

El área bajo la curva de cero hasta el infinito ( $ABC_0^\infty$ )

La concentración plasmática máxima (C<sub>max</sub>).

El tiempo al cual se alcanza la máxima concentración (T<sub>max</sub>).

La vida media de eliminación (t<sub>1/2</sub>).

Los cálculos se realizaron utilizando el programa BIOPAK R. Los datos de concentración para cada paciente se transformaron a logaritmo base 10 siguiendo las recomendaciones de Steinijans<sup>(83)</sup> y Westlake<sup>(84)</sup> para establecer los intervalos de confianza.

Se realizó también la prueba de Anderson-Hauck<sup>(86)</sup> como soporte estadístico.

**TABLA 3.2**

**Secuencia de administracion de las formulaciones durante el estudio de Bioequivalencia**

<b>FORMULACION</b>	<b>PERIODO 1</b>	<b>PERIODO 2</b>
<b>A</b>	<b>Voluntario No.</b>	<b>Voluntario No.</b>
	2	1
	4	3
	5	6
	7	8
	11	9
	12	10
	13	14
	16	15
	19	17
	20	18
	21	23
	22	24
<b>B</b>	1	2
	3	4
	6	5
	8	7
	9	11
	10	12
	14	13
	15	16
	17	19
	18	20
	23	21
	24	22

**C A P I T U L O   I V**  
**RESULTADOS**

#### **4.1 Control de Calidad de los Productos**

En la tabla 4.1 se resumen los resultados obtenidos para los controles químicos establecidos por la FEUM 5a Ed.(93) los cuales se aplicarán a las dos formulaciones de tabletas de tartrato de metoprolol empleadas en el estudio de Bioequivalencia.

#### **4.2 Prueba de Disolución**

En la tabla 4.2 se presentan los valores promedio de porcentaje disuelto de metoprolol para cada tiempo de muestreo con su respectiva desviación estándar relativa (o coeficiente de variación), obtenidos para las pruebas de disolución de los dos producto estudiados el de prueba (FORMULACION A) y el de referencia o producto innovador (FORMULACION B).

El perfil de disolución promedio para cada una de las dos formulaciones se muestra graficamente en la **figura 6**.

#### **4.3 Optimización del Método Analítico.**

En las figuras 7 y 8 se muestran las superficies de respuesta del Metoprolol y Acebutolol obtenidas por medio del programa computacional DESIGN-EASE R. En las que se destaca el punto de convergencia para las tres variables estudiadas: Velocidad de flujo, volumen de inyección y PMT de la lámpara, teniendo como factor de respuesta la simetría de los picos cromatográficos.

**TABLA 4.1**

**Resultados de control de calidad para los productos estudiados  
(Producto A = formulación de prueba Producto B = formulación de referencia o  
producto innovador)**

<b>DETERMINACION</b>	<b>ESPECIFICACION</b>	<b>PRODUCTO A</b>	<b>PRODUCTO B</b>
Apariencia	A pasar conforme	Conforme	Conforme
Contenido de Metoprolol	90-110%	100.4%	Conforme
Uniformidad de Contenido **	80%-115%	100.5%	Conforme

\* Variación de Peso n=20

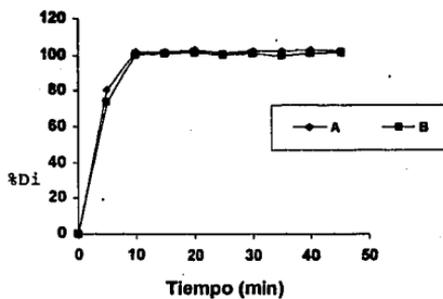
\*\* Uniformidad de Contenido n=10 con un coeficiente de variación de 1.9 %

TABLA 4.2

Porcentaje promedio disuelto de tartrato de metoprolol a los diferentes tiempos de muestreo de la formulación A y de la formulación B  
(Medio de disolución: fluido gástrico simulado)

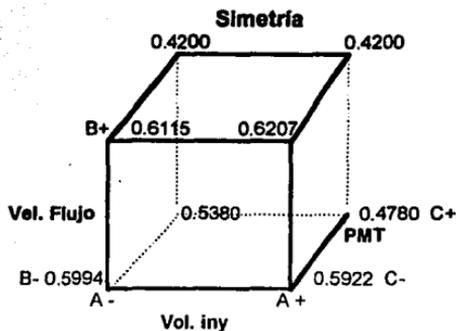
TIEMPO (MIN)	FORMULACION A*	%DSR	FORMULACION B*	%DSR
0	0.00	-	0.00	-
5	80.60	22.4	74.00	16.38
10	101.40	2.1	100.40	2.9
15	102.00	2.9	100.80	2.0
20	103.10	2.7	101.50	2.4
25	101.20	2.5	100.60	2.3
30	102.30	2.4	101.10	2.4
35	102.40	2.3	100.00	2.0
40	102.90	2.8	101.30	2.4
45	102.30	2.6	101.90	2.7

\* n =6



**FIGURA 6**

Gráfica promedio del perfil de disolución para la formulación A (prueba) y la formulación B (referencia o innovador).

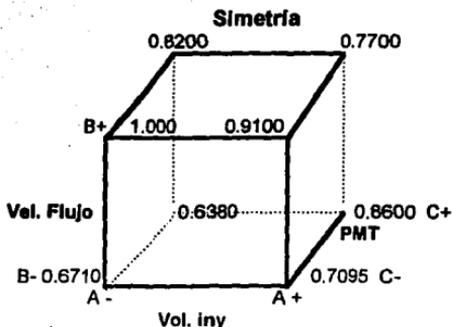


**Vértice de Convergencia:**

A+ = Volumen de inyección 20  $\mu$ L  
 B+ = Velocidad de flujo de 1.5 mL  
 C+ = PMT de la lámpara de 10

## FIGURA 7

Superficie de respuesta para tartrato de metoprolol en la que se representa como variables de respuesta, volumen de inyección, velocidad de flujo y la potencia de la lámpara. Empleando como factor de respuesta la simetría de los picos de los cromatogramas.



Vértice de Convergencia:

A+ = Volumen de inyección 10  $\mu$ L  
 B+ = Velocidad de flujo de 1.5 mL  
 C+ = PMT de la lámpara de 10

### FIGURA 8

Superficie de respuesta para acebutolol, en la que se representa como variables de respuesta, volumen de inyección, velocidad de flujo y la potencia de la lámpara. Empleando como factor de respuesta la simetría de los picos de los cromatogramas.

## **4.4 Validación del Método Analítico**

### **4.4.1 Especificidad**

En la figura 9 se muestran los cromatogramas correspondientes a:

a) Blanco de plasma,	b) Blanco de reactivos,
c) Metoprolol en plasma,	d) Acebutolol(estándar interno),
e) $\alpha$ -hidroximetoprolol,	f) muestra estándar en plasma,
g) muestra característica de un voluntario sano.	

### **4.4.2 Linealidad**

La figura 10 muestra la linealidad del método al gráficar el cociente de la respuesta expresada en altura del metoprolol y del estándar interno (acebutolol) contra la concentración del metoprolol en un intervalo de 3-200 ng/mL.

La ecuación de la regresión lineal de la curva fue de:  
 $y = 0.0513x + 0.0882$  con un coeficiente de correlación de 0.9991.

### **4.4.3 Límite de Detección y Límite de Cuantificación**

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) obtenidos por los dos métodos empleados se reportan en la tabla 4.3. así como el coeficiente de variación para la repetibilidad de las muestras adicionadas con la cantidad estimada como límite de cuantificación (3 ng/mL).

### **4.4.4 Exactitud y Repetibilidad.**

La tabla 4.4 resume los resultados obtenidos para 5 concentraciones de calibración en dos diferentes días con cuatro replicas para cada concentración. En la tabla 4.5, el porcentaje de recobro para muestras tratadas para determinar metoprolol en plasma y en solución acuosa.

#### **4.4.5 Reproducibilidad**

En la tabla 4.6 se muestran los valores obtenidos en el análisis de una muestra plasmática adicional de tartrato de metoprolol a un nivel de concentración de 100 ng/mL, por triplicado, con dos analistas en dos diferentes días.

#### **4.4.6 Estabilidad**

En la tabla 4.7 y 4.8 se presentan los datos para la estabilidad en fase móvil y a largo plazo.

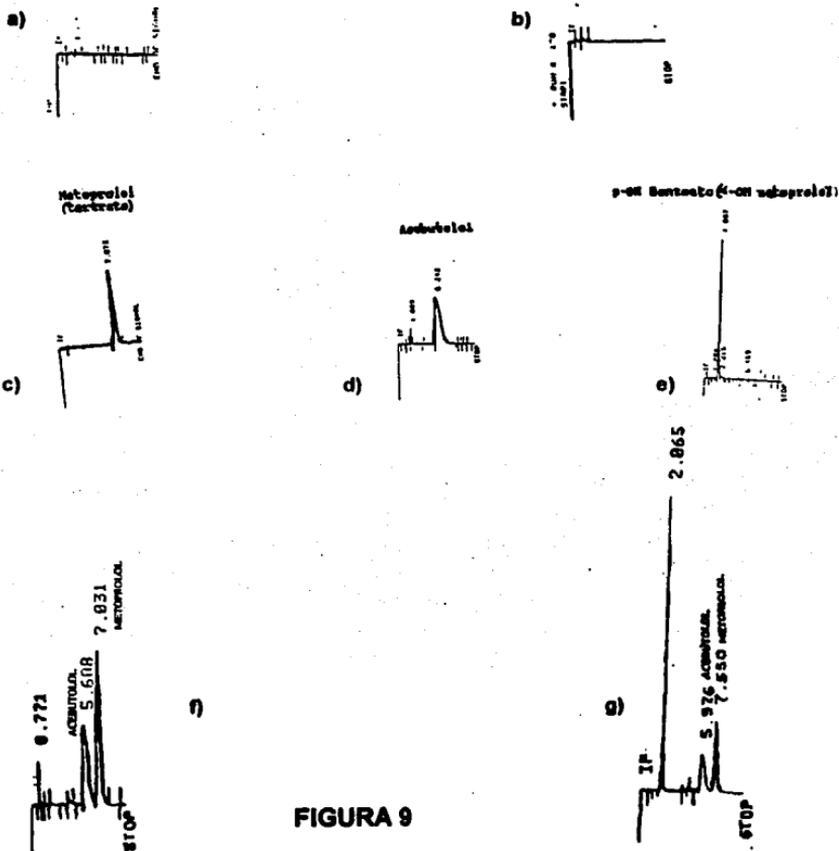


FIGURA 9

Cromatogramas representativos para a) Blanco de Plasma, b) Blanco de Reactivos, c) Metoprolol en plasma, d) Acebutolol (estándar interno), e) alfa-hidroximetoprolol, f) muestra estándar en plasma g) muestra característica de un voluntario sano

LINEALIDAD

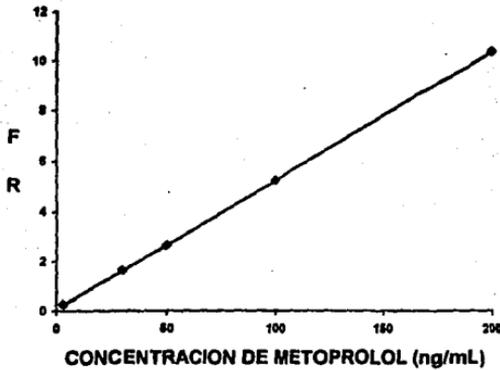


FIGURA 10

En la figura se muestra la linealidad del método al graficar el cociente de la respuesta del metoprolol entre la del estándar interno (expresada en altura), contra la concentración del metoprolol en plasma en un intervalo de 3 - 200 ng/mL

TABLA 4.3

Límite de detección y de cuantificación para tartrato de metoprolol en plasma según el método reportado por Karnez, Shiu y Shah <sup>(78)</sup> (Método I) y por el método tradicional<sup>(82)</sup> (Método II)

	LOD ng/mL	LOQ <sup>Δ</sup> ng/mL
METODO I	0.91	3.03
METODO II	1.50	2.80

<sup>Δ</sup> Límite de cuantificación estimado por los métodos = 3 ng/mL

Límite de cuantificación comprobado para muestras independientes con un coeficiente de variación de 8.5% = 3 ng/mL

**TABLA 4.4**

**Variabilidad intra e inter día de muestras adicionadas con tartrato de metoprolol en plasma para cinco niveles de concentración con cuatro replicas por nivel**

<b>CONCENTRACION (ng/mL)</b>	<b>INTRADIA % CV</b>	<b>INTERDIA %CV</b>
3	8.4	9.1
30	2.5	3.7
50	4.4	4.1
100	1.9	2.1
200	3.6	5.1

TABLA 4.5

Porcentaje de recobro para metoprolol extraído de diferentes matrices.

Concentración adicionada ng/mL	Concentración recuperada ng/mL	% de Recobro (Exactitud)
<b>Agua sin extracción</b>		
3	1.63	54.33
30	28.29	94.30
50	54.18	108.36
100	99.32	99.32
200	199.57	99.78
		Promedio=91.22
<b>Agua con extracción</b>		
3	2.16	72
30	33.85	112.83
50	51.97	103.94
100	100.66	100.66
200	198.67	99.34
		Promedio=97.76
<b>Plasma</b>		
3	2.39	79.66
30	32.46	108.20
50	54.14	108.20
100	100.22	100.22
200	198.56	99.28
		Promedio=99.11

**TABLA 4.6**

Reproducibilidad del método HPLC  
(Dos analistas en dos diferentes días con una muestra plasmática adicionada  
con 100 ng/mL de Metoprolol)

DIA	ANALISTA	CORRIDA 1 ng/mL	CORRIDA 2 ng/mL	CORRIDA 3 ng/mL	PROMEDIO ng/mL	DS	%CV
1	1	87.61	78.73	75.35	80.60	6.3	7.8
2	1	77.01	83.93	87.73	82.90	5.4	6.5
1	2	86.70	92.82	91.25	90.25	3.1	3.5
2	2	81.51	91.95	85.62	86.36	5.2	6.0

TABLA 4.7

Estabilidad del tartrato de metoprolol en plasma durante un mes  
(Condiciones de temperatura de almacenamiento 15 °C)

Análisis Inicial ng/mL	Semana 1 ng / mL	Semana 2 ng /mL	Semana 3 ng /mL	Semana 4 ng /mL
50.75	61.33	48.23	54.46	48.39
53.95	54.31	49.72	57.81	48.62
54.55	57.07	50.81	57.76	51.84
53.90	56.13	47.41	65.27	51.38
<b>% C.V. 3.2</b>	<b>%C.V. 5.2</b>	<b>% C.V. 3.1</b>	<b>% C.V. 7.7</b>	<b>% C.V. 3.6</b>

**TABLA 4.8**

**Estabilidad del tartrato de metoprolol en plasma en un lapso de 48 horas**  
**(Condiciones de temperatura de almacenamiento de 5 °C y reconstituidas en fase móvil)**

<b>Análisis Inicial</b>	<b>24 horas</b>	<b>36 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>ng/mL</b>	<b>ng/mL</b>	<b>ng/mL</b>	<b>ng/mL</b>
<b>109.9</b>	<b>115.5</b>	<b>111.2</b>	<b>111.6</b>

#### **4.5 Estudio de Bioequivalencia**

Terminado el análisis de las muestras plasmáticas para cada uno de los voluntarios en los dos periodos de administración se obtuvieron las concentraciones plasmáticas individuales por interpolación en la curva patrón correspondiente.

Las concentraciones promedio se resumen para las dos formulaciones en la tabla 4.9 y en la figura 11.

En las figuras 12, 14, 16, 18 se presentan las gráficas de distribución de frecuencias para los datos de  $ABC_0^f$  (12, 14) y de  $ABC_0^\infty$  (16, 18).

La representación gráfica de los valores normalizados para los datos de ABC se muestran en las figuras 13, 15, 17 y 19

Los resultados promedio para los parámetros farmacocinéticos:

$ABC_0^f$ ,  $ABC_0^\infty$ ,  $C_{p_{max}}$ ,  $t_{max}$  y  $k_e$  se enlistan en la tabla 4.10

El tratamiento estadístico para los valores fue realizado por medio del programa computacional BIOPAK R, para datos crudos (4.11, 4.12, 4.13, 4.14) y para la transformación de los datos (4.15, 4.16, 4.17, 4.18).

En la tabla 4.19 se presenta el criterio de aceptación de Bioequivalencia para los productos de Prueba y de Referencia.

TABLA 4.9

Concentraciones promedio para los 24 voluntarios sanos en los dos diferentes periodos para las dos formulaciones

CONCENTRACION  
(PROMEDIO +/- SD)

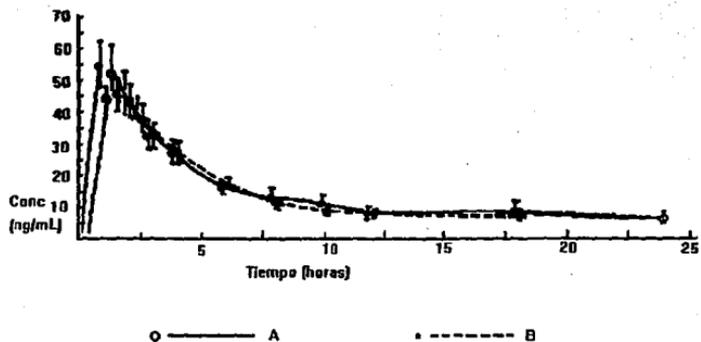
(N=24)

Hora	FORMULA	
	A	B
0.0	0.0000 +/- 0.0000	0.0000 +/- 0.0000
0.5	21.9417 +/- 33.2460	15.2417 +/- 14.2858
1.0	55.0375 +/- 36.2893	43.7250 +/- 20.3889
1.5	52.8958 +/- 39.8701	45.3083 +/- 24.1700
2.0	46.0792 +/- 33.4765	43.4500 +/- 25.8091
2.5	39.4000 +/- 27.7377	37.9625 +/- 23.0821
3.0	32.7375 +/- 21.7519	32.6750 +/- 19.2743
4.0	27.4333 +/- 19.2476	26.8875 +/- 17.9142
6.0	16.6087 +/- 13.1062 A	16.7636 +/- 10.7826 B
8.0	13.3176 +/- 10.7022 C	11.0263 +/- 7.2644 D
10.0	10.9400 +/- 7.5951 E	8.6583 +/- 4.4745 F
12.0	7.8000 +/- 6.5827 G	7.7857 +/- 3.6416 H
18.0	8.2000 +/- 5.5651 I	6.8000 +/- 2.7221 I
24.0	5.7000 +/- 2.8284 J	-

A: n=23    B: n=22    C: n=17    D: n=19

E: n=10    F: n=12    G: n=9    H: n=7

I: n=3    J: n=2

**FIGURA 11**

Gráfica promedio de los niveles plasmáticos de metoprolol en los diferentes tiempos de muestreo en los veinticuatro voluntarios sanos. Después de la administración de las dos formulaciones: **A** (formulación de prueba) y **B** (formulación de referencia)

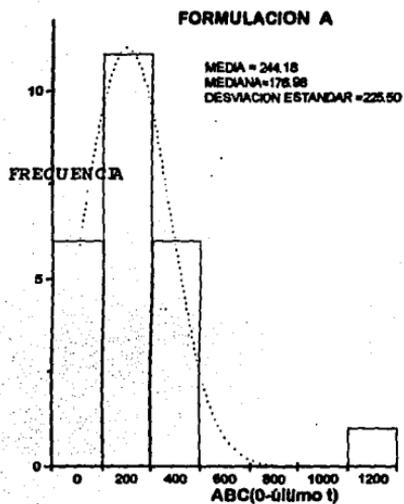
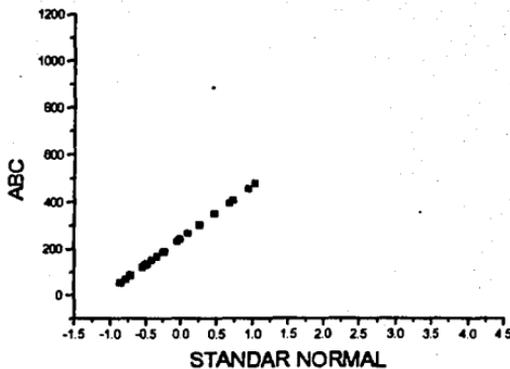


FIGURA 12

Gráfica de distribución de frecuencias para la formulación A (prueba)

ABC'  
0



**FIGURA 13**

Gráfica normal representativa de la distribución de los datos para la formulación A (prueba).

ABC  $\frac{t}{0}$

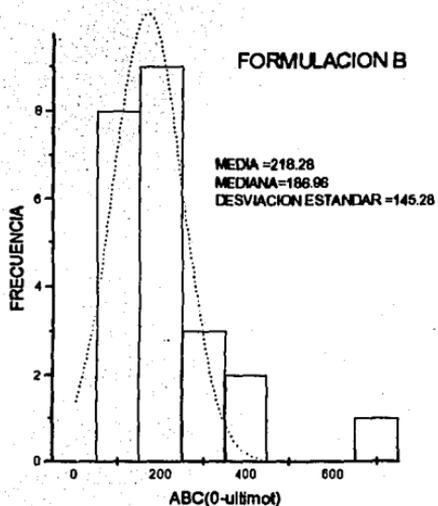
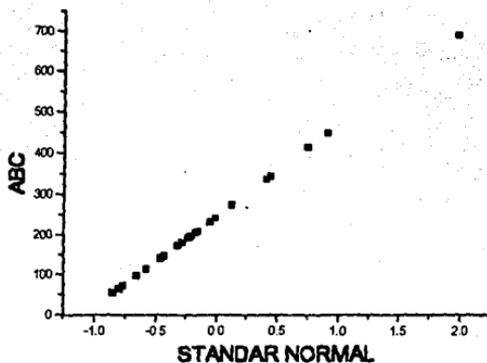


FIGURA 14

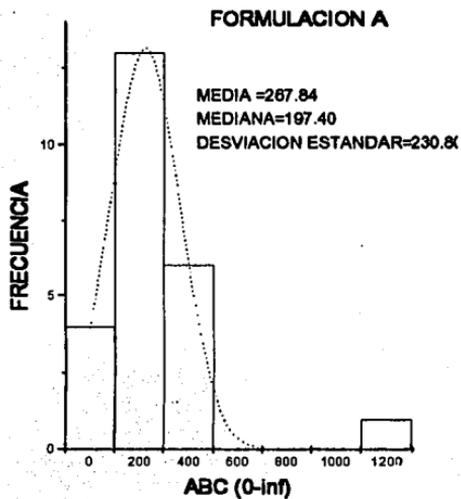
Gráfica de distribución de frecuencias para  $ABC_0^f$   
para la formulación B (innovador)



**FIGURA 15**

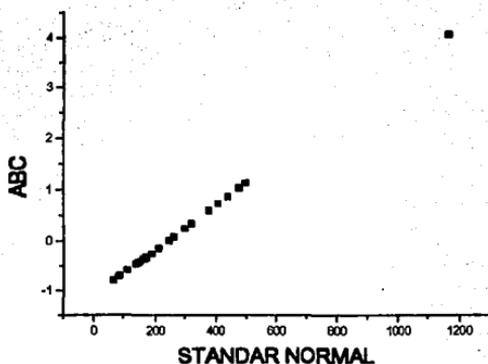
Gráfica normal representativa de la distribución de los datos para la formulación B (innovador).

ABC /  
0.



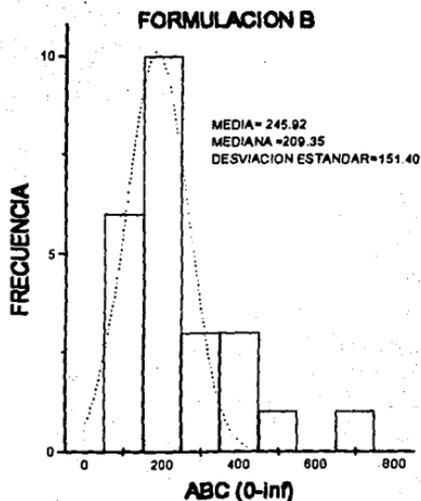
**FIGURA 16**

Gráfica de distribución de frecuencias para  $ABC \begin{matrix} \infty \\ 0 \end{matrix}$   
 para la formulación A (prueba)

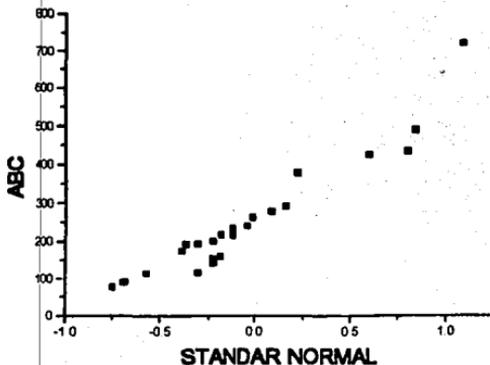


**FIGURA 17**  
Gráfica normal representativa de la distribución de los datos para la  
formulación A (prueba).

$$ABC \begin{matrix} \infty \\ 0 \end{matrix}$$

**FIGURA 18**

Gráfica de distribución de frecuencias para  $ABC \begin{matrix} \infty \\ 0 \end{matrix}$   
para la formulación B (innovador)



**FIGURA 19**

Gráfica normal representativa de la distribución de los datos para la formulación B (innovador)

$$ABC \begin{matrix} \infty \\ 0 \end{matrix}$$

TABLA 4.10

Resumen de los principales parámetros farmacocinéticos para las dos formulaciones y dos períodos

PARAMETRO FARMACOCINETICO	FORMULACION A	FORMULACION B
$ABC_0^1$ (ng.h/mL)	244.3181 +/- 225.3440	218.2813 +/- 145.2819
$ABC_0^\infty$ (ng.h/mL)	267.8582 +/- 230.8247	245.9326 +/- 151.4005
Cp max (ng / mL)	59.2917 +/- 39.1810	52.3542 +/- 24.2697
t <sub>max</sub> (h)	1.2500 +/- 0.3612	1.3542 +/- 0.5209
ke (h <sup>-1</sup> )	0.228 +/- 0.125	0.273 +/- 0.073
t <sub>1/2</sub> (h)	2.8163 +/- 0.8786	2.8932 +/- 1.0678

TABLA 4.11

Principales pruebas estadísticas aplicadas al parámetro farmacocinético de  $ABC_0^f$ , para evaluar la bioequivalencia  
 Datos Crudos

FUENTE DE VARIACION	SS	G.L.	F	Prob
Secuencia	33987.62	1	3.56	0.0724
Sujeto (secuencia)	1380798.50	22	6.58	0.0001
Período	28697.70	1	3.00	0.0969
Fórmula	8135.03	1	0.85	0.3658

Formulación de Referencia B -

#### Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
C.L. 80%	= ( 94.8578, 128.9985)	( 76.6880, 123.3120)
C.L. 90%	= ( 89.7407, 134.1156)	( 70.8323 , 129.1677)
C.L. 95%	= ( 85.1311 , 138.7552)	( 65.7706, 134.2294)

#### Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	= 0.1505
Potencia	= 0.3028

TABLA 4.12

Principales pruebas estadísticas aplicadas al parámetro farmacocinético de  $ABC_0^\infty$ , para evaluar la bioequivalencia

*Datos Crudos*

FUENTE DE VARIACION	SS	G.L.	F	Prob
Secuencia	36633.93	1	3.5892	0.0714
Sujeto (secuencia)	1451169.9	22	6.4626	0.0001
Período	40296.09	1	3.9480	0.0595
Fórmula	5768.77	1	0.5652	0.4601

Formulación de Referencia B

#### Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
C.L: 80%	= ( 93.2448, 124.5857 )	( 80.3504, 119.6496 )
C.L.90%	= ( 88.5474 , 129.2831 )	( 75.0761 , 124.9239 )
C.L. 95%	= ( 84.3159 , 133.5147 )	( 70.4783, 129.5217 )

#### Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value = 0.0827  
Potencia = 0.3515

TABLA 4.13

Principales pruebas estadísticas aplicadas al parámetro farmacocinético de  $C_{p\max}$  para evaluar la bioequivalencia  
**Datos Crudos**

FUENTE DE VARIACION	SS	G.L.	F	Prob
Secuencia	699.98	1	2.1819	0.1538
Sujeto (secuencia)	39128.00	22	5.5438	0.0001
Período	1969.92	1	6.1404	0.0214
Fórmula	577.55	1	1.8002	0.1934

Formulación de Referencia B

#### Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
C.L. 80%	= ( 100.2005, 126.3016)	( 78.2393, 121.7607)
C.L. 90%	= ( 96.2885, 130.2137)	( 73.6823, 126.3177)
C.L. 95%	= ( 92.7644, 133.7378)	( 69.7782, 130.2218)

#### Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	= 0.1220
Potencia	= 0.4808

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

TABLA 4.14

Principales pruebas estadísticas aplicadas al parámetro farmacocinético de  $t_{max}$  para evaluar la bioequivalencia  
*Datos Crudos*

FUENTE DE VARIACION	SS	G.L.	F	Prob
Secuencia	0.0469	1	0.4361	0.5159
Sujeto (secuencia)	5.9480	22	2.5154	0.0177
Período	0.8802	1	8.1894	0.0091
Fórmula	0.1302	1	1.2115	0.2829

Formulación de Referencia B

#### Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
C.L. 80%	= ( 83.0725, 101.5429)	( 86.2366 , 113.7634)
C.L. 90%	= ( 80.3041, 104.3113)	( 83.0334 , 116.9666)
C.L. 95%	= ( 77.8103, 106.8051)	( 80.2794, 119.7206)

#### Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	= 0.0460
Potencia	= 0.7803

TABLA 4.15

Principales pruebas estadísticas aplicadas al parámetro farmacocinético de ABC<sub>0</sub><sup>I</sup> para evaluar la bioequivalencia

*Datos Transformados*

FUENTE DE VARIACION	SS	G.L.	F	Prob
Secuencia	0.3616	1	2.4753	0.1299
Sujeto (secuencia)	18.8601	22	5.8681	0.0001
Período	0.7856	1	5.3778	0.0301
Fórmula	0.0000	1	0.0004	0.9835

Formulación de Referencia B

#### Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
C.L. 80%	= ( 86.6319, 115.9633)	( 86.4279 , 114.5721)
C.L. 90%	= ( 82.9271, 121.1440)	( 80.9827 , 119.0173)
C.L. 95%	= ( 79.7256, 126.0088)	( 76.8338, 123.1662)

#### Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	= 0.0023
Potencia	= 0.4797

TABLA 4.16

Principales pruebas estadísticas aplicadas al parámetro farmacocinético de  $ABC \frac{\infty}{0}$ , para evaluar la bioequivalencia  
 Datos Transformados

FUENTE DE VARIACION	SS	G.L.	F	Prob
Secuencia	0.3710984	1	3.4523	0.0766
Sujeto (secuencia)	15.496209	22	6.5527	0.0001
Período	0.7867855	1	7.3193	0.0129
Fórmula	0.0000705	1	0.0007	0.9798

Formulación de Referencia B

#### Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
C.L. 80%	= ( 88.0301, 113.0482)	( 87.5404 , 112, 4596)
C.L. 90%	= ( 84.7909 , 117.3669)	( 83.7934 , 116.2066)
C.L. 95%	= ( 81.9751, 121.3983)	( 80.3489, 119.6511)

#### Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	= 0.0015
Potencia	= 0.6103

TABLA 4.17

Principales pruebas estadísticas aplicadas al parámetro farmacocinético de  $C_{p \text{ max}}$  para evaluar la bioequivalencia  
*Datos Transformados*

FUENTE DE VARIACION	SS	G.L.	F	Prob
Secuencia	0.089545	1	1.0760	0.3109
Sujeto (secuencia)	10.419888	22	5.6914	0.0001
Período	0.9594916	1	11.5297	0.0026
Fórmula	0.0322549	1	0.3876	0.5400

Formulación de Referencia B

#### Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
C.L. 80%	= ( 94.3463, 117.5729)	( 86.4015 , 113.5985)
C.L.90%	= ( 91.2849 121.5159)	( 82.2167 , 117.7833)
C.L. 95%	= ( 88.6122, 125.1810)	( 78.38.86, 121,6114)

#### Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	= 0.0242
Potencia	= 0.7244

TABLA 4.18

Principales pruebas estadísticas aplicadas al parámetro farmacocinético de  $t_{max}$  para evaluar la bioequivalencia.  
**Datos Transformados**

FUENTE DE VARIACION	SS	G.L.	F	Prob
Secuencia	0.10774 83	1	2.3123	0.1426
Sujeto (secuencia)	3.87057 55	22	3.7756	0.0014
Periodo	0.0388 348	1	8.3340	0.0086
Fórmula	0.03571 57	1	0.7665	0.3908

Formulación de Referencia B

#### Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
C.L: 80%	= ( 87.2057, 102.8179)	( 69.5319 , 110.4681)
C.L.90%	= ( 84.7909 , 117.3669)	( 83.7934 , 116.2066)
C.L. 95%	= ( 83.2085 , 107.7571)	( 84.9386,, 115.0614)

#### Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	= 0.0064
Potencia	= 0.9269

TABLA 4.19

Resumen de las principales pruebas estadísticas aplicadas para evaluar la Bioequivalencia de las dos formulaciones

PARA-METRO	Punto estimado <i>(prueba)</i> / <i>preferencia</i>	Intervalo de Confianza Clásico %	Intervalo de Westlake %	Regla de Decisión de Bioequivalencia
$ABC \frac{\infty}{0}$	108.91	(84.79-117.36)	(83.79-116.21)	Se acepta
$ABC \frac{1}{0}$	111.92	(82.93-121.14)	(80.98-119.02)	Se acepta
Cp máx	105.32%	(91.28-121.52)	(82.22-117.78)	Se acepta

#### **4.6 Resultados Farmacodinámicos**

En la tabla 4.20 y en las figuras 20 y 21 se resumen los valores promedio para el pulso y la presión sanguínea de los 24 voluntarios, a los cuales se les administró las dos diferentes formulaciones **A** y **B**.

#### **4.7 Reacciones Adversas**

En tres de los voluntarios se observaron reacciones adversas.

Dos voluntarios (5 y 13) presentaron mareo moderado, con una duración de una y dos horas, respectivamente. Ambos se mantuvieron en observación sin presentar otros síntomas y los dos recibieron la formulación **A**.

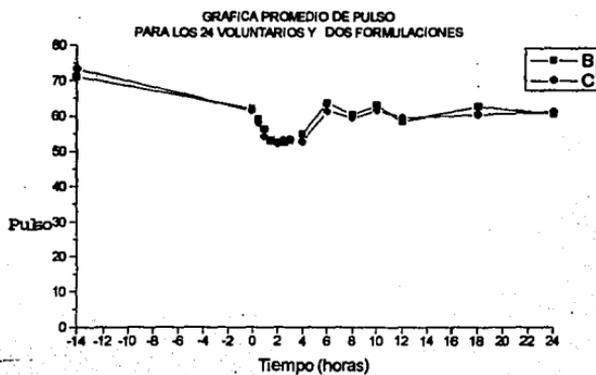
Otro voluntario (número 9), quien recibió la formulación **B** experimentó un ligero dolor de cabeza con duración de 2 horas.

Los tres eventos fueron relacionados a la administración del medicamento.

TABLA 4.20

Valores promedio para pulso y presión arterial de los 24 voluntarios sanos después de la administración del producto A y del producto B

Tiempo de Muestreo	Pulso (Pulsaciones por minuto)		Presión sanguínea (Sistólica)		Presión sanguínea (Diastólica)	
	Producto A	Producto B	Producto A	Producto B	Producto A	Producto B
-14	71.08	73.25	116.75	116.50	75.08	76.75
0	61.91	61.45	106.25	103.45	72.04	71.91
0.5	59.12	58.12	103.45	102.41	73.95	72.20
1	56.29	54.08	98.08	98.00	70.41	69.58
1.5	53.04	52.87	99.45	96.54	71.16	70.75
2	52.33	52.04	97.00	94.83	71.66	69.00
2.5	52.25	53.00	97.08	93.50	71.75	68.75
3	53.04	53.12	95.16	93.50	68.58	68.00
4	54.83	52.62	97.66	95.50	70.33	68.58
6	63.54	61.25	99.33	97.33	66.58	65.95
8	60.20	59.33	104.58	102.41	67.95	68.75
10	62.95	61.45	104.91	102.66	68.58	66.58
12	58.29	59.50	105.75	104.91	70.00	69.50
18	62.58	60.33	104.33	103.16	69.33	68.08
24	60.41	60.91	104.50	105.08	69.16	67.58

**FIGURA 20**

Gráfica promedio para pulso de los 24 voluntarios durante el estudio de Bioequivalencia

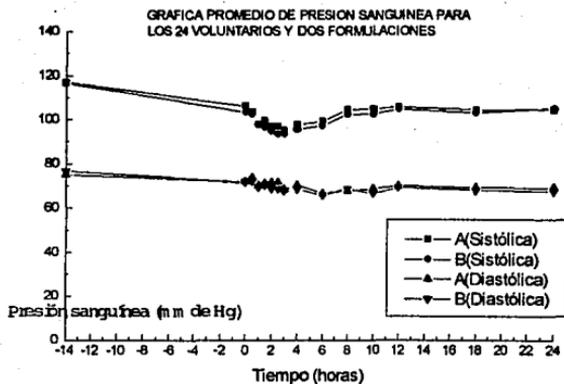


FIGURA 21

Gráfica promedio para presión sanguínea (sistólica y diastólica) en los 24 voluntarios durante el estudio de Bioequivalencia

**C A P I T U L O V**  
**DISCUSION DE LOS RESULTADOS**

## **5.1 Productos Estudiados**

### **5.1.1. Control de Calidad.**

Las dos formulaciones empleadas en el estudio de Bioequivalencia, **Formulación A** (prueba) y **Formulación B** (referencia o innovador), demostraron cumplir con los controles de calidad requeridos por las normas oficiales vigentes<sup>(12, 33)</sup>, lo cual se puede observar en la **tabla 4.1** de la sección correspondiente.

### **5.1.2 Disolución.**

Siendo la prueba de disolución uno de los parámetros "in vitro" considerados como de gran importancia evaluatoria y hasta cierto punto predictiva<sup>(29)</sup> del comportamiento de formas farmacéuticas orales estudiadas "in vivo", se debe tener un especial cuidado en los resultados obtenidos previos al estudio de Bioequivalencia. De acuerdo a lo reportado en la **tabla 4.2** se puede observar que a los cinco minutos se presentó una mayor desviación estándar relativa en los resultados, así como un mayor porcentaje disuelto de tartrato de metoprolol de la **Formulación A** con respecto a la **B** por lo que para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas se realizó el análisis de la prueba de  $t$  - student para dos poblaciones de acuerdo a lo sugerido por Mauger<sup>(35)</sup>, a los 5 y 45 minutos respectivamente. En la **tabla 5.1** se reportan los resultados, obteniéndose que las  $t_{cal}$  son menores a las  $t_{tab}$  para un  $\alpha=0.025$  por lo tanto tales diferencias no son significativas y no existen diferencias en la cantidad total disuelta del fármaco para los productos estudiados. En el caso de ambos productos no fue posible determinar la cinética de disolución, ni consecuentemente la constante de velocidad de disolución, puesto que se liberó el 100% del principio activo a los 5 minutos de iniciada la prueba.

**TABLA 5.1**

**Resultados de la prueba de t-student para dos muestras, aplicada a los valores de porcentaje disuelto de tartrato de metoprolol a 5 y 45 minutos según el método oficial reportado<sup>(93)</sup>**

Tiempo de disolución	$t_{cal}$	$t_{tab}$ ( $\alpha = 0.025$ y $GL = 10$ )
5 min	0.7483	2.23
45 min	0.1903	2.23

0.7483 < 2.23  
0.1903 < 2.23

## 5.2 Método Analítico

Como ya se mencionó, en el capítulo de Generalidades, existen numerosos métodos analíticos reportados para la cuantificación de metoprolol en plasma y en otros fluidos biológicos, destacando los de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) <sup>(24, 27, 31, 33)</sup> que utilizan detección por fluorescencia. Sin embargo, en algunos de ellos <sup>(24, 27, 31, 33)</sup> el estándar interno propuesto es difícil de adquirir, por lo que se trató en este trabajo de implementar la técnica analítica con uno que no tendrá ese problema, seleccionándose el acebutolol.

El método empleado fue una modificación de otros ya reportados <sup>(6, 7, 8, 9)</sup>. Por lo tanto, antes de la validación del método, se establecieron las mejores condiciones cromatográficas para la cuantificación del metoprolol en plasma por medio de un diseño de experimentos.

### 5.2.1 Optimización del Método.

Como se puede apreciar en las **figuras 7 y 8** se tiene una superficie de respuesta cúbica que corresponde a un diseño factorial de  $2^3$  cuyo modelo empírico es de  $y = \mu + A + B + C + AB + AC + BC + ABC$ . Donde se observa el efecto de los factores (volumen de inyección, velocidad de la fase móvil y potencia de la lámpara del detector de fluorescencia PMT) sobre la variable de respuesta (simetría de las respuestas cromatográficas) tanto para el metoprolol como para el acebutolol (estándar interno).

Para el metoprolol (**figura 7**) el vértice de convergencia (**A+**, **B+**, **C-**) es de 0.6207, el cual corresponde a:

$$\begin{aligned}A^+ &= 20\mu\text{L} \\B^+ &= 1.5 \text{ mL/min} \\C^- &= (\text{PMT } 10)\end{aligned}$$

y para el Acebutolol **figura 8** el valor del vértice de convergencia es de 1.00 con las siguientes condiciones de respuesta:

$$\begin{aligned}A^- &= 10\mu\text{L} \\B^+ &= 1.5 \text{ mL/min} \\C^- &= (\text{PMT } 10)\end{aligned}$$

De acuerdo a lo anterior las condiciones experimentales óptimas encontradas en las superficies de respuesta tanto para el metoprolol como para el acebutolol son de una velocidad de flujo de 1.5 mL/min y de un PMT de 10 y sólo se observa diferencia en la cantidad de volumen de inyección ya que para uno es de 20  $\mu\text{L}$  y para el otro es de 10  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Seleccionándose el de 20  $\mu\text{L}$  como volumen de inyección óptimo ya que es el que corresponde al el metoprolol por ser éste el compuesto de interés.

Así las condiciones seleccionadas para el trabajo experimental son:

Volumen de inyección:	20 µL
Velocidad de Flujo:	1.5 mL/min
Potencia de la lámpara: del detector de fluorescencia.	10 PMT

### 5.2.2 Validación del Método Analítico

En la validación del método analítico, se siguió las recomendaciones establecidas por Karnes y cols. (78) soportado por lo reportado previamente por Brooks y cols. (79) complementandose con los trabajos posteriores de Shah (82) y Karnes (89).

#### 5.2.2.1 Especificidad, límite de detección y límite de cuantificación.

Se estableció como primer parámetro de validación la especificidad del método.

En la figura 9, se observa que no hay interferencias de ninguno de los reactivos, anticoagulantes, **metabolitos**, estándar interno y por supuesto de la **matriz biológica (plasma)** con respecto a las respuestas cromatográficas del metoprolol por lo que se consideró que el método cumplía en este aspecto para ser utilizado en la cuantificación del fármaco y no de otros componentes presentes.

El límite de detección considerado como la cantidad más pequeña del fármaco que el método puede detectar se evaluó por dos métodos diferentes (79, 82). Los resultados obtenidos se reportan en la tabla 4.3, donde se observa un valor de aproximadamente 1 ng/mL para el límite de detección y de 3 ng/mL para el límite de cuantificación.

Con los dos métodos empleados para la determinación tanto del límite de detección como del de cuantificación para el metoprolol en plasma se obtuvieron resultados muy semejantes para el límite de cuantificación (3 ng/ml), pero no tanto para el de detección (1 ng/mL), comprensible por la cantidad tan pequeña de que se trata. Puesto que las concentraciones plasmáticas mínimas reportas<sup>27)</sup> para el fármaco son de aproximadamente 10 ng/mL, se confirmó el límite de cuantificación con réplicas independientes para 3 ng/mL, las cuales tuvieron un coeficiente de variación (%CV) no mayor de 8.5%.

Así se recomienda aplicar ambos métodos para estimar los dos límites (detección y cuantificación) y confirmar el límite de cuantificación por medio de réplicas independientes, evaluando el coeficiente de variación, (% CV).

### **5.2.2.2 Linealidad**

La linealidad del sistema se efectuó evaluando el coeficiente de correlación ( $r$ ), el coeficiente de la determinación ( $r^2$ ), la pendiente ( $m$ ) y la ordenada al origen ( $b$ ) de la curva de regresión (Figura 10), presentando la siguiente ecuación:  $y = 0.0513x + 0.0883$

$$r = 0.9991$$

$$r^2 = 99.84$$

Por lo cual se consideró que el método de cuantificación para metoprolol en plasma presentaba una buena linealidad en un intervalo de concentración de 3 a 200 ng/mL y dadas las concentraciones mínimas plasmáticas esperadas<sup>(3)</sup> era adecuado para ser empleado en el estudio de bioequivalencia.

### **2.2.2.3 Exactitud, precisión y reproducibilidad.**

La exactitud y precisión del método se determinó para variabilidad inter/intra día de las concentraciones plasmáticas en el intervalo de 3-200 ng/mL, evaluándose con el coeficiente de variación. En la tabla 4.4 se puede observar coeficientes de variación menores al 10% por lo que el método se consideró preciso. La exactitud del método se evaluó con el porcentaje de recobro, determinando la cantidad de fármaco recobrado después del proceso de extracción del plasma, encontrándose los valores reportados en la tabla 4.5 siendo el porcentaje de recobro en plasma de 99.11%. El método de acuerdo a estos dos criterios de validación se estableció como preciso y exacto.

Los resultados de la reproducibilidad del método se reportan en la tabla 4.6 y el análisis de varianza se presentan en la tabla 5.2 en la cual se observa que no hay valor estadísticamente significativo para las fuentes de variación del día o el analista por lo que el método se considerará como reproducible para ser empleado en el estudio de cuantificación de metoprolol en plasma.

### **5.2.2.4 Estabilidad**

La estabilidad del fármaco en plasma se presenta en las tablas 4.7 y 4.8. Se observa un coeficiente de variación menor al 8% por lo que el método se considerará adecuado para ser empleado en el análisis de muestras plasmáticas conteniendo tartrato de metoprolol, guardadas en congelamiento durante un mes y en muestras reconstituidas en fase móvil, almacenadas en refrigeración, no más de 48 horas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que el método es específico, lineal en un intervalo de concentración de 3-200 ng/mL, exacto, preciso, reproducible y estable por lo que puede ser aplicable para la determinación del metoprolol en las muestras plasmáticas del estudio de Bioequivalencia.

**TABLA 5.2**

**ANOVA para la reproducibilidad del método analítico, dos analistas en dos diferentes días para un mismo nivel de concentración.**

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L. (grados de libertad)	CUADRADO MEDIO	F	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
Efectos Principales	131.86	2	65.93	2.46	0.15
Analista	1.64	1	1.64	0.07	0.60
Día	130.02	1	130.02	4.85	0.06
Interacciones	29.08	1	29.08	1.08	0.33
Error	214.66	8	26.83	-	
Total	375.60	11		-	

**F de tablas.**

$F_{\text{tablas}} = (0.05, 2, 8) = 4.4590$

$F_{\text{tablas}} = (0.05, 1, 8) = 5.1177$

**F calculada.**

2.46                      2.46 < 4.4590

0.07                      0.07 < 5.1177

4.85                      4.85 < 5.1177

1.08                      1.08 < 5.1177

### 5.2.3. ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA

#### 5.2.3.1 Diseño Estadístico

En el estudio de bioequivalencia participarán 24 voluntarios clínicamente sanos, empleando un diseño estadístico cruzado de 2 X 2, el cual es recomendado por la Guía Oficial para este producto (41).

El modelo establecido para este diseño (14) fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F(j, k) + C(j-1, k) + e_{ijk}$$

donde:

$I(\text{sujeto})$	= 1, 2, ..... $n_k$
$j(\text{período})$	= 1, 2
$k(\text{secuencia})$	= 1, 2
$F(j, k)$	= es el efecto fijo para la formulación administrada al período $j$ y secuencia $k$ .
$C(j-1, k)$	= es el efecto residual de acarreamiento en la $k$ secuencia que se administrada en el $(j-1)$ período.
$e_{ijk}$	= el error aleatorizado (dentro del sujeto) en la observación $Y_{ijk}$ .

Este diseño es recomendado por la FDA porque trata de eliminar la variabilidad inter-sujeto en la comparación de la biodisponibilidad entre productos ya que:

- A) Cada sujeto puede servir como su propio control.
- B) El establecimiento de la bioequivalencia esta basado en la variabilidad intra-sujeto.
- C) Se requieren pocos sujetos para dar un grado deseado de exactitud y potencia comparados con otros diseños tales como el diseño paralelo.

Para este tipo de estudios se asume que:

- i) No hay efecto de período
- ii) No hay efecto de acarreamiento

Sin embargo, se aconseja<sup>(14)</sup> realizar estimaciones preliminares basadas en una prueba de t-student para dos muestras<sup>(97)</sup> y comprobar estadísticamente de que estos factores no están presentes, ya que de lo contrario, la inferencia de la bioequivalencia de los dos productos se vería afectada y en ese caso se tendría que aplicar un diseño de orden superior como el recomendado por Chow y Col<sup>(80)</sup>, conocido como diseño de Balaam.

En la **tabla 5.3** se resumen los resultados para la prueba de t de dos muestras, aplicada a los datos de  $ABC \begin{matrix} t \\ 0 \end{matrix}$  en los que se observa que los valores determinados para la t calculada son menores que los de t de tablas por lo que se puede decir que en los datos del estudio no hay efecto de:

Fármaco (directo).  
Acarreamiento.  
Período

Por lo tanto se puede seguir con la evaluación estadística de los parámetros farmacocinéticos y realizar la estimación de la bioequivalencia.

Por último en la **tabla 5.4** se presentan los resultados del análisis de varianza para los mismos datos, encontrándose un valor estadísticamente significativo para la variabilidad interindividual ya que la F calculada es mayor que la F de tablas.

**TABLA 5.3**

Inferencia estadística para efectos fijos

Efecto	Intervalo	t	p
Acarreamiento	(-197.20, 402.90)	0.7390	0.4592
Fármaco	(-104.81, 52.98)	-0.6812	0.4966
Período	(-30.28, 127.51)	1.28	0.2060

t<sub>tablas</sub> :

t (0.025, 22) = 2.074

t<sub>cálculada</sub>

0.7390 < 2.074

-0.6812 < 2.074

1.2800 < 2.074

**TABLA 5.4**

**ANOVA para las principales fuentes de variación en un diseño cruzado de 2 x 2.**

Fuente de variación	G.L. (Grados de Libertad)	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F
<i>Entre-sujetos</i>				
Acarreamiento	1	33606.32	33606.32	0.5346
Residuales (variabilidad interindividual)	22	1382955.75	62861.63	<b>6.6231</b>
<i>Dentro-sujetos</i>				
Fármaco	1	8055.94	8055.94	0.8359
Período	1	28355.19	28355.19	2.9424
Residuales	22	212006.83	9636.67	
Total	47			

$F_{\text{tablas}}(0.05, 22, 22) = 2.12$   
 $6.5231 > 2.12$  sí hay variabilidad interindividual

$F_{\text{tablas}}(0.05, 1, 22) = 4.3009$   
 $2.9424 < 4.3009$  no hay efecto de periodo

### 5.2.3.2 Distribución de los datos

Una consideración muy importante para la adecuada estimación de la bioequivalencia entre dos productos es determinar si los datos primarios (ABC) siguen una distribución normal. Lo anterior se realizó, generalmente, por medio de las gráficas de probabilidad normal de los datos, relacionando los valores de la variable normalizada con los de  $ABC \frac{\infty}{0}$  ó  $ABC \frac{f}{0}$ . Cuando existe una distribución normal se obtiene una línea recta, con una media y una mediana iguales <sup>(22)</sup>.

En las figuras 13, 15, 17, 19, se presentan las gráficas de probabilidad normal.

Se observa para la **formulación A** (producto de prueba, figuras 13 y 15) el comportamiento lineal esperado, mientras que para la **formulación B** (producto de referencia, figura 17 y 19) existe una desviación de los datos al incrementarse el valor de ABC, lo anterior indica que puede haber un sesgo de la distribución hacia la derecha. En las figuras 14 y 18 correspondientes a la distribución de los datos de la formulación B se confirma este sesgo. Esta característica se presenta cuando algunos de los voluntarios tienen valores muy grandes de ABC, debido a la altura, peso corporal o polimorfismo genético de los individuos <sup>(22)</sup>, es decir a la variabilidad interindividual, la cual ya ha sido detectada por medio del análisis de varianza presentada en la tabla 5.4.

También se ha señalado anteriormente <sup>(22)</sup> que la distribución de los parámetros farmacocinéticos al seguir una distribución normal deben tener una media y una mediana iguales, lo cual tampoco ocurre, ya que la media ( figuras 12, 14, 16, 18) es en todos los casos mayor que la mediana, confirmando nuevamente el sesgo hacia la derecha de la distribución. En este caso una transformación logarítmica de los parámetros farmacocinéticos es recomendada <sup>(83)</sup> y entonces se asume que la distribución normal de los datos transformados da un intervalo de confianza exacto para la determinación de  $\mu$  por (Mandallaz and Mau) <sup>(99)</sup>. Este modelo de transformación de los datos o modelo multiplicativo es aceptado ampliamente por la FDA <sup>(17, 22, 40,)</sup>.

**5.2.3.4. Estimación de la bioequivalencia entre dos productos.**

Una vez concluidos los análisis preliminares de los datos (ABC), se debe probar estadísticamente que las dos formulaciones (A y B) son bioequivalentes. Para realizarlo existen varios métodos estadísticos :

Intervalos de confianza  
Intervalos de hipótesis  
Bayesiano  
No paramétrico

Encontrándose desde el punto de vista regulatorio <sup>(80)</sup> que los más aceptados son los que se basan en:

a) Intervalo de hipótesis.

Donde se realiza una prueba de t- student de dos colas, como el reportado por Schuirmann y cols.<sup>(85)</sup> ó la de Anderson y Hauck <sup>(86)</sup> donde la bioequivalencia se acepta cuando se tiene un valor muy pequeño para p ( $p < 0.05$ ).

En estos métodos la hipótesis para asegurar la bioequivalencia se puede expresar como:

$\theta_1$  y  $\theta_2$  = los límites de la bioequivalencia  
 $\theta$  = es el parámetro de interés ( $\mu_{ABC_T} / \mu_{ABC_R}$ ).

$H_0: \theta < \theta_1$       ó       $\theta \geq \theta_2$       vs       $H_a: \theta_1 < \theta < \theta_2$

Donde se observa mejor que la hipótesis de bioequivalencia se puede expresar como un intervalo.

b) Intervalos de confianza.

El más conocido es el de Westlake<sup>(84)</sup> y cols. quienes proponen establecer un intervalo de confianza para  $\mu_T / \mu_R$  y compararlo con un intervalo de 80% a 120 %.

Por lo tanto para comprobar la bioequivalencia de los dos productos probados en este estudio, se compararon los principales parámetros farmacocinéticos de:

$$ABC_0^{\infty}, ABC_0^f, C_{pmax}, t_{max}$$

utilizando el análisis de varianza, los intervalos de confianza clásicos, los de Westlake y la prueba de Anderson Hauck aplicadas por el programa computacional BIOPAK<sup>®</sup>.

Así tenemos que en las tablas 4.11, 4.12, 4.13, y 4.14 que corresponden a los datos crudos de:

$$ABC_0^{\infty}, ABC_0^f, C_{pmax}, t_{max}$$

en los intervalos clásicos y de Westlake, los resultados no se encuentran en ninguno de los casos dentro de los límites marcados de 80 a 120. Para la prueba de Anderson-Hauck donde se establece una  $p < 0.05$  para la aceptación de la bioequivalencia, los cuatro valores se encuentran fuera de especificaciones. Esto se debe a los datos crudos no siguen una distribución normal. Al aplicar la transformación logarítmica se obtienen los datos reportados en las tablas 4.15, 4.16, 4.17 y 4.18 se encuentra que para un intervalo de confianza al 90% los cuatro parámetros farmacocinéticos se encuentran dentro de límites y cumplen para una  $p < 0.05$  con la prueba de Anderson-Hauck.

Se encuentra reportado en la literatura<sup>(4)</sup> que para una administración de dosis única de 100 mg de tartrato de metoprolol la concentración plasmática promedio máxima es de 130 ng/mL a un tiempo ( $t_{max}$ ) de 2.5 horas<sup>(4)</sup> y su vida media promedio ( $t_{1/2}$ ) de 3 horas. En la tabla 4.10 se observa que para  $C_{pmax}$ ,  $t_{1/2}$  los resultados concuerdan con lo reportado en la literatura y para el  $t_{max}$  se encuentra un valor menor de aproximadamente de una hora para las dos formulaciones.

En la tabla 5.5 se resumen los criterios internacionales de aceptación para la bioequivalencia de dos productos que al confrontar con lo reportado en la tabla 4. 19 se concluye que:

**Las dos formulaciones son bioequivalentes.**

**TABLA 5.5**

Requisitos estadísticos de la Comunidad Europea (E. C.), Estados Unidos de Norteamérica (U.S) y Cánada (Can) para la aceptación de la bioequivalencia.

<b>VARIABLE</b>	<b>E.C.</b>	<b>U.S.</b>	<b>CAN</b>
ABC	Log 90% C.I. 80-125	Datos crudos prueba de t pareada* 80-120%	Log 90%C.I. 80-125%
Cp max	Log 90% C. I.	Como ABC	Media Geométrica ** 80-125%
T max	Acuerdo al fármaco ***	Como ABC y Cmax	No se aplica

\* Una prueba de t pareada es equivalente de un intervalo de confianza al 90 %

\*\* Con un intervalo de confianza de 90% bajo la consideración de armonizar con la comunidad europea.

\*\*\*El criterio para tmax no es tan rígidamente aplicado.

#### **5.2.4. RESULTADOS FARMACODINAMICOS Y REACCIONES ADVERSAS**

En los resultados presentados en la tabla 4.20 y en las figuras 20 y 21 se observa un decremento de los signos vitales de pulso y presión sanguínea, esperado por el efecto hipotensor del tartrato de metoprolol, sin embargo comparados estadísticamente los resultados para ambas formulaciones no se encontraron diferencias significativas y esto se puede comprobar en los resultados enlistados en la tabla 5.6.

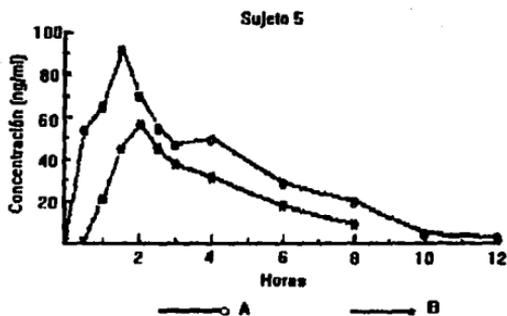
En cuanto a las reacciones adversas ocurridas durante el estudio, se observa para los voluntarios que las presentaron (5, 9 y 13) unas gráficas individuales del tipo de las figuras 18, 19 y 20.

El voluntario 5 que tuvo mareo moderado al administrarsele la formulación A tiene valores de ABC y  $C_{p_{max}}$ , efectivamente más grandes para ésta formulación que para la B. Sin embargo, el voluntario 13 presentó valores más grandes de ABC y  $C_{p_{max}}$  para la formulación B que para la A, lo que no coincide con los síntomas presentados por tal voluntario. Para el voluntario 9 quien presentó un dolor de cabeza ligero al administrarsele la formulación B, los valores de ABC y  $C_p$  máx fueron menores para el caso de B con respecto a A.

**TABLA 5.6**

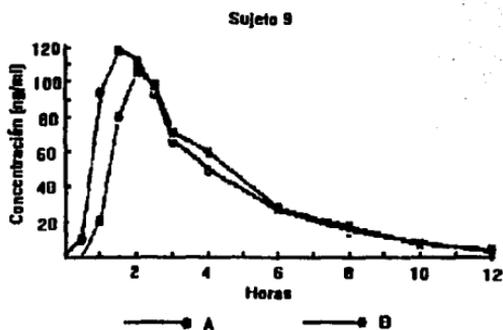
Inferencia estadística para los resultados farmacodinámicos

EFEECTO	FORMULA- CIÓN	t	P
Pulsaciones/min	A B	-0.2861	0.7769 Para $\alpha=0.05$ las dos medias no son estadísticamente significativas
Presión sistólica	A B	-0.7752	0.4447 Para $\alpha=0.05$ las dos medias no son estadísticamente significativas
Presión diastólica	A B	-1.08	0.2882 Para $\alpha=0.05$ las dos medias no son estadísticamente significativas



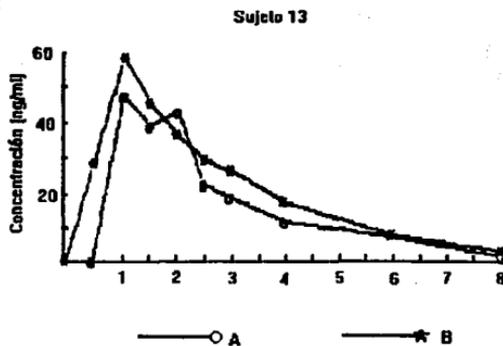
**FIGURA 22**

Gráfica individual de concentración plasmática contra tiempo para el voluntario 5.



**FIGURA 23**

Gráfica individual de concentración plasmática contra tiempo para el voluntario 9.



**FIGURA 24**

Gráfica individual de concentración plasmática contra tiempo para el voluntario 13.

# **C A P I T U L O   V I**

## **CONCLUSIONES**

## **CONCLUSIONES:**

Las formas farmacéuticas empleadas en el estudio de Bioequivalencia cumplieron satisfactoriamente las normas de calidad establecidas oficialmente.

En la prueba de disolución no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos productos estudiados.

El método para cuantificar tartrato de metoprolol en plasma, por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), fue específico, lineal, sensible, repetible y reproducible. Requiere de un volumen pequeño de muestra (1 mL), un estándar interno fácil de adquirir (acebutolol) y un tiempo de corrida de aproximadamente 10 minutos. Por lo tanto reúne características adecuadas para ser empleado en el análisis de muestras plasmáticas en un estudio de Bioequivalencia y/o farmacocinético.

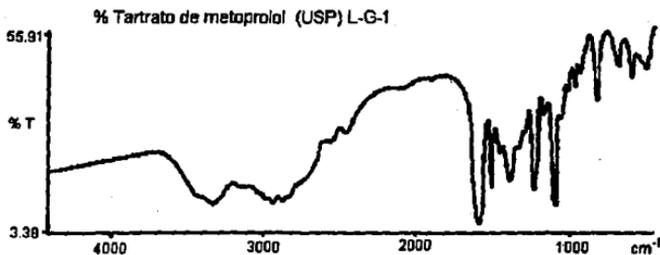
El método diferencia adecuadamente al principal metabolito del metoprolol, el  $\alpha$ -hidroximetoprolol. Lo cual puede ser utilizado, previa validación del método de cuantificación del metabolito, para emplearlo en la clasificación de hidroxiladores lentos o rápidos en pacientes a los cuales se les administrará este fármaco y lograr una dosificación individual, en los casos en que se requiera.

Los dos productos estudiados ( la formulación de prueba y la formulación de referencia ) resultaron bioequivalentes de acuerdo a las normas de regulación vigentes.

**C A P I T U L O   V I I**  
**A P E N D I C E S**

## APENDICE 1

Espectro al infrarojo del tartrato de metoprolol en una dispersión de bromuro de potasio.



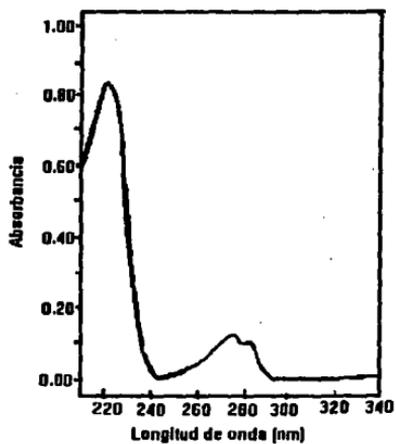
## APENDICE 2

Principales longitudes de máxima absorción del tartrato de metoprolol en varios disolventes<sup>(18)</sup>.

Disolvente	Max (nm)	$\epsilon \times 10^{-3}$
HCl 0.1N	221	19.5
	274	2.83
	281(hombro)	2.31
Agua	223	23.4
	274	3.60
	280	2.94
NaOH 0.01N	223	24
	274	3.66
	280 (hombro)	3.00
Metanol	223	21.5
	276	3.11
	282	2.62
Cloroformo	277	3.36
	283	2.86

### APENDICE 3

Espectro característico al UV del tartrato de metoprolol en una solución de HCl 0.1 N <sup>(12)</sup>



## APENDICE 4

### Cardioselectividad de los $\beta$ -bloqueadores

Fármaco	Cardioselectividad	Propiedades Estabilizantes de la membrana	Propiedades anti-bloqueantes	Actividad paracristalino agonista
ACEBUTOL	+	+	-	+
ALPRENOLOL	-	+	-	+
ATENOLOL	+	-	-	-
BETAXOLOL	+	-	-	-
BEVANTOLOL	+	?	-	?
BISOPROLOL	+	-	-	-
CARTEOLOL	-	-	-	-
ESMOLOL	+	-	-	-
FLESTOLOL	-	?	-	?
LABETALOL	-	+	+	+
LEVOBUNOLOL	-	-	-	-
METOPROLOL	+	-	-	-
NADOLOL	-	-	-	-
OXPRENOLOL	-	+	-	+
PENBUTOLOL	-	-	-	-
PINDOLOL	-	+	-	+
PROPANOLOL	-	+	-	+
SOTALOL	-	-	-	-
TIMOLOL	-	-	-	-

## APENDICE 5

Parámetros farmacocinéticos <sup>(43)</sup> de los principales  
beta bloqueadores

FARMACO	% B	t <sub>1/2</sub> (horas)	S	Vd (L/kg)	% P	% E	M
PROPANOLOL	30	2-3 aumenta en cirrosis	3.65	3.9	93	0.5	Si
ACEBUTOLOL	40	3-4	1.97	1.6	26	30-40	Si
ATENOLOL	40	6-7 aumenta en uremia	0.23	0.7	5	85*	No
CARTEOLOL	85	6	?	?	23-30	60-70*	Si
ESMOLOL	-	0.15	?	3.4	85	2	Si
LABETALOL	25	6-8	?	9.4	50	5	No
METOPROLOL	50	3-7 aumenta en hidroxila- dores lentos	2.16	5.6	12	5	No
NADOLOL	30	20-24 aumenta en uremia	0.71	2.1	30		No
PEMBUTOLOL	≈ 100	28	?	?	50-70	<10	?
PINDOLOL	95	3-4	1.75	2.0	40	35-40	No
TIMOLOL	50	4	2.10	1.8	<10	15	no

\* Se requiere de ajuste de dosis

Donde:

- B = Biodisponibilidad
- t<sub>1/2</sub> = tiempo de vida media
- S = Solubilidad en lípidos expresada en log de coeficiente de partición de Octanol / Agua
- Vd = Volumen de distribución
- P = Enlace a proteínas
- E = Excreción urinaria de fármaco inalterado
- M = Metabolitos activos

## APENDICE 6

### Carta de Aceptación

<b>Voluntario No:</b> _____	
<b>Nombre del estudio :</b> "Biodisponibilidad/Bioequivalencia de tabletas de tartrato de Metoprolol"	
<b>Nombre del voluntario:</b> _____	
<b>Edad</b> _____	<b>Sexo</b> _____
<b>Domicilio:</b> _____ _____ _____	
<b>Teléfono:</b> _____	
<p>Por medio de la presente, doy mi consentimiento pleno y sin coacción de ninguna especie para participar en el estudio de tabletas de metoprolol. Asimismo manifiesto que he sido informado de las características del estudio así como de las consecuencias del mismo y que he entendido claramente, los objetivos y la forma en que participaré en él. También se me han explicado las reglas que me veo comprometido a seguir y de los cuidados a los que tengo derecho durante el desarrollo de dicho estudio.</p>	
<b>ATENTAMENTE:</b>	
_____ (Nombre y firma)	
<b>Lugar:</b> _____	<b>Fecha:</b> _____
<b>Responsable Médico:</b> _____	<b>Fecha:</b> _____

## **APENDICE 7**

### **Protocolo del estudio de bioequivalencia**

#### **Decidir el diseño experimental**

Seleccionar 24 voluntarios clínicamente sanos, informarles de los objetivos del estudio y solicitarles firmen una carta de consentimiento (Apéndice 6, después de haberles practicado los exámenes médicos correspondientes.

#### **Asignarlos a las secuencias correspondientes**

Informar a los voluntarios que no deberán tomar ningún medicamento ni alcohol siete días antes y durante el tiempo que dure el estudio, ni estar sometido a condiciones de stress o ejercicio físico violento.

Deberán estar bajo vigilancia médica antes, durante y al término del estudio.

Deberán permanecer en ayunas una noche antes y su dieta alimenticia será vigilada y controlada.

Cada voluntario tomará los productos con un intervalo de una semana entre una dosificación y otra.

Tanto al producto innovador como al de prueba se le habrán realizado los controles farmacéuticos de calidad, correspondientes.

El día del estudio se le dará a cada voluntario una tableta de tartrato de metoprolol (100 mg), la cual ingerirá con ayuda de 150 mL de agua destilada, de acuerdo al diseño experimental.

Se tomarán muestras de 10 mL de sangre en los siguientes tiempos:

0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 horas después de la ingestión de la tableta.

Colocar las muestras en tubos heparinizados y separar el plasma por centrifugación a 2500 rpm. Mantener en refrigeración a  $-15^{\circ}\text{C}$ .

La cuantificación del tartrato de metoprolol se efectuará empleando un método analítico por CLAR con detección fluorométrica.

Con los resultados de las concentraciones plasmáticas a los diferentes tiempos de muestreo se determinarán los parámetros farmacocinéticos  $C_{p\text{max}}$ , ABC.

El análisis de los resultados se realizará por medio del programa computacional BIOPAK<sup>®</sup>

**C A P I T U L O   V I I I**

**BIBLIOGRAFIA**

**BIBLIOGRAFIA:**

- (1) Benfield P., Clissold S.P. and Brogden R.N.  
Drugs 31:376-429 (1986)
- (2) Rutledge D.R. and Garrick C.  
J.Chromatogr. Sci. 27:561-565 (1989)
- (3) Diccionario de Especialidades Farmacéuticas  
Ed. 40 Páginas 1-125  
México 1994
- (4) AHFS DRUG INFORMATION 90  
American Society of Hospital Pharmacists  
Páginas 843-847  
U.S.A. 1990
- (5) Reporte de la O.M.S. Sobre la Estandarización de Métodos  
para una Farmacopea Internacional.  
1989
- (6) Lecaillon J.B., Godbillon J., Abadie F., Gosset G.  
J. Chromatogr. 305:411-417 (1984)
- (7) Neuvonen P.J., Kaila T., Roivas L.  
The Bioavailability of two-blockers preadsorbed onto  
charcoal.  
Departments of Pharmacology and Clinical Pharmacology  
University of Turku, Kiinamylynkatu 10, SF-20520 Turku,  
Finland.  
Trabajo presentado en:  
52nd International Congress of F.I.P.  
Lyon, France 1992
- (8) Horai Y., Ishizaki T., Kusaka M.  
Therap. Drug Monitor. 10(4) :428-433(1988)
- (9) Rosseel M.T., F.M.Belpaire, I.Bekaert and M.G.Bogaert  
J. Pharm. Sci., 71(1): (1982)

- (10) Clarke's Isolation and Identification of Drugs  
2a. Edition pag 779  
The Pharmaceutical Press London : 1986
- (11) The Merck Index  
Eleventh Edition  
pag 6076  
U.S.A. 1990
- (12) USP XXII  
United States Pharmacopeial Convention, Inc U.S.P.  
pags. 887, 888, 1756.
- (13) Klaus Florey  
Analytical Profiles of Drug Substances  
Volumen 12 páginas 325-356  
Academis Press, Inc. USA 1983
- (14) Chow S.C., Liu J.P.  
Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies..  
1a Ed. pag iii  
Marcel Dekker, New York 1992
- (15) Meyer M. C.  
American Pharmacy NS31(8):47-53 (1991)
- (16) International Open Conference on Dissolution, Bioavailability, and  
Bioequivalence.  
June 15-18  
Toronto, Canada 1992
- (17) In Vivo Bioequivalence Guidances  
Pharmacopeial Forum. 19(5):6059-6077 (1993)
- (18) U. Gundert -Remy.  
"European initiatives in standars for harmonization of bioavallability/bioequivalence  
requirements"  
Crommelin DJA, Midha KK eds.  
Proceedings of the 51 st International Congress of Phar-  
maceutical Sciences of FIP, Washington, DC:  
Pags. 263-291.  
Medpharm Scientific Publishers Stuttgart, 1991

- (19) J.M. Atache. "Biofarmacia", 2a. Edición  
Editorial "El Manual Moderno" Pág. 3  
1983
- (20) González M.  
Eur. J. Pharm. Biopharm 40(2):101-102 (1994)
- (21) Bioavailability and Bioequivalence Requirements  
21 CFR parte 320 Ch.(4-1-92 Edition) Páginas 140-159
- (22) Welling Peter G., Tse Francis L.S., Dighe Shrikant V.  
Pharmaceutical Bioequivalence  
Marcel Dekker      Pag 1-9  
New York              1990
- (23) Edison Cid Cárcamo  
Introducción a la Farmacocinética  
Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos  
pag 12  
Washington, D.C.      1982
- (24) Silva O. P., Vera T. V., Julia J. M., Gual G. F.  
Arch. Inst. Cardiol. Mex. 57:423-431, (1987)
- (25) Jonkers R.E., Koopmans R.P., Portier ELS J.G. and Van Boxtel Chris J.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 256:959-966 (1991)
- (26) Horai Y, Taga J, Ishizaki T  
Br. J. Clin. Pharmacol. 29:111-115 (1990)
- (27) Horai Y, Nakano, M., Ishizaki T  
Clin. Pharmacol. Ther. 46:198-207 (1989)
- (28) Rutledge D.R., Steinberg J. and Cardozo L.  
Clin. Pharmacol. Ther. 45:380-386 (1989)

- (29) Lennard, M.S., Silas, J.H., Freestone, S., Ramsay L.E.; Tucker, G.T.; and Woods, H.F.  
N. Eng. J. Med 307:1558-1560 (1982)
- (30) Lennard, M.S., Tucker, G.T., Woods, H.F., Silas, J.H. and Iyun, A.O.  
Br. J. Clin. Pharmacol. 27:613-616 (1989)
- (31) Blackbourn J. and Gardiner F.  
Hosp. Pharm 25:585-588 (Jun) 1990
- (32) Nami, R., Pollavini, G., Panza, F., Burachi, P. and Gennari, C.  
Curr. Ther. Res. 47:166-172 (Jan) (1990)
- (33) Forman, D.E. and Wei, J.Y.  
JAMA 266:2222 (Oct23-30) 1991
- (34) Clark-Turner, N.  
Drugs 38:55-60 (Suppl2) 1989
- (35) Holford N.H.G.  
PharmacoEconomics June 1(6):460 (1992)
- (36) Sandberg, A., Abrahamsson, B. and Sjogren, J.  
Int. J. Pharm. 68:167-177 (Feb 1) (1991)
- (37) Houtzagera, J.J.R., Streurman, O., Regaardh, C. G.  
Br. J. Clin. Pharmacol. 14(1):67-72 (1982)
- (38) Briant, R.H., Dorrington, R.E., Ferry, D.G., Paxton, J.W.  
Eur. J. Clin. Pharmacol 25(3):353-6 (1983)
- (39) Van den Berg, G., Van Steveninck, S., Gubbens Stubbe, J.M., Schoemamaker H.C., De Boer A.G., Cohen A.F.,  
Eur. J. Clin. Pharmacol 39(3):315-316 (1990)

- (40) **USP XXIII**  
United States Pharmacopeial Convention, Inc  
pag 1929
- (41) **GUIDENCE: Metoprolol Tartrate Tablets**  
Division of Bioequivalence in the Office of Generic Drugs.  
Informal Communication under 21 CFR 10.90 (b)(9)  
FDA
- (42) **Goodman y Gilman**  
"Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica"  
7a Ed. Editorial Panamericana pag 153  
Buenos Aires Argentina (1988)
- (43) **Drug Evaluations Annual 1991**  
American Medical Association  
Pag 468  
USA Año 1991
- (44) **Jobin G, Cortot A, Godbillon J., Duval M, Schoeller J.P., Hirtz J., Bernier J.J.**  
Br. J. Clin. Pharmacol. 19(Suppl 2) 97S-105S (1985)
- (45) **Vidon N., Evard D., Godbillon J., Rongier M., Duval M., Schoeller J.P.,  
Bernier J.J., Hirtz J.**  
Br. J. Clin. Pharmacol. 19(Suppl 2) 107S-112S (1985)
- (46) **Godbillon J., Evard D., Vidon N., Duval M.,  
Schoeller J.P., Bernier J.J., Hirtz J.**  
Br. J. Clin. Pharmacol. 19(Suppl 2) 113S-118S (1985)
- (47) **Evard D., Vidon N., Godbillon J., Bovet M., Duval M., Schoeller J.P.,  
Bernier J.J., Hirtz J.**  
Br. J. Clin. Pharmacol. 19(Suppl 2) 119S-125S (1985)
- (48) **Brogden R.N., Heel R.C., Speight T.M., and Avery G.S.**  
Metoprolol: a review of its pharmacological in hypertension.  
Drugs 14:321-348 (1977)

- (49) Evaluations of Drug Interactions  
Shinn and Shrewsbury  
APhA  
Third Edition      Pag.478,461,475,476  
USA                      1985
- (50) Kenneth A. Connors  
A Textbook of Pharmaceutical Analysis  
Second Edition      pag 227-238  
New York              1975
- (51) Gustavii K. and Schill G.  
Acta pharm. suec., 3, 241-258 (1981)
- (52) Borg K.O., Carlsson E., Hoffmann K.J., Jönsson T. E.,  
Thorin H. and Wallin B.  
Acta pharmacol. et toxicol 36(V) 125-135 (1975)
- (53) Gyllenhaal O., Hoffmann K.J.  
J. Chromatogr., 309:317-328(1984)
- (54) Gaudry D., Wantiez D., Richard J. and Metayer J.P.  
J. Chromatogr., 339:404-409(1985)
- (55) Ervik M., Kyllberg-Hanssen K. and Johansson L.  
J. Chromatogr., 381:168-174(1986)
- (56) Maurer H. and Pflieger K.  
J. Chromatogr., 382:147-165(1986)
- (57) Nakagawa T., Shibukawa A., Shimono N.,  
Kawashima T. and Tanaka H.  
J. Chromatogr., 420:297-311(1987)
- (58) Delbeke F.T., Debackere M., Desmet N. and Maertens F.  
J. Chromatogr., 426:194-201(1988)

- (59) Leloux M.S., Jong Ed. J. and Maes R.A.A.  
J. Chromatogr., 486:357-367(1989)
- (60) Gyllenhaal O. and Vessman J.  
J. Chromatogr., 516:415-426(1990)
- (61) Winkler H., Ried W. and Lemmer B.  
J. Chromatogr., 228:223-234(1982)
- (62) Gengo F.M., Ziemniak M.A., Kinkel W.R., and McHugh W.B.  
J. Pharm. Sci., 73(7):961-963 (1984)
- (63) Moncrieff J. and Simpson D.  
J. Chromatogr., 488:498-502(1989)
- (64) Lecaillon J.B., Godbillon J., Abadie F. and Gosset G.  
J. Chromatogr., 305:411-417(1984)
- (65) Lennard M.S.  
J. Chromatogr., 342:199-205(1985)
- (66) Harrison P.M., Tonkin A.M. and McLean A.J.  
J. Chromatogr., 339:429-433(1985)
- (67) Lecaillon J.B., Souppart C., Dubois J.P.,  
Delacroix A.  
Methodol. Surv. Biochem. Anal.  
18 (Bioanal. Drugs Metab.):225-33 (1988)
- (68) Ganansia J., Bianchetti G. and Thénot J. P.  
J. Chromatogr., 421:83-90(1987)
- (69) Jansson S.O. and Johansson M.L.  
J. Chromatogr., 395:495-501 (1987)

- (70) Welle O., Schuulze J., and König W.A.  
J. Chromatogr., 403:271-274(1987)
- (71) Balmér K., Zhang Y., Lagerström P., Persson B.  
J. Chromatogr., 417:357-365 (1987)
- (72) Padmalatha D.K., Ranga Rao K.V. and Baveja S.K. and  
Leemann T. and Dayer P.  
J. Chromatogr., 434:265-270(1988)
- (73) Reza Mehvar  
J. Chromatogr., 493:402-408(1989)
- (74) Ahnoff M., Chen S., Green A. and Grundevik I.  
J. Chromatogr., 506:593-599(1990)
- (75) Straka R.J. and Johnson K.A.  
J. Chromatogr., 5363:83-93(1990)
- (76) Gyllenhaal O., Vessman, Joergen  
J. Chromatogr., 516(2) 415-426(1990)
- (77) Shen J., Wanwimolruk S., Hung C.T., Zoest A.R.  
J. Liq. Chromatogr., 14 (4):777-93(1991)
- (78) Karnes H. T., Shiu G., Shah V.P.  
Pharmaceutical Research, 8(4):421-426 (1991)
- (79) Brooks M. A., Weinfeld R. E.  
Develop. Ind. Pharm. 11(9&10):1703-1728(1985)
- (80) Chow S.C., Liu J.P.  
J. Biophar. Stat. 2(2):239-256(1992)

- (81) Willing P.G., Tse F.L., Dighe S.V.  
"Pharmaceutical Bioequivalence"  
Marcel Dekker, Inc. pag 361  
New York 1991
- (82) Shah V.P., Midha K.K., Dighe S., McGilveray I.J.,  
Skelly J.P., Yacobi A., Layloff T., Viswanathan C.T.,  
Cook C., McDowall R.D.  
J.Pharm.Sci. 81(3):309-312 (1992)
- (83) Steinijans VW, Hauschke D, Johkman JHG  
Clinical Pharmacokinetics 22:247-253(1992)
- (84) Westlake WJ. Bioavailability of Pharmaceutical Formulations In Peace (Ed)  
Biopharmaceutical Statistics for Drug Development  
New York, NY: Marcel Dekker 1988:329-352
- (85) Shuirmann DJ. A Comparison of the two One-sided Tests Procedure and Power Approach for Assessing the Equivalence of Average Bioavailability.  
J. Pharmacokin. Biopharm. 15:657-660(1987)
- (86) Anderson S, Hauck WW. A New Procedure for Testing Equivalence in Comparative Bioavailability and Other Clinical Trials. Communications in Statistics.  
A12:2663-2692(1983)
- (87) Montgomery, D.C.  
Design and Analysis of Experiments.  
Wiley & Sons Eds. U.S.A. 1984
- (88) Aarons L., Toon S. and Rowland M.  
Journal of Pharmacological Methods 17:337-346(1987)
- (89) Kames H.T., and March C.  
Pharmaceutical Research 10(10):1420-1426 (1993)

- (90) **Guidance**  
Statistical Procedures for Bioequivalence Studies Using  
a Standar Two-Treatment Crossover Design  
Division of Bioequivalence Office of Generic Drugs (OGD)  
Division of Biometrics FDA  
Rockville, MD 1992
- (91) **Shapiro Mario**  
Arch. Inst. Cardiol. Mex. 54:117-120, 1984
- (92) **Jonkers R.E., Van Boxtel C.J., Koopmans R.P.  
and Oosterhuis B.**  
J. Pharm. Exper. Ther. 249:297-302 (1989)
- (93) **FEUM**  
México SSA 5ed  
1327-1328
- (94) **Metropolitan Insurance Company Bulletin**  
1983
- (95) **Wagner J.W., Chilko D., Howard S.**  
Drug Development and Industrial Pharmacy:  
12(7), 969-992(1986)
- (96) **Abdou H.M.**  
Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence  
pag.  
USA 1989
- (97) **Hills M. and Armitage P.**  
British Journal of Clinical Pharmacology 8: 7-20 (1979)
- (98) **The March 1991 Barcelona Drug  
Information Association International  
Consensus Statement on Bioavailability/ Bioequivalence  
Testing presentada en el International Harmonization  
Consensus Dia Meeting on Bioavailability and Bioequi-  
valence Testing Requirements and Standars.**

**(99)** Mandallaz, D. and Mau J.  
Biometrics, 37:213-222 (1981)

**(100)** Rescigno A.  
Pharmaceutical Research 9(7):925-927 (1992)

**IMPRESA ANTES CHIAPAS**  
**OFFSET TESIS URGENTES**  
EN I.B.M. Y COMPUTADORA

*Carmen Guzmán Aguilar*  
ATENCION PERSONAL

REP. DE CUBA 99 2o. PISO No. 28-A  
ESQ. CON BRASIL  
MEXICO, D.F. C.P. 06010

510-2004  
TELS. 512-2324  
521-2073