



00563 /
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

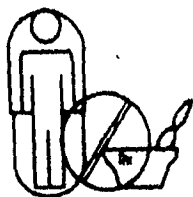
"DESARROLLO DE UNA FORMULACION Y ESTUDIO
PILOTO DE BIOEQUIVALENCIA DE
TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL COMPRIMIDOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN FARMACIA
(OPCION BIOFARMACIA)

P R E S E N T A :

Q.F.B. KATIE BOHBOT ABENAIM DE MARGULES



Biofarmacia

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

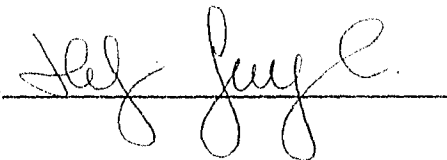
JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: M. en C. Marcela Hurtado
PRIMER VOCAL: M. en C. Juan Manuel Rodríguez
SECRETARIO: M. en C. Salvador Salado
PRIMER SUPLENTE: M. en C. Ines Fuentes Noriega
SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. Dinora F. González

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO EXPERIMENTAL:
CENTRO APLICACIONES FARMACÉUTICAS DE ESTUDIOS
TECNOLÓGICOS, S.A. (C.A.F.E.T., S.A)
MÉXICO D.F.

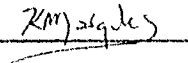
ASESOR:

M. en C. HELGI JUNG COOK:



SUSTENTANTE:

Q.F.B. KATIE BOHBOT ABENAIM DE MARGULES:



DEDICATORIAS:

A mi madre, por todo el esfuerzo, amor,
apoyo y cariño incondicional que
siempre me ha brindado.

A ma mère, avec tout mon amour.

A la memoria de mi padre.

A la mémoire de mon père.

A Luis, mi esposo, que gracias a su
ayuda, amor, ánimo, apoyo y confianza,
me fue posible realizar esta maestría y
con quien espero compartir siempre
el camino del porvenir.

Dedico también este trabajo a mis hermanos;
Linda, Daniel, Silvy y Liliane y sus respectivas familias.

“Loin des yeux, près du cœur”

AGRADECIMIENTOS:

Al Centro A.F. de Estudios Tecnológicos, S.A. (C.A.F.E.T) por brindarme esta oportunidad en mi desarrollo profesional y a todo su personal que de alguna manera a participado en este trabajo y de quien esta tesis es también mérito suyo.

Un agradecimiento especial al Q.F.B. Juan Angeles por su confianza, apoyo y amistad así como a los Señores Savoir por la confianza y las facilidades prestadas.

A mi asesora, la M. en C. Helgi Jung Cook, con respeto, admiración y cariño que sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

A mi suegro, Alejandro Margules, por su apoyo y ayuda.

A los miembros del jurado, por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Gracias al personal de A.M.I.C. y en especial al Dr. Blanco, Dra. Lourdes y Sonia.

A todos mis compañeros y amigos, y en especial a Chava, Mary Tere, Araceli, Roberto, Oscar, Juan Ch., Martin, Consuelo y Jorge quienes me brindaron su amistad y su ayuda incondicional.

Al Departamento de Biofarmacia, de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química (UNAM).

ÍNDICE:

ÍNDICE

<u>CONTENIDO:</u>	<u>PAGINAS:</u>
RESUMEN/SUMMARY	1
CAPITULO 1:	
INTRODUCCIÓN	4
CAPITULO 2:	
GENERALIDADES	7
2.1 MONOGRAFÍA DE LOS FÁRMACOS	8
2.1.1 SULFAMETOXAZOL	8
2.1.1.1. MONOGRAFÍA	8
2.1.1.2. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS	9
2.1.1.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	11
2.1.1.4. ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS	13
2.1.1.4.1. ABSORCIÓN	13
2.1.1.4.2. DISTRIBUCIÓN	14
2.1.1.4.3. METABOLISMO	14
2.1.1.4.4. ELIMINACIÓN	15
2.1.2. TRIMETOPRIM	16
2.1.2.1. MONOGRAFÍA	16
2.1.2.2. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS	17
2.1.2.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	20
2.1.2.4. ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS	21
2.1.2.4.1. ABSORCIÓN	21
2.1.2.4.2. DISTRIBUCIÓN	21
2.1.2.4.3. METABOLISMO	21
2.1.2.4.4. ELIMINACIÓN	22
2.1.3. CO-TRIMOXAZOL	23
2.1.3.1. ESPECTRO ANTIBACTERIANO	23
2.1.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN	23
2.1.3.3. USOS TERAPÉUTICOS	24
2.1.3.4. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS	25
2.1.3.5. NOMBRES COMERCIALES	26
2.1.3.6. PREPARACIÓN, VÍAS DE ADMINISTRACIÓN Y DOSIS	26
2.1.3.7. REACCIONES ADVERSAS	27
2.1.3.8. INTERACCIONES ENTRE FÁRMACOS	28
2.1.3.9. CONTRAINDICACIONES Y PRECAUCIONES	28
2.1.3.10. INTERACCIONES FÍSICOQUÍMICAS	29
2.2. FORMULACIÓN DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL COMPRIMIDOS	
2.2.1. FISIOLÓGICA DE DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN	30
2.2.1.1. PREFORMULACIÓN	32
2.2.1.2. FORMULACIÓN	33
2.2.1.3. ROBUSTEZ	33
2.2.1.4. TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA. Y ESCALAMIENTO	34
2.2.1.5. DISOLUCIÓN	35
2.2.1.5.1. DEFINICIÓN	36

2.2.1.5.2. FACTORES QUE AFECTAN LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN	36
2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAR TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL EN BIOLÓGICOS	39
2.3.1 DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	39
2.3.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN FLUIDO BIOLÓGICOS	40
2.4 ESTUDIO PILOTO DE BIOEQUIVALENCIA DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL	42
2.4.1 ASPECTOS GENERALES	42
2.4.1.1. ASPECTOS REGULATORIOS	42
2.4.1.2. DEFINICIONES	43
 CAPITULO 3:	
PARTE EXPERIMENTAL	44
3.1. EQUIPO MATERIAL Y REACTIVOS	45
3.2. FORMULACIÓN DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL COMPRIMIDOS	47
3.2.1. DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL COMPRIMIDOS	47
3.2.1.1. PREFORMULACIÓN	47
3.2.1.2. FORMULACIÓN Y ROBUSTEZ	48
3.3. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	51
3.3.1. DESARROLLO DEL MÉTODO	51
3.3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	54
3.4. ESTUDIO PILOTO DE BIOEQUIVALENCIA	58
3.4.1. PROTOCOLO DEL ESTUDIO	58
3.4.1.1. CRITERIO DE LA SELECCIÓN DE SUJETOS	58
3.4.1.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	58
3.4.1.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	59
3.4.1.1.3. CARTA DE CONSENTIMIENTO DE LOS VOLUNTARIOS	60
3.4.1.1.4. ANÁLISIS CLÍNICOS	60
3.4.1.2. REACCIONES ADVERSAS	60
3.4.1.3. MUESTRAS DE SANGRE	61
3.4.1.4. HORARIO DE TOMA DE MUESTRAS	61
3.4.1.5. ANÁLISIS DE MUESTRAS PLASMÁTICAS	61
3.4.1.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DEL ESTUDIO PILOTO DE BIOEQUIVALENCIA	61
3.4.1.6.1. CALCULO DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS	62
3.4.1.6.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63

CAPITULO 4:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
4.1. FORMULACIÓN DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL COMPRIMIDOS	66
4.1.1. DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL	66
4.1.1.1. PREFORMULACIÓN	66
4.1.1.2. FORMULACIÓN Y ROBUSTEZ	68
4.2. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	80
4.2.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	80
4.3. ESTUDIO PILOTO DE BIOEQUIVALENCIA DE TRIMETOPRIM SULFAMETOXAZOL COMPRIMIDOS	89
4.3.1. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS	89
4.3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	91
4.3.2.1. FILOSOFÍA DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	91
4.3.2.2. RESULTADOS DE LA ANÁLISIS ESTADÍSTICO	93
4.3.3 REACCIONES ADVERSAS	96

CAPITULO 5:

CONCLUSIONES	110
5.1. DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN	111
5.2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	112
5.3. ESTUDIO PILOTO DE BIOEQUIVALENCIA	112
5.4. CONCLUSIÓN GENERAL	113

CAPITULO 6:

BIBLIOGRAFÍA	114
ANEXO A	118

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1.1. FORMULA DESARROLLADA DE SULFAMETOXAZOL.....	8
FIGURA 1.2. SÍNTESIS DE SULFAMETOXAZOL.....	9
FIGURA 1.3. ESPECTRO UV DE SULFAMETOXAZOL.....	10
FIGURA 1.4. CALORIMETRÍA DE BARRIDO DIFERENCIAL DE SULFAMETOXAZOL.....	11
FIGURA 1.5. FORMULA DESARROLLADA DE TRIMETOPRIM.....	16
FIGURA 1.6. SÍNTESIS DE TRIMETOPRIM.....	17
FIGURA 1.7. ESPECTRO UV DE TRIMETOPRIM.....	19
FIGURA 1.8. CALORIMETRÍA DE BARRIDO DIFERENCIAL DE TRIMETOPRIM.....	19
DIAGRAMA DE FLUJO DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	53
TABLA 2.1. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACION DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LOS EXCIPIENTES ELEGIDOS PARA LA FORMULACIÓN DE LOS COMPRIMIDOS DE TRIMETOPRIM (TMP) Y SULFAMETOXAZOL (SMX).....	71
TABLA 2.2. RESULTADOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE TRIMETOPRIM Y DE SULFAMETOXAZOL REALIZADA POR EL MÉTODO MICROSCÓPICO (NIKON 20X) DE DIFERENTES PROVEEDORES.....	71
TABLA 2.3. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS INNOVADOR (B) Y DE PRUEBA (A) DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL.....	72
GRÁFICA 2.1. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE TRES LOTES DE UN MISMO PROVEEDOR DEL AGENTE DESINTEGRANTE.....	73
GRÁFICA 2.2. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE TRES LOTES DE UN MISMO PROVEEDOR DEL AGENTE LUBRICANTE.....	73
GRÁFICA 2.3 EFECTO DE PROPORCIÓN DEL DESINTEGRANTE (PERFIL DE DISOLUCIÓN DE SULFAMETOXAZOL).....	74
GRÁFICA 2.4 EFECTO DE PROPORCIÓN DEL DESINTEGRANTE (PERFIL DE DISOLUCIÓN DE TRIMETOPRIM).....	74
GRÁFICA 2.5. CANTIDAD DE AGUA PARA LA HUMECTACIÓN (PERFIL DE DISOLUCIÓN DE SULFAMETOXAZOL).....	75
GRÁFICA 2.6. CANTIDAD DE AGUA PARA LA HUMECTACIÓN (PERFIL DE DISOLUCIÓN DE TRIMETOPRIM).....	75
GRÁFICA 2.7. EFECTO DE PROPORCIÓN DEL AGLUTINANTE (PERFIL DE DISOLUCIÓN DE SULFAMETOXAZOL).....	76

GRÁFICA 2.8. EFECTO DE PROPORCIÓN DEL AGLUTINANTE (PERFIL DE DISOLUCIÓN DE TRIMETOPRIM)	76
GRÁFICA 2.9 EFECTO DE LA DUREZA (PERFIL DE DISOLUCIÓN DE SULFAMETOXAZOL)	77
GRÁFICA 2.10 EFECTO DE LA DUREZA (PERFIL DE DISOLUCIÓN DE TRIMETOPRIM)	77
GRÁFICA 2.11 REPETIBILIDAD SMX (PERFIL DE DISOLUCIÓN DE SULFAMETOXAZOL)	78
GRÁFICA 2.11 REPETIBILIDAD TMP (PERFIL DE DISOLUCIÓN DE TRIMETOPRIM)	78
GRÁFICA 2.13 PERFIL DE DISOLUCIÓN SULFAMETOXAZOL. (INNOVADOR vs BIOLOTE)	79
GRÁFICA 2.13 PERFIL DE DISOLUCIÓN TRIMETOPRIM (INNOVADOR vs BIOLOTE)	79
TABLA 3.1. CURVA PATRÓN DE TRIMETOPRIM EN PLASMA	82
TABLA 3.2. CURVA PATRÓN DEL SULFAMETOXAZOL EN PLASMA	82
TABLA 3.3. PRECISIÓN INTERDIA. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS ADICIONADAS DE TRIMETOPRIM($\mu\text{g}/\text{mL}$)	82
TABLA 3.4. PRECISIÓN INTERDIA. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS ADICIONADAS DE SULFAMETOXAZOL($\mu\text{g}/\text{mL}$)	83
TABLA 3.5. PRECISIÓN INTRADIA. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS ADICIONADAS DE TRIMETOPRIM($\mu\text{g}/\text{mL}$)	83
TABLA 3.6. PRECISIÓN INTRADIA. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS ADICIONADAS DE SULFAMETOXAZOL($\mu\text{g}/\text{mL}$)	83
TABLA 3.7 PORCENTAJE DE RECOBRO ABSOLUTO DE TRIMETOPRIM EN PLASMA	84
TABLA 3.8 PORCENTAJE DE RECOBRO ABSOLUTO DE SULFAMETOXAZOL EN PLASMA	84
TABLA 3.9 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DE TRIMETOPRIM, PROCESADA A TEMPERATURA AMBIENTE	84
TABLA 3.10 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DE SULFAMETOXAZOL, PROCESADA A TEMPERATURA AMBIENTE	84
TABLA 3.11 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DE TRIMETOPRIM, CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DESPUÉS DE 3 CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN	85
TABLA 3.12 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DE SULFAMETOXAZOL, CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DESPUÉS DE 3 CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN	85

FIGURA 3.1 EJEMPLO DE CURVA PATRÓN TÍPICA. TRIMETOPRIM (DÍA 4)	86
FIGURA 3.2 EJEMPLO DE CURVA PATRÓN TÍPICA. SULFAMETOXAZOL (DÍA 1)	86
FIGURA 3.3 ESTABILIDAD DE TRIMETOPRIM A -40°C. GRÁFICA TÍPICA/ CONC. ALTA (2.75µg/mL)	87
FIGURA 3.4 ESTABILIDAD DE SULFAMETOXAZOL A -40°C. GRÁFICA TÍPICA/ CONC. BAJA (1.75µg/mL)	87
FIGURA 3.5 CROMATOGRAMAS TÍPICOS DE MUESTRAS PLASMATICAS CON TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL	88
TABLA 4.1 CONCENTRACIÓN PROMEDIO ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE TRIMETOPRIM EN SEIS VOLUNTARIOS MASCULINOS SANOS	97
TABLA 4.2 CONCENTRACIÓN PROMEDIO ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE SULFAMETOXAZOL EN SEIS VOLUNTARIOS MASCULINOS SANOS	97
TABLA 4.3 RESUMEN DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE LA FORMULA DE PRUEBA A DE TRIMETOPRIM PARA CADA VOLUNTARIOS	98
TABLA 4.4 RESUMEN DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE LA FORMULA DE REFERENCIA B DE TRIMETOPRIM PARA CADA VOLUNTARIOS	99
TABLA 4.5 RESUMEN DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE LA FORMULA DE PRUEBA A DE SULFAMETOXAZOL PARA CADA VOLUNTARIOS	100
TABLA 4.6 RESUMEN DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE LA FORMULA DE REFERENCIA B DE SULFAMETOXAZOL PARA CADA VOLUNTARIOS	101
TABLA 4.7 RESUMEN DE LOS PROMEDIOS DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS ± SD PARA TRIMETOPRIM	102
TABLA 4.8 RESUMEN DE LOS PROMEDIOS DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS ± SD PARA SULFAMETOXAZOL	102
TABLA 4.9 TABLA DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE TRIMETOPRIM	103
TABLA 4.10 TABLA DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE SULFAMETOXAZOL	104
TABLA 4.11 VALORES DE DEPURACIÓN DE TRIMETOPRIM PARA LOS SEIS VOLUNTARIOS	105
TABLA 4.12 VALORES DE DEPURACIÓN DE SULFAMETOXAZOL PARA LOS SEIS VOLUNTARIOS	106
TABLA 4.13. COMPARACIÓN DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE TRIMETOPRIM	107
TABLA 4.14. COMPARACIÓN DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE SULFAMETOXAZOL	108

TABLA 4.15. CALCULO DEL NUMERO DE SUJETOS (N_e) REQUERIDOS PARA EL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE SULFAMETOXAZOL Y DE TRIMETOPRIM..... 109

ANEXO A 118

TRIMETOPRIM: TABLAS DE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS POR SUJETO..... 118

SULFAMETOXAZOL: TABLAS DE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS POR SUJETO..... 121

TRIMETOPRIM: PERFILES PLASMÁTICOS POR SUJETO..... 124

SULFAMETOXAZOL: PERFILES PLASMÁTICOS POR SUJETO..... 127

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN:

Trimetoprim y Sulfametoxazol son agentes antimicrobianos, bacteriostáticos de amplio espectro, los cuales en combinación presentan un efecto sinérgico en el combate contra una gran variedad de infecciones, actuando sobre dos pasos secuenciales de la vía de una reacción enzimática primordial para la sobrevivencia de la bacteria.

Se desarrolló una formulación de comprimidos de Trimetoprim/Sulfametoxazol 160.800mg/comp, estable y con un perfil de disolución similar al producto innovador Bactrim F de Roche y se evaluó su Bioequivalencia a través de un estudio piloto para decidir la conveniencia de continuar con el proceso de escalamiento y el estudio de bioequivalencia formal para registrar el producto ante la FDA.

La bioequivalencia se evaluó en seis sujetos, voluntarios clínicamente sanos de sexo masculino; se tomaron muestras sanguíneas y se cuantificaron simultáneamente ambos activos en plasma por medio de un método analítico previamente validado que consiste en doble proceso de extracción de los compuestos de interés y análisis por CLAR con detección UV a 230nm y una fase móvil constituida de fosfato monobásico de potasio 0.01M:Acetonitrilo, 83:17 v/v, pH 3.5.

Se calcularon los parámetros farmacocinéticos (Cmax, Tmax, AUC, AUMC, MRT, Cl, K, T½) para Trimetoprim (TMP) y Sulfametoxazol (SMX).

Los parámetros farmacocinéticos para TMP y SMX resultaron ser similares a los reportados en la literatura, lo cual indica que no existe diferencia entre el comportamiento farmacocinético de las poblaciones mexicanas y de las norteamericanas y caucásicas.

La relación entre las concentraciones plásmáticas de SMX/TMP es aproximadamente de 35:1, lo cual corresponde a la relación óptima para el efecto bacteriostático en la mayoría de las infecciones susceptibles a esta combinación de fármacos.

También se calculó la cantidad de sujetos requeridos para el estudio de bioequivalencia formal en función de los coeficientes de variación de los parámetros farmacocinéticos obteniendo un mínimo de 20 voluntarios para evaluar una diferencia del 20% con un alfa de 0.05.

Posteriormente, se efectuó un análisis estadístico, que incluyó pruebas de ANADEV, intervalo de confianza Clásico, intervalo de confianza de Westlake, prueba de t doble unilateral de Schuirmann, prueba de Anderson Hauck y prueba de poder, de los diferentes parámetros Cmax, Tmax, ABC, MABC y TMR y se concluyó a favor de la bioequivalencia para Sulfametoxazol y, con menor grado de certidumbre, para Trimetoprim indicando así que ambos productos son intercambiables.

SUMMARY:

Trimethoprim and Sulfamethoxazole are both broad-spectrum bacteriostatic anti-infective agents and when used in combination, synergism occurs. They act on two sequential steps of an enzymatical reaction primordial for the bacteria survival.

A stable formulation for tablets of Trimethoprim/Sulfamethoxazole 160:800 mg/tab with a dissolution profile similar to the one of the innovator product, Bactrim DS from Roche, was developed and its bioequivalence was evaluated through a pilot study in order to decide whether or not to continue with the scaling-up process and the formal bioequivalence study to register the product with the FDA.

The bioequivalence was evaluated in six clinically healthy male volunteers; blood samples were taken and both active principles were simultaneously quantified in plasma using a previously validated analytical method which consisted in a double extraction process of the substances of interest and their analysis by HPLC with a UV detection at 230 nm and a mobile phase constituted by potassium phosphate monobasic 0.01:Acetonitrile, 83:17 v/v, pH 3.5.

Pharmacokinetic parameters (C_{max} , T_{max} , AUC, AUMC, MRT, CL, K_e , $T_{1/2}$) for Trimethoprim (TMP) and Sulfamethoxazole (SMX) were calculated.

Pharmacokinetic parameters for TMP and SMX were compared to the literature reported ones, indicating there is no differences in the pharmacokinetic behavior of Mexican population and North American and Caucasian ones.

The plasma concentration ratio SMX/TMP obtained was 35:1 which corresponds to the optimal ratio for bacteriostatic effect in most infections susceptible to this combination of drugs.

The number of subjects required for a formal bioequivalence study was calculated in function of the standard deviation of the pharmacokinetic parameters obtaining a minimum of 20 subjects to detect a difference of 20% with an alpha of 0.05.

Finally, a statistical analysis was performed including test for ANOVA, Classical confidence interval, Westlake's symmetric Confidence Interval, Schuirmann's Two one-sided tests procedure, Anderson and Hauck's test and power test of the different parameters C_{max} , T_{max} , AUC, AUMC and MRT concluding in favor of bioequivalence for Sulfamethoxazole and, with less degree of certitude for Trimethoprim, indicating so that both product are interchangeable.

CAPITULO 1:

INTRODUCCIÓN

El ingreso al Tratado de Libre Comercio (TLC) representa para México la posibilidad de participar en mercados que en su conjunto consumen aproximadamente el 30% de la producción farmacéutica mundial. Esto sin duda resulta ser económicamente muy atractivo, pero también a su vez representa un reto muy grande para la industria farmacéutica mexicana en poder cumplir con los requisitos de la organización reguladora de alimentos y medicamentos Estadounidense, denominada la Food and Drug Administration (FDA), para el registro de medicamentos. (19)

La utilización de los productos genéricos ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años. En Estados Unidos, en 1975, solo aproximadamente 9.5% de los medicamentos de prescripción eran genéricos contra 20% en 1984 y 40% en 1991.

En los años cuarenta y cincuenta, la ley Estadounidense obligaba al farmacéutico a despachar la marca exacta de medicamento prescrita por el médico, sin embargo de 1978 a 1982 esta ley fue abolida, abriendo así el mercado de los genéricos. (44)

En 1974, se implementó con la oficina OTA "Office of Technology Assessment", una regulación sobre Biodisponibilidad y Bioequivalencia, con el objetivo de asegurar que productos de propiedades físicas y químicas similares produzcan efectos terapéuticos similares y en 1980, la FDA emitió una lista oficial de productos intercambiables en el libro "Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluation" mejor conocido como el "Orange Book".

En 1984, se implementa la ley de "Drug Price Competition and Patent Term Restoration Act (Waxman-Hatch Act)" con la cual se facilita y promueve la comercialización de los productos genéricos, productos similares a los productos innovadores que fueron encontrados seguros y efectivos por la FDA y que ya no están protegidos por la ley de patentes. (4)

Los productos genéricos se volvieron muy populares ya que con raramente a los innovadores no se necesita llenar los requisitos de un N.D.A. (Solicitud de registro para un nuevo fármaco), el cual consiste en demostrar la eficacia, seguridad y relación riesgo/beneficio del producto, sino que solo requiere evidencia de la calidad y de la Bioequivalencia dentro de límites predeterminados entre el producto genérico y el producto innovador a través de estudios de biodisponibilidad para asegurar su equivalencia terapéutica y comprobar que no presente mayor

riesgo de toxicidad. Estos datos están reunidos en una solicitud de registro tipo A.N.D.A. (Solicitud de registro abreviada para un nuevo fármaco) economizando así la inversión en estudios clínicos largos y costosos de fase I-III reduciendo así los precios de los productos en el mercado, lo cual es de interés para todos los países incluyendo México.

Este proyecto incluye el desarrollo de una formulación de comprimidos de Trimetoprim/Sulfametoxazol y su estudio piloto de bioequivalencia utilizando un método analítico, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución validado bajo los criterios y parámetros aceptados por la secretaria de Salud de Estados Unidos, para cuantificar ambos fármacos, con el objeto de posteriormente, por medio de un análisis farmacocinético y estadístico, establecer si existe o no la bioequivalencia entre los dos productos, y decidir si continuar con el escalamiento del producto desarrollado y su estudio de Bioequivalencia formal. También nos permitirá evaluar el número de sujetos y los tiempos de muestreos requeridos antes del estudio formal.

OBJETIVO GENERAL:

Dar una visión general de los pasos involucrados en el desarrollo de un producto genérico de Trimetoprim/Sulfametoxazol para su venta en México y Estados Unidos.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Desarrollar una formulación de Trimetoprim/Sulfametoxazol que tenga características físicas y químicas apropiadas y con un perfil de disolución similar al producto innovador.
2. Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar simultáneamente Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma.
3. Realizar un estudio clínico piloto para evaluar la farmacocinética y, a través de un análisis estadístico, la bioequivalencia de la formulación desarrollada así como el número de sujetos y los tiempos de muestreo requeridos.

CAPITULO 2:

GENERALIDADES

2.1 MONOGRAFÍAS DE LOS FÁRMACOS.

2.1.1 SULFAMETOXAZOL:

2.1.1.1 MONOGRAFÍA

Nombre genérico:

Sulfametoxazol.

Nombres químicos y Sinónimos (2.1.1):

- N'-(5-metil-3-isoxazolil) Sulfanilamida.
- 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil)benzensulfanilamida.
- 5-metil-3-sulfanilamidoisoxazol.
- 3-sulfanilamida-5-metilisoxazol.
- 3-(p-aminofenilsulfonamida)-5-metilisoxazol.

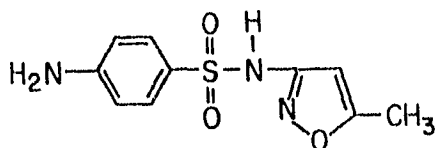
Sulfamethoxazolium, Sulfisoniezole, Sulfarnetilisoxazol, Sulfametoxizol, Gantanol.

Fórmula condensada (2.1.1):

$C_{10}H_{11}N_3O_3S$.

Formula Desarrollada (2):

FIGURA 1.1:



Peso molecular (2.1.1):

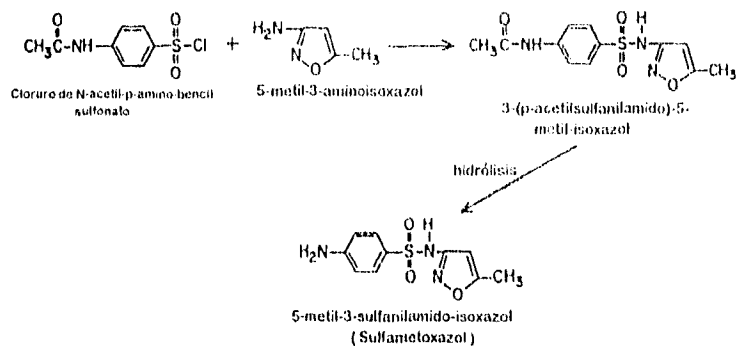
253.28

Descripción (2):

Polvo cristalino blanco prácticamente inodoro.

Síntesis (1):

FIGURA 1.2:



Almacenamiento (11):

Conservar en contenedores bien cerrados y protegidos de la luz.

2.1.1.2 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS (1):

Constante de disociación:

pKa=5.6 a 25 °C.

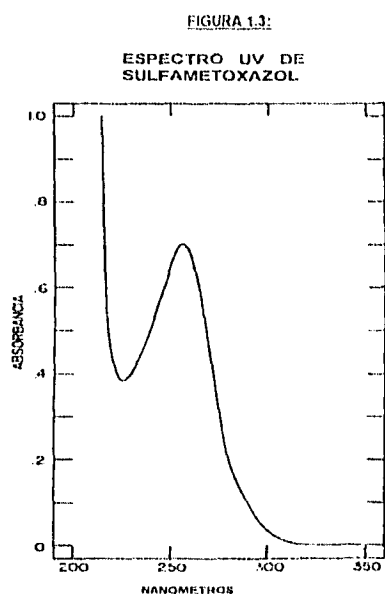
Solubilidad a 25°C:

<u>DISOLVENTE:</u>	<u>SOLUBILIDAD (mg/mL):</u>
Benceno	0.5
Cloroformo	2.3
Etanol 95%	37.8
Éter Etilico	2.7
Isopropanol	8.8
Metanol	90.3
NaOH 0.1 N	16.0
Agua	0.5

Espectro Ultravioleta:

El Sulfametoxazol presenta un máximo de absorción a 256-257 nm y un mínimo de absorción a 224-225 nm.

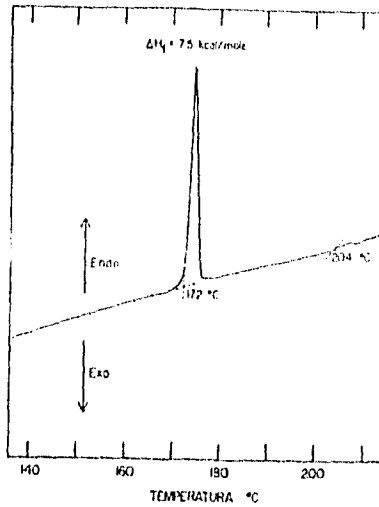
El espectro UV presentado a continuación se obtuvo con una solución de Sulfametoxazol en NaOH 0.1N a una concentración de 10.25 µg/ml.



Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC):

El termograma de Sulfametoxazol presentado a continuación fue realizado a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Se puede observar una endoterma de fusión a 172°C y una endoterma de descomposición a 204°C.

FIGURA 1.4:



Intervalo de fusión:

170°C- 173°C

2.1.1.3 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS (1, 5, 6):

Las Sulfonamidas fueron los primeros agentes quimioterapéuticos efectivos que se emplearon sistemáticamente para la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas en el hombre. La considerable importancia de su descubrimiento y su posterior uso en gran escala para la medicina y la salud pública se reflejó rápidamente en la gran declinación de la mortalidad y morbilidad en enfermedades infecciosas tratables. Antes del uso generalizado de la penicilina, las Sulfonamidas eran la base de la quimioterapia antibacteriana. Aunque el advenimiento de los antibióticos ha disminuido la utilidad de las Sulfonamidas, las mismas siguen ocupando un lugar importante, aunque relativamente pequeño, en el arsenal terapéutico del médico. Sin embargo, la introducción a mediados de la década de 1970 de la combinación de Trimetoprim y

Sulfametoxazol ha determinado un aumento del uso de las Sulfonamidas para el tratamiento de las infecciones microbianas específicas.

El término de Sulfonamida se emplea aquí como nombre genérico para los derivados de la paraaminobencenosulfonamida (Sulfanilamida). Más de 5400 sustancias análogas se sintetizaron y estudiaron pero pocas de ellas han alcanzado alguna importancia terapéutica.

Relación estructura/actividad: Los requisitos estructurales mínimos de la acción antibacteriana están todos encarnados en la misma Sulfanilamida. El grupo $-SO_2NH_2$ no es esencial como tal, pero el aspecto importante es que el azufre esté unido directamente al anillo bencénico. El grupo NH_2 en posición para (cuyo nitrógeno se ha designado como N_1) es esencial y solo puede reemplazarse con radicales que puedan convertirse en los tejidos en un grupo amino libre. La acilación del para- NH_2 elimina la actividad in-vitro; pero in-vivo puede producirse una desacilación y por consecuencia un retorno de la potencia. Las sustituciones efectuadas al grupo NH_2 amida (cuyo nitrógeno se ha designado como N_1) tienen efectos variables sobre la actividad antibacteriana de la molécula pero se ha visto que la sustitución de núcleos heterocíclicos en N_1 da compuestos muy potentes (cuando más negativo es el grupo SO_2 de una Sulfonamida N_1 -sustituída, mayor es su actividad bacteriostática).

Mecanismo de acción: Las Sulfonamidas son análogos estructurales y antagonistas competitivos del ácido paraaminobenzoico (PABA). Las Sulfonamidas son inhibidoras competitivos de la enzima bacteriana responsable de la incorporación de PABA al ácido dihidroteróico, el precursor inmediato del ácido fólico y así interfiere con la síntesis de los ácidos nucleicos. Los microorganismos sensibles son aquellos que deben sintetizar su propio PGA (Ácido tetrahidrotióico). Las bacterias que no requieren PGA o que pueden utilizar PGA preformado no son afectadas. Por lo tanto las células mamíferas no son afectadas ya que utilizan PGA preformado.

Sinergistas y antagonistas de las Sulfonamidas:

- Uno de los agentes más activos que ejerce efecto sinérgico cuando se usa con una Sulfonamida es el Trimetoprim. Este compuesto es un inhibidor potente y selectivo de la dihidrofolato reductasa microbiana, la enzima que reduce el dihidrofolato a tetrahidrofolato. Esta forma reducida del ácido fólico es la que se requiere para las reacciones de transferencia de un carbono. La administración simultánea de una Sulfonamida y Trimetoprim introduce así bloqueos secuenciales en la vía por la cual los microorganismos sintetizan tetrahidrofolato a partir de moléculas precursoras. La esperanza de que esta combinación tuviera efectos sinérgicos se ha cumplido tanto "in-vitro" como "in-vivo".

- El PABA es el más prominente de los antagonistas de las Sulfonamidas.

- La acción antibacteriana de estos fármacos también es reducida por la presencia de la sangre, el pus y los productos de descomposición de tejidos, porque el requerimiento bacteriano de ácido fólico está reducido en medios que contienen purinas y timidina.

2.1.1.4. ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS (1, 5, 6, 10, 13):

Disponibilidad oral (%): ~ 100 (5)

Excreción urinaria (%): 25-50% de la dosis administrada (5) (otros reportan 85% (10)).

Unión a proteínas (%): 62 ± 5 (1, 9)

Depuración (mL/min.kg): 0.32 ± 0.04 (5)

Volumen de distribución (L/kg): 0.21 ± 0.02 (5, 6)

Vida media (horas) 10.1 ± 4.6 (1, 5)

Tmax (horas): 1-4 (1, 5, 6, 10)

Cmax (µg/mL): 59 ± 6.4 para una dosis de 800mg (13)

2.1.1.4.1 ABSORCIÓN (5)

Se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal. Entre el 70 y 100 % de una dosis oral es absorbida y puede encontrarse en la orina a los 30 minutos de la ingestión. El intestino delgado

es el principal sitio de absorción, pero parte del fármaco se absorbe en el estómago. La absorción desde otros sitios como la vagina, el tracto respiratorio y la piel lesionada es variable e irregular, pero puede entrar al organismo una cantidad suficiente para causar reacciones tóxicas en personas susceptibles o producir sensibilización

2.1.1.4.2 DISTRIBUCIÓN

Las Sulfonamidas se distribuyen en todos los tejidos y fluidos del organismo y pueden ser detectados entre otros en orina, saliva, sudor, bilis y en líquido cefalorraquídeo, peritoneal, ocular, y sinovial. Las Sulfonamidas pasan fácilmente a través de la placenta y llegan a la circulación fetal. Las concentraciones alcanzadas en los tejidos fetales son suficientes para causar efectos antibacterianos y tóxicos. También pueden encontrarse en concentraciones bajas en la leche materna.

2.1.1.4.3 METABOLISMO (1,6)

Las Sulfonamidas experimentan alteraciones metabólicas en grado variable en los tejidos, especialmente en el hígado. El principal derivado metabólico es la Sulfonamida N₄-acetilada (~15%). La acetilación es una desventaja porque el producto resultante no tiene actividad antimicrobiana pero conserva el potencial tóxico de la sustancia madre. Además, las formas acetiladas de algunas de las primeras Sulfonamidas son menos solubles y por ello contribuyen a la cristaluria y a las complicaciones renales. Como la acetilación está en función del tiempo y de la función hepática, la fracción conjugada aumenta considerablemente cuando la estancia del fármaco en el organismo se prolonga, como en los pacientes con deterioro de la función renal, o disminuye cuando hay insuficiencia hepática.

La actividad de la enzima N₄-acetiltransferasa está sujeto a polimorfismo genético y por lo tanto el metabolismo de Sulfametoxazol puede variar (12).

2.1.1.4.4 ELIMINACIÓN^{5, 13, 14}:

Las Sulfonamidas se eliminan del organismo en parte inalteradas y en parte como productos metabólicos. La mayor fracción se excreta por la orina, y la vida media de las Sulfonamidas en el organismo depende entonces de la función renal. Pequeñas cantidades se eliminan por las heces y por la bilis, la leche y otras secreciones. Solo ~20 a 30% se excreta en orina como fármaco activo, el resto se excreta como metabolitos acetilados y conjugados glucurónidos microbiológicamente inactivos.

La eliminación renal es principalmente por filtración glomerular y secreción tubular.

2.1.2 TRIMETOPRIM:

2.1.2.1 MONOGRAFÍA

Nombre genérico:

Trimetoprim.

Nombres químicos y Sinónimos (2.1.1):

-2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina.

-5-[(3,4,5-Trimetoxifenil)metil]-2,4-diaminopirimidina

Monotrim, Proloprim, Syraprim, Tiempo, Trimanyl, Timogal, Trimopan, Trimpex,

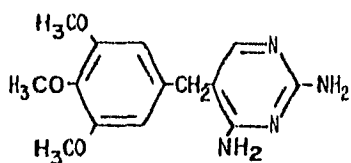
Uretrim, Wellcoprim.

Fórmula condensada (3.1):

$C_{14}H_{16}N_4O_3$.

Formula Desarrollada (3):

FIGURA 1.5:



Peso molecular (3.1):

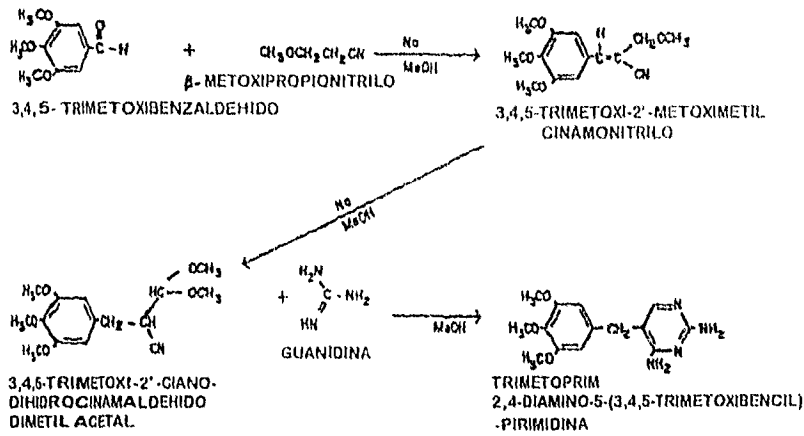
290.32

Descripción (3):

Polvo cristalino de color blanco a amarillo pálido, inodoro.

Síntesis (1):

FIGURA 1.6:



Almacenamiento (1):

Conservar en contenedores bien cerrados y protegidos de la luz.

2.1.2.2 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS (1):

El Trimetoprim es una base débil con características lipofílicas.

Constante de disociación:

pKa=6.6 a 25°C.

Aparentemente existe una relación entre la constante de disociación y la actividad fisiológica mediante la habilidad de inhibir el enzima dihidrofolato reductasa.

Solubilidad a 25°C:

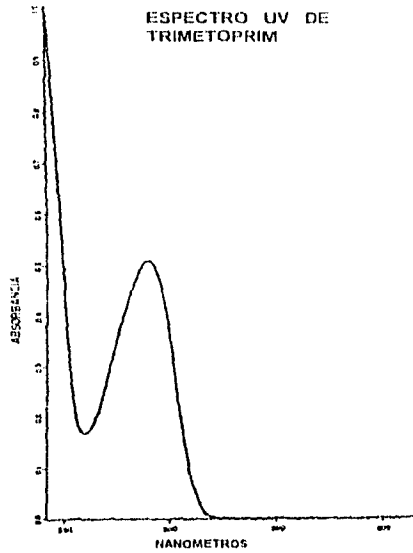
<u>DISOLVENTE:</u>	<u>SOLUBILIDAD (mg/ml):</u>
Benceno	0.002
Cloroforno	1.82
Etanol 95%	0.81
Eter Etilico	0.003
Isopropanol	0.12
Metanol	1.21
Agua	0.04
Tetracloruro de Carbono	0.002
Acetona	0.35
Propilenglicol	2.57

Espectro Ultravioleta:

El Trimetoprim presenta un máximo de absorción a 285-289 nm y un mínimo de absorción a 257 nm aproximadamente.

El espectro UV presentado a continuación se obtuvo con una solución de Sulfametoxazol en Etanol y NaOH 0.4% a una concentración de 0.02 mg/ml.

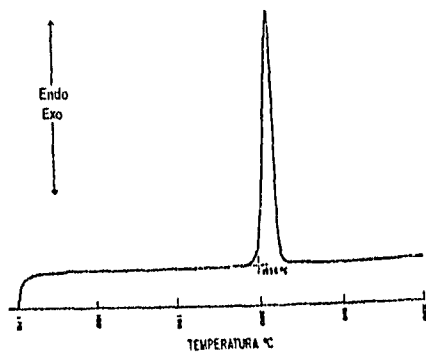
FIGURA 1.7:
ESPECTRO UV DE
TRIMETOPRIM



Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC):

En el termograma de Trimetoprim presentado a continuación, se puede observar una endoterma de fusión en 199.4°C.

FIGURA 1.8:



Intervalo de fusión:

199- 203°C

2.1.2.3 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS (5, 6, 14):

Primeramente desarrollado como agente antibacteriano, el Trimetoprim reveló poseer propiedades antipalúdicas.

El Trimetoprim es un inhibidor muy selectivo de la dihidrofolato reductasa de los microorganismos. Esto es de vital importancia, porque esta función enzimática es fundamental en todas las especies. La dihidrofolato reductasa cataliza la reducción del dihidrofolato para formar el tetrahidrofolato el cual es la forma metabólica activa del ácido fólico, el cual a su vez es co-factor necesario para la síntesis de purinas, pirimidinas y ciertos aminoácidos. Lo más importante parece ser la interrupción de la síntesis de la timidina.

El concepto basado en la inhibición de dos pasos diferentes del ciclo metabólico esencial mediante el empleo de fármacos distintos con el objeto de producir un efecto aditivo explica la acción sinérgica de las 2,4 diaminopirimidinas con las Sulfonamidas o las sulfonas.

La mayoría de los organismos grampositivos y gramnegativos incluyendo *E. Coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella sp.*, algunos *staphylococci* y *streptococci* son susceptibles al Trimetoprim, pero puede desarrollarse resistencia cuando el fármaco se utiliza solo. Las *Pseudomonas aeruginosas*, los *Bacteroides fragilis* y los enterococos generalmente son resistentes al Trimetoprim.

2.1.2.4. ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS (1, 5, 6, 10, 13):

Disponibilidad oral (%) : ~ 100 (5)

Excreción urinaria (%): 80-90 de la dosis administrada (5)

Unión a proteínas (%): 35-40 (5) y 30-70% (1)

Depuración (mL/min.kg): 2.2 ± 0.6 (5)

Volumen de distribución (L/kg): 1.8 ± 0.2 (5)

Vida media (horas) 11 ± 1.4 (5) y 8 a 15 (1)

Tmax (horas): 1-4 (5, 6, 10)

Cmax (µg/mL): 1.57 ± 0.26 para una dosis de 160 mg (13)

2.1.2.4.1 ABSORCIÓN(5):

El Trimetoprim se absorbe bien a lo largo del tracto gastrointestinal. Después de una dosis de 160 mg el Tmax se alcanza de 2 a 3 horas después de su administración con un valor de Cmax de 1 a 2 µg/mL en adultos.

2.1.2.4.2 DISTRIBUCIÓN(5, 14):

El Trimetoprim se distribuye rápida y ampliamente en varios tejidos y fluidos incluyendo riñón, hígado, páncreas, oído medio, fluidos vaginal y prostáticos, secreciones bronquiales y bilis. Pasa la barrera placentaria, y alcanza concentraciones detectables en leche materna, líquido amniótico y suero fetal. La concentración en el líquido cefalorraquídeo es de 30 a 50% de la encontrada en plasma.

2.1.2.4.3 METABOLISMO(5, 8, 10):

El metabolismo es principalmente hepático y sus principales metabolitos son los 1- y 3-oxidos y los derivados de los 3'- y 4'-hidróxidos. Los metabolitos pueden encontrarse libres o bien conjugados.

2.1.2.4.4 ELIMINACIÓN^[3, 14]:

El Trimetoprim se excreta principalmente en la orina (~50% de la dosis a las 24 horas y ~75% de la dosis a las 96 horas). La vida media es considerablemente más pequeña en niños.

La excreción se lleva a cabo principalmente por filtración glomerular y secreción tubular.

Se excreta también en la leche materna.

2.1.3. CO-TRIMOXAZOL:

La combinación de Trimetoprim-Sulfametoxazol es conocida como Co-Trimoxazol. Este producto está disponible para uso desde 1968 en Europa y desde 1973 en Estados Unidos.

2.1.3.1. Espectro antibacteriano (1, 5, 9, 10, 14):

El espectro antibacteriano del Trimetoprim es similar al de Sulfametoxazol, aunque el primer fármaco es usualmente de 20 a 100 veces más potente que el segundo. Ambos son bacteriostáticos de amplio espectro.

Todas las cepas de *Strep. pneumoniae*, *C. diphtheriae* y *N. meningitidis* son sensibles al Trimetoprim/Sulfametoxazol. Del 50 al 95% de las cepas de *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*, *Strep. pyogenes*, el grupo *viridans* de *estreptococos*, *E. coli*, *Pr. mirabilis*, *Pr. morgani*, *Pr. rettgeri*, *Enterobacter sp.*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseud. Pseudomallei*, *Serratia* y especies de *Alcaligenes* son inhibidas. También son sensibles especies de *Klebsiella*, *Brucella abortus*, *Pasteurella haemolytica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* y *Nocardia asteroides*. Algunas cepas de *Staph. aureus*, aunque resistentes a Trimetoprim o Sulfametoxazol solos, generalmente son susceptibles a la combinación. Sin embargo, el máximo grado de sinergismo se da cuando los microorganismos son sensibles a ambos compuestos.

2.1.3.2. Mecanismo de acción (1, 5, 9, 10, 14):

La actividad de Trimetoprim y Sulfametoxazol resulta de sus acciones sobre dos pasos de la vía enzimática para la síntesis del ácido tetrahidrofólico. La Sulfonamida inhibe la incorporación de PABA al ácido fólico, y el Trimetoprim previene la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato. Este último es la forma esencial para las reacciones de transferencia de un carbono.

Existe una relación óptima entre las concentraciones de los dos agentes para el sinergismo y esta es igual a la relación entre las concentraciones inhibitorias mínimas de los fármacos actuando en forma independiente. Aunque esta relación varía en las diferentes

bacterias, la más efectiva para el mayor número de microorganismos es igual a 20 partes de Sulfametoxazol por una parte de Trimetoprim.

El factor más importante para determinar la eficacia de Co-Trimoxazol parece ser el nivel de susceptibilidad del microorganismo al Trimetoprim.

2.1.3.3. Usos terapéuticos (1, 5, 6, 9, 10, 14, 15):

Los usos terapéuticos de Co-Trimoxazol más comunes son para:

1. Infecciones del tracto urinario.

2. Infecciones bacterianas de las vías respiratorias, como exacerbaciones agudas de la bronquitis crónica, otitis media aguda en niños, sinusitis maxilar aguda en adultos, neumonía. No se debe tratar la faringitis estreptocócica con Co-Trimoxazol ya que no elimina el microorganismo.

3. Infecciones gastrointestinal, como para el tratamiento de la Shigellosis (ya que muchas cepas son resistentes a la Ampicilina), fiebre tifoidea (siendo Cloranfenicol el fármaco de primera elección), tratamiento de Salmonella. La diarrea causada por el E.coli enteropatógeno no puede ser tratada o prevenida por Trimetoprim solo o Trimetoprim con Sulfametoxazol.

4. Infección por Pneumocystis carinii (1, 5, 15, 16): Las infecciones secundarias siguen siendo la principal causa de muerte en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Antes de que se utilizara una profilaxis eficaz contra el Pneumocistis, la neumonía por P.carinii ocurría por lo menos una vez en el 80% de pacientes estadounidenses con SIDA. La lista de tratamientos para la neumonía por P.carinii es grande, sin embargo, debido a su alta eficacia y menor toxicidad, el tratamiento convencional con Trimetoprim-Sulfametoxazol oral continúa siendo el tratamiento de elección para la neumonía leve, moderada y severa por P. carinii. Sin embargo la incidencia de los efectos secundarios es alta (más del 60%) y por lo tanto muchas veces el tratamiento con Co-Trimoxazol es mal tolerado y debe ser discontinuado.

5. Infecciones genitales, como uretritis gonorréica aguda tanto en hombres como en mujeres. No actúa contra la sífilis.

6. Infecciones diversas: como para la terapia de la Brucelosis incluso en presencia de lesiones localizadas como artritis, endocarditis u orquiepididimitis.

2.1.3.4. Parámetros farmacocinéticos (1, 5, 13, 17, 19):

Después de una sola dosis oral de Co-Trimoxazol, el Trimetoprim se absorbe más rápidamente que el Sulfametoxazol. La administración concomitante de los fármacos parece hacer más lenta la absorción del Sulfametoxazol. Las concentraciones sanguíneas máximas del Trimetoprim se alcanzan generalmente a las 2 horas en casi todos los pacientes, y las del Sulfametoxazol se observan 4 horas después de una sola dosis oral. Las vidas medias de Trimetoprim y Sulfametoxazol reportadas son ambas muy variables, desde 6 hasta 17 horas. Los perfiles plasmáticos se ajustan a un modelo abierto de un compartimento con una absorción de primer orden.

Cuando se administran 800 mg de Sulfametoxazol con 160 mg de Trimetoprim (la proporción convencional de 5:1), las concentraciones plasmáticas máximas de los fármacos son aproximadamente 40 y 2 µg/mL respectivamente(equivalente a la relación óptima que se busca de 20:1). En la orina, dependiendo del pH, la relación puede variar de 1:1 a 1:5. El porcentaje de recobro de la dosis de Co-Trimoxazol es de 84.5% de Sulfonamida total y 66.8% de Trimetoprim libre. El 30% de la Sulfonamida total se excreta como Sulfametoxazol libre y el resto como su metabolito N- acetilado.

El Trimetoprim se distribuye rápidamente en los tejidos y aproximadamente el 70% se une a las proteínas plasmáticas en presencia de Sulfametoxazol. El volumen de distribución del Trimetoprim es 5 a 6 veces mayor que el de Sulfametoxazol. El fármaco pasa fácilmente al líquido cefalorraquídeo. Concentraciones altas de cada componente de la mezcla se encuentra también en la bilis. Aproximadamente el 65% de Sulfametoxazol se une a las proteínas plasmáticas. La administración concomitante de Trimetoprim-Sulfametoxazol prácticamente no afecta la unión a proteínas de uno u otro ni tampoco sus excreciones urinarias.

Aproximadamente el 60% del Trimetoprim administrado y de 25 a 50% del Sulfametoxazol se excretan por la orina en 24 horas. Dos terceras partes de la Sulfonamida no están conjugadas.

Los metabolitos de Trimetoprim también se excretan por vía urinaria. Los índices de excreción y las concentraciones urinarias de ambos compuestos son mucho menores en los pacientes con uremia.

Se encontró que la acidificación de la orina incrementa la excreción del Trimetoprim, mientras que la alcalinización reduce la excreción de Trimetoprim y aumenta la de Sulfametoxazol libre.

La insuficiencia renal reduce la excreción de los dos compuestos.

En pacientes pediátricos, el volumen de distribución y la depuración son mayores que en adultos.

2.1.3.5. Nombres comerciales (1, 4, 6):

Bactrim, Septra, Seprin, Cotrim, Fectrim, Laratrim, Sulfatrim, Uroplus SS, Gantanol, Sulphamethoprim, Chemotrim, Comox.

2.1.3.6. Preparaciones, vías de administración y dosis (1, 4, 5, 6):

Tabletas de 400 mg de Sulfametoxazol y 80 mg de Trimetoprim.

Tabletas de 800 mg de Sulfametoxazol y 160 mg de Trimetoprim.

Suspensión oral de 200 mg de Sulfametoxazol y 40 mg de Trimetoprim por cada 5 mL.

I.M. de 800 mg de Sulfametoxazol y 160 mg de Trimetoprim por cada 3 mL.

Infusión I.V de 400 mg de Sulfametoxazol y 80 mg de Trimetoprim por cada 5 mL (a diluir antes de usar).

Dosis usual en el adulto: 800 mg de Sulfametoxazol y 160 mg de Trimetoprim cada 12 horas durante 10 a 14 días para el tratamiento de la mayoría de las infecciones y mayor en casos de enfermedades graves (Para neumonía por *P. carinii*, hasta 120 mg/kg peso/ 24 horas de Co-Trimoxazol dividido en 2 a 4 dosis durante 14 días). Las dosis deben ser reducidas en pacientes con insuficiencia renal y el medicamento no debe de ser administrado si la depuración de creatinina es menor a 15 mL/min.

Dosis recomendada en el niño: Para el tratamiento de infecciones del tracto urinario y la otitis media la dosis recomendada es de 8 mg/kg de Trimetoprim y de 40 mg/kg de Sulfametoxazol por 24 horas, administrados en dos tomas divididas cada 12 horas durante 10 días; el mismo régimen es recomendado en el tratamiento de la Shigellosis.

Contraindicaciones: La combinación no debe de usarse en niños menores de 2 meses, ni durante el embarazo (a término), ni durante la lactancia.

2.1.3.7. Reacciones adversas ^(1, 3, 4):

Efectos dermatológicos: aproximadamente el 75% de los efectos desfavorables afectan la piel (dermatitis, reacciones fotosensibles, urticaria, prurito, varios tipos de eritemas, etc.).

Efectos gastrointestinales: los principales son vómitos y náuseas, la diarrea es rara. La glositis y estomacitis son relativamente comunes. Se ha observado ictericia leve y transitoria y también casos de pancreatitis y hepatotoxicidad.

Efectos hematológicos: diversos tipos de anemia, trastornos de la coagulación, granulocitopenia, agranulocitosis, púrpura, y sulfhemoglobinosis.

Nefrotoxicidad: insuficiencia renal, dolores lumbares, hematuria, oliguria y anuria (porque el Sulfametoxazol puede cristalizar en la orina)

Efectos sobre el Sistema Nervioso Central (SNC): cefalea, depresión, alucinación (producidos por la Sulfonamida).

Otros: neuropatía óptica, hipotiroidismo, reacciones neurológicas (ataxia, mareos, cansancio, dolor de cabeza, insomnio, vértigo, etc.), fiebre, complicación hepática.

Reacciones adversas en pacientes con SIDA: Se observó un aumento de la frecuencia de reacciones adversas (tales como fiebre, malestar general, eritema cutáneo, neutropenia y trombocitopenia) en pacientes con SIDA y con neumonía por *P. carinii* donde altas dosis de Cotrimoxazol son administradas.

2.1.3.8. Interacciones entre fármacos (a):

Hay reportes de interacciones de Co-Trimoxazol con varios fármacos y en general con las Sulfonamidas quienes inhiben el metabolismo y/o desplazan de las proteínas los fármacos, resultando así en un incremento o prolongación de los efectos terapéuticos y/o tóxicos de estos fármacos:

a. Aumento de la actividad de anticoagulantes (como Warfarina), antiepilépticos (como Fenitoina), agentes sulfonilurea antidiabéticos (como clorpropamida) por una administración conjunta con Co-Trimoxazol.

b. Aumento de la toxicidad de algunos agentes antineoplásicos (como Melotrexate) por una administración conjunta con Co-Trimoxazol.

2.1.3.9. Contraindicaciones y precauciones (a):

Contraindicaciones:

- Alergia a las Sulfonamidas, Trimetoprim, Furosemida, Tiazidas, Sulfonilurea, Inhibidores de Carbono Anhidrasa.

Precauciones:

Es importante analizar la relación Beneficio/Riesgo antes de decidir si administrar o no el Co-Trimoxazol en los siguientes casos:

- El riesgo de reacciones adversas es mayor en los acetiladores lentos que en los acetiladores rápidos ya que el Sulfametoxazol es metabolizado principalmente por esta vía.

- Anemia Megaloblastica (por deficiencia del folato) ya que el Trimetoprim puede causar deficiencia del ácido fólico y Sulfametoxazol y Trimetoprim pueden causar discrasia del sangre.

- **Deficiencia del Glucosa 6 Fosfato Dehidrogenasa (G6PD)** ya que puede provocar una hemólisis.

- **Insuficiencia hepática** ya que ambos fármacos son metabolizados en el hígado.

- **Insuficiencia renal** ya que ambos fármacos son excretados por vía renal.

2.1.3.10. Interacciones fisicoquímicas:

Se presenta interacción entre el Sulfametoxazol y el Trimetoprim, sin embargo no es considerada como una incompatibilidad. En el proceso de manufactura la interacción puede ser inducida por calor y/o por humedad.

2.2 FORMULACIÓN DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL COMPRIMIDOS.

2.2.1 FILOSOFÍA DE DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN ^(19, 20)

Hasta mediados de los 80's, México tenía una economía cerrada, y una industria farmacéutica local altamente protegida, con escasa exposición a los mercados internacionales. El tratado de libre comercio de Norteamérica (NAFTA o TLC) entre México, E.U. y Canadá ha sido proclamado por el gobierno mexicano como una oportunidad y un gran reto para el país. El tratado promete atraer una gran inversión, necesaria para el país, al eliminar barreras comerciales, estableciendo reglamentos de inversión transparentes y no discriminatorios, y establecer un mecanismo de arbitraje para discusiones de tipo comercial. Se espera promover el desarrollo económico, impulsar el empleo y generar una alza de salarios. Sin embargo, la pregunta a hacerse es si las industrias mexicanas se prepararan para el reto de competir en forma efectiva bajo un tratado de libre comercio. El TLC establece un área de libre comercio con 360 millones de personas y una economía anual de aproximadamente \$ 6000 billones de dólares con un consumo de 30 % aproximadamente de la producción farmacéutica mundial. La venta de productos farmacéuticos en México se eleva a un total de \$ 2000 millones de dólares al año. Con muy pocas excepciones, las empresas mexicanas no cuentan con la infraestructura para realizar investigación. Una posible buena área de competencia de la industria farmacéutica mexicana sería en el desarrollo del mercado de genéricos produciéndolos en calidad y cantidad, sin embargo esto requiere primero cambios a la legislación actual. Un mercado de genéricos seguro y exitoso requiere de estándares de calidad rigurosos, biodisponibilidad y pruebas de bioequivalencia, adhesión a Buenas Prácticas de Manufactura (BPM o GMP's); una infraestructura de farmacia satisfactoria con personal capacitado y una fuerte protección de patente. Esto podría estimular el crecimiento de la investigación aplicada en la industria farmacéutica nacional, dando como resultado la producción de medicamentos que cuenten con un marco de desarrollo e investigación apropiado, y como consecuencia mejores productos en el mercado nacional así como la posibilidad de exportación de ellos. Por otro lado es importante recordar que el medicamento es un agente de salud por lo que requiere ser desarrollado con los estudios técnicos necesarios y con

un control total de la calidad para alcanzar el objetivo primordial que todo fabricante debe de cumplir: el asegurar que cada unidad de dosificación elaborada cumpla con las características de calidad diseñadas o dicho de otra manera que permita "construir la calidad" en lugar de "tratar de controlarla".

"El desarrollo de medicamentos es un conjunto de actividades que se realizan dentro del conocimiento de la ciencia, la tecnología, el arte y la ética farmacéutica, destinada a obtener el máximo aprovechamiento de un medicamento para el beneficio del enfermo".

Para poder llevar a cabo su labor de manera adecuada, el departamento de formulaciones deberá desarrollar una infraestructura técnica, científica y administrativa que incluya informes de tecnología, la creación y extensión continua de acervo de conocimientos tanto tecnológicos como regulatorios que puedan funcionar como banco de datos y como fuente de educación y desarrollo para el personal del laboratorio y de la empresa en general para tener mayor cantidad de información sobre los avances y situaciones tecnológicas del entorno que le rodea y, en especial de los competidores, teniendo como objetivo final lograr la ansiada innovación de acuerdo con las pretensiones de cada empresa o individuo.

Las funciones y actividades de un departamento de desarrollo farmacéutico son obtener la mayor información posible a través de una búsqueda bibliográfica, definir objetivos (entre ellos la forma de dosificación), realizar una caracterización del principio activo y excipientes, realizar estudios de preformulación, seleccionar los excipientes y materiales de empaque más idóneos y elegir y desarrollar el proceso de manufactura más adecuado para la forma de dosificación elegida. Se necesita establecer la eficacia, seguridad, estabilidad y aceptación del producto. Se necesita reconocer y evaluar las variables críticas del proceso y controlarlas por medio de establecimiento de especificaciones y límites adecuados. Por esto es necesario el apoyo de un departamento de desarrollo analítico para desarrollar y validar los métodos analíticos necesarios que aseguren la calidad y estabilidad del producto. Las actividades de un departamento de desarrollo incluyen también la capacitación del personal y la transferencia de la tecnología.

También es necesario el apoyo de los departamentos clínico, analítico y estadístico para los estudios en humanos.

Las formas farmacéuticas sólidas son indiscutiblemente la vía de administración preferida, pues desde el punto de vista del paciente son económicas, compactas, fáciles de administrar y fáciles de transportar.

La metodología sistematizada propuesta a seguir para cada medicamento a desarrollar consiste de los siguientes pasos generales:

1. Revisión bibliográfica
2. Selección de tecnología
3. Preformulación
4. Formulación
5. Robustez
6. Transferencia de tecnología
7. Escalamiento y validación del proceso

A continuación se desarrollan algunos de estos pasos:

2.2.1.1 PREFORMULACIÓN:

Esta etapa incluye:

- Un entendimiento fisicoquímico del principio activo
- Estudios de confrontación Principio activo-Excipientes (evaluadas por Calorimetría Diferencial de Barrido y cambios de aspecto organolépticos en condiciones de estabilidad acelerada (temperatura y humedad elevadas)).
- Caracterización de principio activo y excipientes de la formulación (Distribución de tamaño de partícula y propiedades reológicas).
- Estudios de reproducibilidad interlote e interproveedores.

Basados en los resultados de preformulación, los recursos tecnológicos de la empresa, la disponibilidad de los excipientes, la reproducibilidad de los proveedores, la definición terapéutica, los estudios de mercadotecnia, y la regulación, se debe de seleccionar la forma farmacéutica, sus componentes y la presentación definitiva del producto.

2.2.1.2 FORMULACIÓN

Esta etapa incluye:

- El desarrollo de las formulaciones primarias (Elección de los componentes, equipos y procesos a emplear)
- La igualación de perfil de disolución con respecto al innovador, cambiando las concentraciones de los excipientes.
- Pruebas de repetibilidad

2.2.1.3 ROBUSTEZ

Esta etapa incluye:

A. La evaluación de las variables críticas de la formulación y del proceso.

1. Variables relativas a la formulación:

La variación de las características de los principios activos y excipientes son posiblemente los factores que proporcionan mayor variación en las características del producto terminado:

Por ejemplo cambios de distribución de tamaño de partícula, cristalinidad, agua de hidratación, etc. pueden afectar características tales como:

- Variación de peso
- Modificación de las propiedades de flujo
- Compactabilidad
- Requerimientos de lubricación
- Características de humectación
- Cambios en la velocidad de disolución, etc...

2. Variables relativas al proceso tales como:

- Abertura de mallas
- Orden de adición de componentes
- Tiempos y velocidad de mezclado
- Capacidad, carga y principio de funcionamiento de los equipos utilizados
- Tiempos y velocidad de humectación
- Temperatura, tiempo y tipo de lecho de secado empleado
- Velocidad de rotación de la tableteadora y fuerza de compresión

B. Pruebas de reproducibilidad

Las pruebas de reproducibilidad basadas en los resultados de la caracterización de los principios activos y excipientes durante la fase de preformulación, en conjunto con la prueba de las variables de formulación y proceso en sus extremos nos ayudará a desarrollar una formulación más robusta así como establecer las especificaciones de la formulación y del proceso para obtener un producto de calidad constante.

2.2.1.4 TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA Y ESCALAMIENTO:

El escalamiento es un proceso de incremento de tamaño de lote y su meta es fabricar un producto a gran escala que mantenga las mismas características que el lote obtenido en la fase de desarrollo.

Esta etapa de transferencia de tecnología y escalamiento involucra cambios de tamaño de lote, de capacidad de equipos y por lo tanto de eficiencia, de personal, instalaciones, etc.

Por esto es primordial antes de realizar un escalamiento, definir y conocer las variables críticas de la formulación y el proceso para poder resolver los problemas que podrían ocurrir durante esta fase.

Dentro de la literatura se encuentran reportados una variedad de problemas relacionados al escalamiento con respecto a los procesos involucrados tales como:

- Problemas de lubricación:

Es conocido que lubricantes eficientes, como el Estearato de Magnesio, tienen efectos negativos sobre la dureza, velocidad de desintegración y disolución del fármaco (21, 22, 23). Este efecto no depende sólo de los componentes del comprimido y de la concentración de lubricante utilizado, sino también del tiempo y procedimiento de mezclado. Se han observado diferencias del efecto de lubricación según el tamaño y la carga del mezclador (aun cuando fueron operados a la misma velocidad de rotación) probablemente debido a diferencias en las fuerzas de corte generadas durante el mezclado y por lo tanto a una formación diferente de la capa lubricante.

- Problemas durante la granulación húmeda en mezcladores de alta velocidad (24):

Se fabricaron granulados en nueve diferentes mezcladores de alta velocidad de tamaños desde 5 hasta 300 litros encontrando que en los mezcladores de mayor volumen la distribución de líquido es menos homogénea y por lo tanto conlleva a una distribución de tamaño de granulo más amplia y una alta porosidad intragranular, esto probablemente debido a que existe menos contacto entre las espas y la masa húmeda.

El proceso de transferencia de tecnología y escalamiento no concluye al terminar el primer lote exitosamente, sino que incluye un proceso de validación para asegurar que el proceso es reproducible y que la producción futura será de calidad.

2.2.1.5 DISOLUCIÓN (25, 26):

En años recientes se ha prestado mucha atención al problema de biodisponibilidad de los fármacos. El papel del proceso de disolución en la eficiencia de una forma farmacéutica sólida (comprimidos, cápsulas, etc.) ha sido objeto de extensas investigaciones en los últimos años y se estableció la importancia de la cinética de disolución en la disponibilidad biológica. También Nelson y otros investigadores han reafirmado que el proceso de absorción de fármacos a nivel gastrointestinal está controlado por la velocidad con que estos se disuelven en los medios fisiológicos, ya que el mecanismo más generalizado de absorción es la de difusión pasiva de las

moléculas disueltas, especialmente bajo su forma no ionizada, a través del epitelio gastrointestinal.

2.2.1.5.1 DEFINICIÓN (25, 26):

La velocidad de disolución puede ser definida como la velocidad con la cual un soluto cambia de un estado que puede ser cristalino o amorfó a otro estado en forma de dispersión molecular en el disolvente.

2.2.1.5.2 FACTORES QUE AFECTAN LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN (25, 26):

Los factores que afectan la velocidad de disolución pueden ser clasificados bajo cuatro categorías principales:

1. Factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas del fármaco tales como:

a. Solubilidad del fármaco:

La solubilidad es un parámetro termodinámico que representa la concentración de un fármaco en equilibrio con el solvente, la solubilidad del fármaco juega un papel primario en el control de la disolución de la forma farmacéutica. De acuerdo con la ecuación de Noyes-Whitney, la solubilidad del fármaco representa el factor más importante en la velocidad de disolución. Los datos de solubilidad pueden servir de predictor de posibles problemas de biodisponibilidad.

Dentro de los factores que pueden modificar la solubilidad de una sustancia están:

- La naturaleza química del sólido (esto se puede modificar usando las sales de las sustancias ácidas o básicas)

- El polimorfismo (generalmente las formas polimórficas más inestables son las más solubles)

- Las impurezas (Estas pueden inhibir la disolución)

b. Tamaño de partícula:

Existe una relación directa entre la superficie de contacto y la velocidad de disolución. Por lo tanto al reducir el tamaño de partícula generalmente se aumenta la velocidad de disolución. Sin

embargo puede ocurrir un fenómeno de agregación de partículas pequeñas y por lo tanto se reduce la superficie de contacto y por ende la velocidad de disolución. También si el compuesto tiene propiedades hidrofóbicas y el disolvente tiene pobres propiedades de mojado, la reducción de tamaño de partícula puede proporcionar una superficie efectiva más pequeña y por ende una velocidad de disolución más baja.

2. Factores relacionados con la formulación.

Se ha demostrado que productos con la misma formulación, manufacturados por diferentes empresas presentan diferencias apreciables en la velocidad de disolución probablemente por las características de los excipientes utilizados.

Los excipientes empleados en la preparación de formulaciones farmacéuticas sólidas, pueden ejercer diversos efectos sobre las características de disolución de los principios activos. De todas las formas farmacéuticas, los comprimidos son los que suelen presentar más a menudo problemas de disolución debido a su complejidad en cuanto a componentes y procesos a que se debe recurrir para obtener una forma farmacéutica aceptable.

a. Diluentes:

Se ha estudiado el efecto del almidón que es uno de los diluentes más usados y se vio que al aumentar su concentración se incrementa la velocidad de disolución debido a sus propiedades de desintegración.

b. Desintegrantes:

En general un desintegrante posee una capacidad de hinchamiento al contacto con el agua lo cual permite una desintegración del comprimido y una disgregación de los gránulos si éste se encuentra intragranularmente, lo cual favorece la velocidad de disolución.

Los almidones poseen características de buenos agentes desintegrantes que permiten obtener velocidades de disolución óptimas de los principios activos.

c. Aglutinantes:

De manera general, la adición de aglutinantes tendrá como consecuencia el aumento del tiempo de desintegración y por ende la disminución de la velocidad de disolución. Sin embargo,

para la granulación húmeda, se ha observado mejoramiento en la velocidad de disolución de fármacos pocos solubles por las propiedades hidrofílicas que imparte el aglutinante a la superficie de los gránulos (ejemplo: Polivinilpirrolidona).

d. Lubricantes:

La adición de lubricantes tales como el talco y el Estearato de magnesio, tienden a prolongar el tiempo de desintegración y por lo tanto la velocidad de disolución. Esto se explica por la formación de una capa hidrofóbica que impide la humectación de las partículas

3. Factores relacionados con el proceso de manufactura.

La tecnología empleada en la obtención de los comprimidos y las condiciones de trabajo pueden influir en alto grado en la velocidad de liberación de los principios activos y en consecuencia, afectar substancialmente su actividad farmacológica.

a. Método de humectación:

El proceso de granulación por lo general aumenta la velocidad de fármacos pocos solubles (los excipientes tienden a aumentar la hidrofílicidad de los principios activos). Si bien el método de granulación húmeda es ampliamente utilizado, este conlleva a varias desventajas, entre ellas la necesidad de secar y por lo tanto problemas de descomposición para los fármacos termolábiles y también puede afectar la uniformidad de contenido a través de la migración del soluto.

b. Efecto de la fuerza de compresión:

Existe una gran influencia de la fuerza de compresión sobre la densidad aparente, la porosidad, la dureza y el tiempo de desintegración.

4. Factores relacionados con el equipo y los parámetros de prueba.

La agitación, la temperatura, el pH y la viscosidad del medio influyen de manera importante sobre la velocidad de disolución.

2.3 MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS (27, 28):

2.3.1 DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS:

Los métodos analíticos usados para la determinación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos en muestras biológicas juegan un papel muy importante en la evaluación e interpretación de los datos de farmacocinética, biodisponibilidad y bioequivalencia. Es esencial utilizar métodos analíticos bien caracterizados y totalmente validados para obtener resultados confiables que puedan ser interpretados satisfactoriamente. Entre las técnicas bioanalíticas más utilizadas se incluyen (1) Métodos químicos y combinación de procedimientos (ej. GC, HPLC, GC-MS...) y (2) Métodos biológicos (ej. basados en procedimientos inmunológicos (ej. RIA, EMIT, ELISA), y basados en métodos microbiológicos).

El interés de la cromatografía en el análisis de fármacos se inicia en los años cincuenta, aplicándose desde entonces para seguir la síntesis de fármacos, asegurar su pureza, establecer la estabilidad de formas farmacéuticas para conocer su vida de anaquel, etc. Un enfoque diferente ocurrió en los setentas cuando la instrumentación, particularmente en la cromatografía en columna, incrementó la sensibilidad abriendo la posibilidad de valorar compuestos en fluidos biológicos, los cuales hasta entonces eran muy difíciles de analizar.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), es preferible sobre otras técnicas tales como la espectrofotometría UV o de Fluorescencia, ya que estas últimas no son lo suficientemente selectivas; en cuanto a la Cromatografía de Gases (GC), aunque está reportado que su capacidad de detección es mayor, tiene el inconveniente de que muchos fármacos son inestables a temperaturas altas y por lo tanto es necesario derivar las muestras; las técnicas de inmunoensayo muchas veces carecen de selectividad aunque son más rápidas y de fácil manejo en forma rutinaria.

La limpieza de las muestras biológicas para ser analizadas por cromatografía requiere de mucha atención ya que una limpieza inadecuada puede provocar una falencia en el análisis. Esta consiste en la extracción del fármaco y/o de sus metabolitos del material biológico y la purificación

del extracto obtenido removiendo impurezas que pudieran interferir con el sistema cromatográfico y disminuir la vida de la columna.

2.3.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS^(29, 30, 31):

La parte 320 del Code of Federal Register (CFR) Capítulo 21 de los Estados Unidos referente a los requisitos de Biodisponibilidad y/o Bioequivalencia, establece que para llevar a cabo estos estudios, es necesario que el método analítico usado para determinar la concentración del fármaco, o sus metabolitos en fluidos biológicos, o productos de excreción, o el método usado para medir un efecto farmacológico agudo debe mostrar que es exacto y lo suficientemente sensible para medir con precisión adecuada la concentración del fármaco o sus metabolitos. Así también requiere que el método analítico utilizado sea validado.

Desde la década de los ochentas se ha reportado que una de las causas más frecuentes de un rechazo de solicitudes para ventas en Estados Unidos es por una validación inadecuada del método analítico usado para demostrar la bioequivalencia.

La validación del método consiste en demostrar la adecuabilidad "in-vitro" o previa al estudio de los siguientes parámetros:

1. Intervalo lineal y función respuesta: El intervalo lineal es aquel sobre el cual el compuesto de interés será determinado. Se basa en la evaluación de muestras patrón en el fluido a analizar, las cuales definen la curva de calibración (curva patrón). Esta debe constituirse típicamente de 6 a 8 puntos de calibración (excluyendo blancos e incluyendo concentración mínima cuantificable), y define la función que describe la relación concentración-respuesta. Para métodos cromatográficos, se espera una relación lineal simple.

2. Límite de Cuantificación (CMC): Concentración más baja que puede ser determinada con exactitud y precisión adecuadas.

3. Límite de Detección (CMD): Concentración más baja detectada, pero no precisamente cuantificada en un método de análisis (generalmente 2 a 4 veces el nivel de ruido para un método cromatográfico).

4. Exactitud y Precisión:

a. La exactitud se define como la cercanía del valor experimental al compararlo contra el considerado real. Se reporta generalmente como desviación o porcentaje de desviación. La exactitud debe estar dentro del $\pm 15\%$ del valor real ($\pm 20\%$ para la Concentración Mínima Cuantificable (CMC)).

b. La precisión se define como la cercanía de resultados experimentales de la valoración de un fármaco determinados replicadamente. Puede ser dividido como precisión intradía (o repetibilidad) y precisión interdía (o reproducibilidad), es expresado comúnmente como coeficiente de variación (CV). La precisión intra e interdía debe ser menor al 15% de CV (menor al 20 % para la CMC).

5. Eficiencia de Extracción: Es la cantidad extraída del compuesto de interés y del estándar interno, si es usado, de la matriz biológica. No hay especificación para esto, sin embargo se desea que el recobro no sea menor al 50% para no comprometer la sensibilidad y si cercano al 100%. También es deseable que los porcentos de recobro sean constantes en el intervalo estudiado.

6. Especificidad: Diferenciación del compuesto de interés de los otros compuestos endógenos de la matriz biológica, metabolitos y productos de degradación conocidos.

7. Estabilidad: Con el objeto de asegurar la integridad del fármaco desde la toma de muestra hasta su análisis, se verifica la estabilidad de las muestras sometiéndolas a ciclos de congelación-descongelación, a temperatura de almacenamiento normales (en nuestro caso $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) y a temperatura ambiente en el disolvente de reconstitución. El criterio de aceptación para la estabilidad se basa en los criterios de aceptación de exactitud y precisión a lo largo del tiempo.

2.4. ESTUDIO PILOTO DE BIOEQUIVALENCIA DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL:

2.4.1. ASPECTOS GENERALES:

2.4.1.1. ASPECTOS REGULATORIOS (4.7.11):

En Estados Unidos (E.U), existen dos categorías de medicamentos: los de Prescripción y los "Over The Counter" (OTC).

- Un Medicamento de Prescripción: es calificado como un fármaco para uso en humanos que:

- 1) Puede crear una dependencia.
- 2) Es tóxico o puede provocar efectos secundarios graves. Por su método de administración, su dosificación estricta o su seguridad, debe ser administrado bajo supervisión.
- 3) Tiene un uso limitado bajo estrecha supervisión de un médico autorizado.

- OTC: Que puede ser despachado sin prescripción y generalmente ya es ampliamente reconocido como seguro y eficaz.

Antes de la comercialización de un medicamento en Estados Unidos, se debe primero obtener la aprobación respectiva de la FDA por medio de un registro tipo NDA o ANDA.

- NDA New Drug Application: Una solicitud de registro ante la FDA Food & Drug Administration para la aprobación de la comercialización de un nuevo fármaco en el cual se requiere demostrar la seguridad y eficacia del producto por medio de estudios apropiados en animales y humanos.

- ANDA Abbreviated New Drug Application: Una solicitud de registro ante la FDA para la aprobación de la comercialización de una copia (genérico) de un fármaco previamente aceptado por la FDA. Este ANDA no requiere demostrar la seguridad y eficacia del producto por medio de estudios apropiados en animales y humanos, sino solamente la calidad del producto y en la mayoría de los casos, su bioequivalencia en la cual se compara el producto de prueba contra el producto innovador.

2.4.1.2 DEFINICIONES:

Biodisponibilidad (29):

Es la velocidad y la cantidad a la cual una entidad activa es absorbida de un producto farmacéutico y se vuelve disponible en el sitio de acción.

Bioequivalencia (37):

Dos productos de misma dosis molar son considerados bioequivalentes cuando sus biodisponibilidades son estadísticamente no significativamente diferentes, y por lo tanto es poco probable que se produzcan efectos terapéuticos y/o efectos adversos clínicamente significativamente diferentes.

CAPITULO 3:

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS:

A. EQUIPO:

Mezclador de alta velocidad de 3 L de capacidad útil
Bomba peristáltica Glatt
Granulador Oscilatorio. Erweka Tipo FGS de 1 kg de Capacidad útil
Secador de lecho Fluido Uniglatt de 1.5 L de capacidad útil
Desecador de infrarrojo Mettler LP16
Mezclador de doble corozas Erweka de 3.5 L de capacidad útil
Tableteadora Manesty D3B
Balanzas semi-analíticas Mettler PM 480 y PM200
Parrillas de agitación Thermolyne
Tamizador vibratorio Erweka tipo UT
Friabilizador E.M.S.A.
Vortex Thermolyne
Desintegrador Elecsa Mod DED-30
Durometro Schleuniger E-2
Microscopio electrónico Nikon 108
Disolutor Hanson Research
Cromatógrafo de fotoarreglos de diodos Hewlett Packard
Congelador Ojeda.
Ultracongelador Harris.
Centrífuga con cabezal de canastas. Beckman TJ-6
Potenciometro. Beckman 45 pH-Meter
Balanza analítica. Mettler AE 260 Delta Range
Baño con control de temperatura. Polytherm
Sistema de evaporación con Nitrógeno. Polytherm
Equipo de filtración de agua. Millipore Milli-Q Water System

Sistema cromatográfico, Waters Associates

- a. Bomba Mod. 510
- b. Inyector automático, Mod Wisp 717
- c. Detector UV-VIS de longitud de onda variable Waters Mod. 486
- d. Integrador Mod. 745
- e. Columna analítica, μ Bondapak C18 de 3.9 mm de diámetro interno y 30.0 cm de longitud, tamaño de partícula de 10 μ m. Waters
- f. Columna analítica, Ultrasphere XL. ODS, de 4.6 mm de diámetro interno y 7.0 cm de longitud, tamaño de partícula de 3 μ m, Beckman.

B. REACTIVOS:

- Fosfato de Potasio Monobásico grado Reactivo Analítico ACS, (J.T. Baker).
- Acetonitrilo, grado HPLC. (Mallinckrodt Inc. y Fisher Scientific).
- Metanol, grado HPLC, (Mallinckrodt Inc.).
- Acetato de Etilo, grado Reactivo Analítico ACS, (Mallinckrodt Inc.)
- Hidróxido de Sodio, grado Reactivo Analítico ACS, (J. T. Baker)
- Cloroformo, grado HPLC. (J. T. Baker).
- Heparina Sódica, grado I-A, (Sigma Co.).
- Trimetoprim, Sustancia de Referencia USP. Rockville Maryland, Lote H-1.
- Sulfametoxazol, Sustancia de Referencia USP. Rockville, Maryland Lote H.
- Sulfisoxazol, Sustancia de Referencia Interna.
- Clorhidrato de Metocloproamida Sustancia de Referencia Interna.
- Cafeína anhidra Sustancia de Referencia Interna.
- Acido Salicílico Sustancia de Referencia USP, Rockville Maryland, Lote H-4.
- Naproxén Sustancia de Referencia Interna.

3.2 FORMULACIÓN DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL COMPRIMIDOS.

3.2.1. DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL COMPRIMIDOS.

3.2.1.1. PREFORMULACIÓN:

A. Se llevó a cabo un estudio de confrontación de los posibles candidatos como componentes de la formulación empleando cámaras de estabilidad de Temperatura Ambiental (T.A) y de 40°C/75%HR durante 3 meses y evaluando visualmente los cambios físicos de estas muestras en comparación con sus respectivos controles.

Los ingredientes analizados fueron:

- | | |
|------------------------------|--|
| Activos: | - Trimetoprim (TMP)
- Sulfametoxazol (SMX) |
| Aglutinantes: | - Amigel, Starch 1500 (Almidón Pregelatinizado)
- PVP (Polivinilpirrolidona)
- HPMC E50P (Hidroxipropil Metilcelulosa E50 Premium) |
| Desintegrantes: | - Primojel (Almidón Glicolato de Sodio)
- Acdisol (Croscarmelosa Sodica)
- Crospovidona (Poliplasdone) |
| Diluentes: | - Avicel pH 101 (Celulosa Microcristalina)
- Lactosa
- Fosfato de Calcio Anhidro |
| Lubricante/Deslizante | - Estearato de Magnesio (Est. Mg.)
- Estearato de Calcio (Est. Ca.)
- Talco |

B. Se llevó a cabo un estudio de características reológicas y distribución de tamaño de partícula y con base en estos resultados, el comportamiento tecnológico de los excipientes así

como en base al comportamiento de la formulación final deseado se eligió un excipiente por cada categoría citada anteriormente.

C. Se realizó un estudio de compatibilidad de Principio activo/Excipientes por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) utilizando un número más reducido de excipientes (uno por categoría) con el objetivo de confirmar la compatibilidad de los ingredientes de la formulación tentativa.

D. Se llevaron a cabo estudios de caracterización por DSC de los excipientes y principios activos. Estos estudios se llevaron a cabo en varios lotes de cada uno de los ingredientes para evaluar su reproducibilidad.

E. Se efectuó la evaluación de los proveedores de los activos y excipientes en función de la reproducibilidad interlote de las características reológicas, distribución de tamaño de partícula y comportamiento térmico.

F. Se llevó a cabo la caracterización del producto innovador en cuanto a sus características físicas, así como su perfil de disolución.

3.2.1.2 FORMULACIÓN y ROBUSTEZ:

1. De los resultados de estudios de preformulación obtenidos y las características finales deseadas, se eligieron los candidatos de excipientes y proveedores idóneos para el desarrollo de la formulación así como la vía húmeda para la fabricación de los comprimidos por las características reológicas de los dos activos (pobre flujos, ángulos de reposo altos y densidades bajas). Se desarrolló la formulación así como un procedimiento de fabricación para obtener

finalmente comprimidos que presentaran características físicas y químicas, particularmente en el comportamiento de liberación in-vitro y de estabilidad, adecuados.

2. Se identificaron y evaluaron algunas de las variables críticas de la formulación y del proceso. La evaluación se efectuó principalmente mediante las pruebas físicas (variación de peso, friabilidad, variación de dureza, desintegración, observación física y microscópica del comprimido) y perfiles de disolución.

Los perfiles de disolución se realizaron de la siguiente manera:

Aparato 2 (Paletas): 75 r.p.m.

Medio: Ácido clorhídrico 0.1 N.

Volumen: 900 mL.

Tiempos de muestreo: 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 30.0, 45.0, 60.0 minutos.

Tolerancia: No deberá disolverse menos de 70% (Q) en 60 minutos.

Procesamiento de la muestra: Tomar una alícuota del medio de disolución, filtrarla, adicionar una alícuota de la solución de estándar interno de Sulfisoxazol, llevar a volumen con la fase móvil, mezclar e inyectar 10 μ L al sistema cromatográfico que consiste en un HPLC, utilizando un detector de UV a una longitud de onda de 220 nm, una fase móvil compuesta de una solución reguladora de fosfatos y Acetonitrilo 85:15 a un pH de 3.5 ± 0.05 y con una columna Ultrasphere XL ODS, Beckman 4.6 mm DI x 7.0 cm de longitud y 3 μ de tamaño de partícula.

Las variables analizadas fueron:

- A. El efecto de la concentración del agente desintegrante.
- B. El efecto de la cantidad de agua utilizada para llevar a cabo el proceso de humectación.
- C. El efecto de la concentración del agente aglutinante.
- D. El efecto de la concentración del agente lubricante.
- E. El efecto de la dureza.

3. Se evaluó la repetibilidad del proceso. Se fabricaron dos lotes con la misma formulación y bajo el mismo procedimiento de fabricación y se evaluó si las características físicas así como el comportamiento de liberación de los dos principios activos era reproducible.

4. Se evaluó la estabilidad de los comprimidos. Se llevó a cabo la estabilidad acelerada durante 3 meses a 40°C/75%HR. Se analizaron los comprimidos en cuanto a Identificación, Uniformidad de Contenido, Valoración, Dureza, Friabilidad, Contenido de Agua y Prueba de disolución y se observaron los cambios.

5. Antes de llevar a cabo el estudio de bioequivalencia de los dos productos (producto innovador como de prueba), se efectuaron las siguientes pruebas farmacopelcas y otras:

- 1. Identificación.
- 2. Uniformidad de contenido
- 3. Valoración
- 4. Disolución
- 5. Descripción
- 6. Variación de peso
- 7. Dureza
- 8. Friabilidad
- 9. Desintegración

3.3. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS (27, 28):

Se desarrolló y validó un método confiable, específico y sensible con el objeto de cuantificar los fármacos con exactitud y precisión en el plasma de los voluntarios sanos que participaron en el estudio de bioequivalencia del producto desarrollado en el laboratorio.

3.3.1. DESARROLLO DEL MÉTODO (32, 33):

El método se basó en trabajos previos publicados en la literatura especializada (32, 33), los cuales permitieron establecer las condiciones iniciales de análisis, que a través del desarrollo se fueron modificando hasta lograr una adecuada extracción de los fármacos así como las condiciones cromatográficas que proporcionaran una mejor separación de Trimetoprim y Sulfametoxazol de los metabolitos y de los compuestos endógenos del plasma.

El método desarrollado para cuantificar Trimetoprim y Sulfametoxazol en plasma humano fue un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) utilizando Clorhidrato de Metoclopramida y Sulfisoxazol como estándares internos para Trimetoprim y Sulfametoxazol respectivamente. La preparación de la muestra consistió en la extracción de los compuestos de interés del plasma alcalinizado con Hidróxido de sodio y extracción con una mezcla de acetato de etilo/cloroforno (86:14 v/v), centrifugación, ajuste del pH de la muestra con Fosfato de potasio monobásico 0.5M y una segunda extracción con la mezcla de acetato de etilo/cloroforno (86:14v/v) y centrifugación. La mezcla de la fase orgánica de las dos extracciones se evaporó a sequedad y se reconstituyó en una mezcla de acetonitrilo/agua (25/75 v/v). Se inyectó un volumen de 60 µL en una columna µ-Bondapak C18 y se eluyó con una fase móvil constituida de Fosfato monobásico de potasio 0.01M:Acetonitrilo, 83:17 v/v, pH 3.5. Este procedimiento permitió una detección sin interferencias en la región cromatográfica de Trimetoprim y Sulfametoxazol y de sus

estándares internos (Clorhidrato de Metoclopramida y Sulfisoxazol respectivamente) al ser detectados al UV a 230 nm.

A continuación se presentan el diagrama de flujo del método para el tratamiento de la muestra y las condiciones cromatograficas de análisis para la cuantificación de Trimetoprim y Sulfametoxazol por HPLC.

Condiciones cromatográficas:

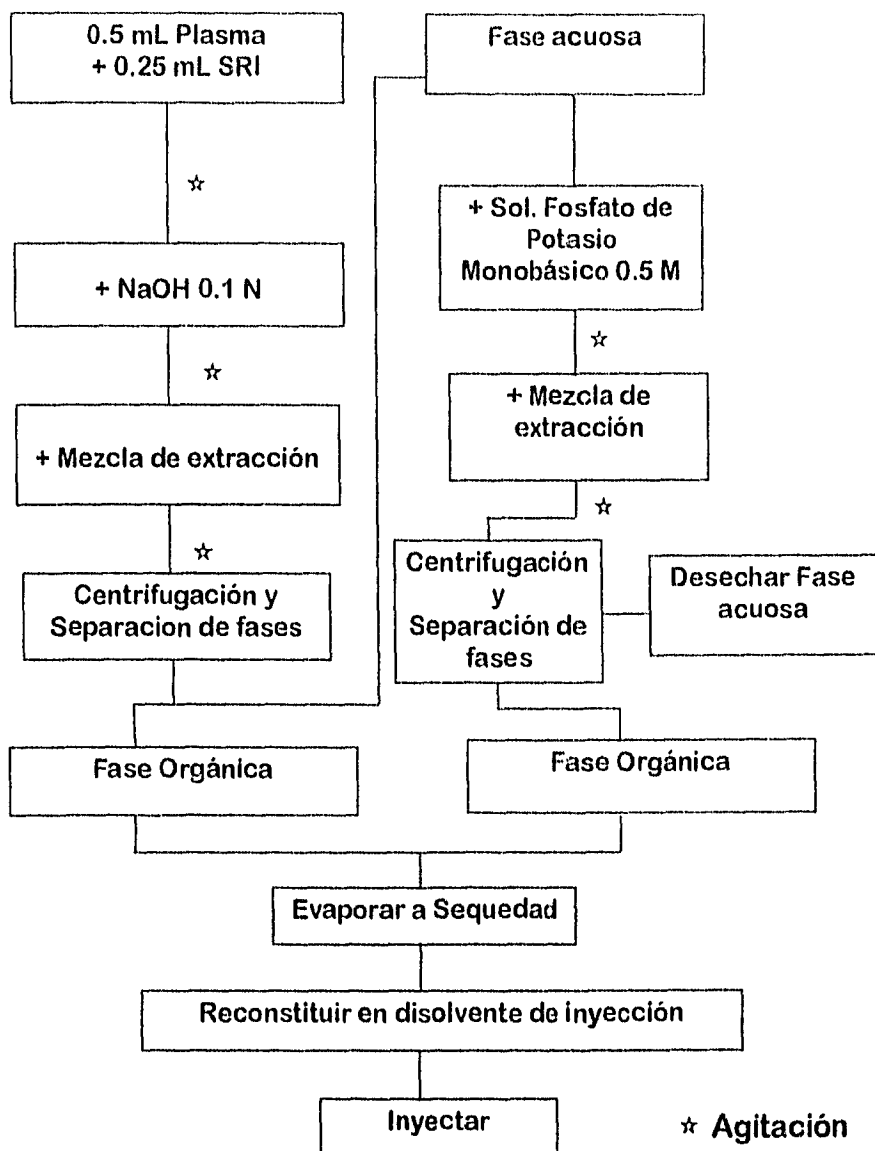
-Fase móvil: Solución de fosfato monobásico de potasio 0.01 M: Acetonitrilo HPLC 83:17
pH = 3.5

-Columna analítica: µBondapack C18.

-Detección: Ultravioleta a 230 nm.

-Volumen de inyección: 60 µL.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL METODO ANALITICO



3.3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación del método consistió en demostrar la adecuabilidad "in-vitro" o previa al estudio de los siguientes parámetros:

1. Intervalo lineal y función respuesta: El intervalo de trabajo se fijó de 0.100 a 3.000 µg/mL para Trimetoprim y de 1.750 a 75.000 µg/mL para Sulfametoxazol en plasma. Para su caracterización, se estableció una curva patrón en plasma con puntos calibradores a las concentraciones de 0.100, 0.150, 0.300, 0.600, 1.500, 3.000 µg/mL para Trimetoprim y de 1.750, 3.000, 6.000, 10.000, 40.000, 75.000 µg/mL para Sulfametoxazol. Esta curva se generó y procesó de manera independiente a los experimentos de precisión inter día. Para cada curva se realizó un análisis de mínimos cuadrados, tomando a la concentración como variable "X" y la respuesta (altura relativa del principio activo de interés respecto a su estándar interno respectivo) como variable "Y".

La evaluación de la función respuesta consistió en la verificación de la consistencia de las curvas generadas durante los cuatro días y del coeficiente de determinación de la recta generada, el cual no debería ser menor a 0.98.

2. Límite de Cuantificación (CMC): Se estableció con la concentración de 0.1 µg/mL para Trimetoprim y 1.75 µg/mL para Sulfametoxazol las cuales debían haber cumplido con el criterio de ± 20 % para la exactitud y precisión, además de ser la concentración más baja probada en la prueba de función respuesta

3. Límite de Detección (CMD): se estableció haciendo diluciones sucesivas de la concentración de 0.1 µg/mL para Trimetoprim y de 1.75 µg/mL para Sulfametoxazol analizándolas con el método propuesto y buscando obtener la dilución que produjera una señal de 2 a 4 veces la señal del ruido.

4. Exactitud y Precisión:

a. La precisión se evaluó en dos partes, precisión interdía y precisión intradía. Para este fin, se "cargaron" muestras de plasma a las concentraciones de 0.100, 1.400 y 2.500 µg/mL para Trimetoprim y 1.750, 37.50 y 65.000 µg/mL para Sulfametoxazol (curvas cruzadas: nivel alto de un activo junto con el nivel bajo del otro), las cuales se procesaron por triplicado durante tres días para la precisión interdía y por sextuplado en un solo día para la precisión intradía. Todas las muestras se interpolaron en su curva patrón.

Para la precisión interdía se obtuvo el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la concentración interpolada de todas las muestras obtenidas en los diferentes días que duró el experimento, dándose por buena si el coeficiente de variación era menor al 15% (menor de 20% en la CMC).

Para la precisión intradía, se obtuvo el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la concentración interpolada de todas las muestras de este experimento, dándose por buena si el coeficiente de variación era menor al 15% (menor de 20% en la CMC)

b. La exactitud se evaluó verificando que el promedio de la concentración interpolada en ambos experimentos de precisión no se alejara más del 15% de las concentraciones adicionadas (menor de 20% en la CMC)

5. Eficiencia de Extracción (Recobro absoluto):

La prueba de eficiencia de la extracción se realizó con disoluciones de Trimetoprim o Sulfametoxazol respectivamente en plasma y en agua, ambas a las mismas concentraciones (0.100, 0.150, 0.300, 0.600, 1.500, 3.000 para Trimetoprim y 1.750, 3.000, 6.000, 10.000, 40.000, 75.000 para Sulfametoxazol)

El recobro absoluto se obtuvo al comparar el promedio de la respuesta de cada concentración obtenida en plasma contra la correspondiente en agua. Para cada estándar interno, se comparó el promedio global de la respuesta de éste en las muestras en plasma contra el promedio global de la respuesta en las muestras en agua. Esa relación se expresó en porcentaje

6. Especificidad:

a. Se efectuó, analizando bajo el método propuesto, el plasma de 6 sujetos voluntarios individualmente, y se observó si éste presentaba interferencias en el área de los compuestos de interés.

b. Para asegurar la especificidad a metabolitos de ambos fármacos, se administró a 2 sujetos voluntarios sanos, una tableta del producto innovador y se obtuvieron muestras de plasma, las cuales se procesaron e inyectaron al sistema cromatográfico. Se verificó la pureza de los cromatogramas obtenidos con un detector de arreglo de diodos. Solo se detectó el metabolito principal de Sulfametoxazol (N4- Acetil Sulfametoxazol) el cual se separó del Sulfametoxazol para que no presente interferencias en el área de los compuestos de interés.

c. Se analizaron disoluciones de Cafeína, Acido Salicílico, Naproxen y Heparina, buscando aquellas sustancias que podrían ser interferencia potencial de los compuestos de interés.

7. Estabilidad:

La estabilidad se evaluó de diferentes maneras:

a. Estabilidad de la muestra procesada lista para su análisis. Se prepararon muestras de plasma adicionado de Trimetoprim o Sulfametoxazol según el caso; se procesaron por triplicado a cada concentración (0.100, 1.600, 2.750 µg /mL. para Trimetoprim y 1.750, 35.500, 70.000 µg/mL para Sulfametoxazol) y se cuantificaron a las 0, 24 y 48 horas después de haber sido colocado en el inyector automático del cromatógrafo siempre contra una curva patrón fresca. Se observó la consistencia de resultados a través del tiempo.

b. Estabilidad a ciclos de congelación-descongelación. Las muestras para el análisis de la precisión intradía se almacenaron y se sometieron a 3 ciclos de congelación-descongelación (-40°C / TA). de 24 horas cada uno. Al final de este período, se procesaron por triplicado a cada concentración y se cuantificaron contra una curva patrón fresca. La concentración promedio obtenida, se comparó contra la obtenida al tiempo cero.

c. Estabilidad de la muestra en condiciones de almacenamiento a -40°C . Se prepararon muestras de plasma adicionada de Trimetoprim o Sulfametoxazol según el caso, se procesaron por triplicado a cada concentración y se cuantificaron siempre contra una curva patrón fresca a los 30, 120, 150 y 180 días. Se observó la consistencia de resultados a través del tiempo.

3.4. ESTUDIO PILOTO DE BIOEQUIVALENCIA:

Con el objetivo de evaluar la formulación desarrollada, se decidió realizar un estudio de bioequivalencia piloto en 6 sujetos voluntarios sanos para estimar la probabilidad de éxito en la determinación de la bioequivalencia oficial con 24 sujetos voluntarios sanos y evaluar la conveniencia de escalar ésta formulación a nivel industrial y seguir con los trámites de registro para la comercialización del producto así como evaluar el número de sujetos y los tiempos de muestreo requeridos.

Se llevó a cabo un estudio de bioequivalencia piloto, simple ciego, de acuerdo a un diseño balanceado de 2x2 en 6 voluntarios sanos de sexo masculino (igual número de sujetos distribuidos al azar en dos grupos para cada período). El producto innovador, BACTRIM DS de los laboratorios ROCHE(4) fue asignado como formulación B y el producto a probar (producto desarrollado en el Laboratorio) como formulación A. Los dos productos (tabletas) contenían 160 mg de Trimetoprim y 800 mg de Sulfametoxazol. Se administró una dosis oral única. Los sujetos fueron confinados en la unidad de investigación clínica. El medicamento se administró después de un ayuno nocturno de 10 horas. La alimentación fue estandarizada y a horas específicas.

El protocolo fue remitido ante un Comité de Ética para su aprobación de acuerdo con la regulación de la parte 56 del CFR capítulo 21.

3.4.1. PROTOCOLO DEL ESTUDIO:

3.4.1.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS SUJETOS:

3.4.1.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Sujetos del sexo masculino entre 18 y 40 años de edad, pesos comprendidos entre 55 y 80 kg. Sus pesos deberán ser proporcionales a sus estaturas.
- Disponibilidad de los sujetos para completar los dos períodos del estudio.
- Sujetos con buena salud avalado por los resultados de sus historial clínico, un examen físico y estudios de laboratorio y electrocardiograma.
- Valores de laboratorio no más de $\pm 10\%$ fuera del rango normal (como es tabulado en "1983 Metropolitan Insurance Company Height and Weight tables").

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

3.4.1.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Los sujetos con antecedentes de hipersensibilidad a cualquier fármaco o cualquier alteración significativa cardiovascular, renal, hepática, metabólica, gastrointestinal, neurológica (incluyendo epilepsia), endocrinas o cualquier tipo de anemia u otras anormalidades sistémicas o de órganos.

- Sujetos que requieren administración de cualquier otro medicamento durante el estudio, además del medicamento que está siendo evaluado.

- Sujetos cuyos valores clínicos de laboratorio se desvían en $\pm 10\%$ de los rangos normales, a menos de que, a criterio del médico responsable, esto se considere como clínicamente no significativo (esto será reportado en las formas de reporte de casos).

-Sujetos que hayan sido hospitalizados por cualquier razón dentro de las 8 semanas previas al estudio o hayan tenido una enfermedad clínicamente importante dentro de las 4 semanas previas al estudio.

- Sujetos que hayan tomado un medicamento de investigación dentro de las 4 semanas previas al inicio del estudio.

- Sujetos que hayan tomado medicamentos (excepto analgésicos) durante los 14 días o 5 vidas medias (lo que sea más largo) previos al comienzo del estudio o han sido tratados dentro de los 3 meses previos con cualquier medicamento que tenga un potencial de toxicidad bien definido.

- Sujetos que hayan ingerido alcohol dentro de las 48 horas previas al inicio del periodo de confinamiento del estudio.

- Sujetos que hayan donado o perdido más de 450 mL de sangre dentro de los dos meses previos al estudio.

- Sujetos con historia de adicción a drogas o abuso de alcohol.

3.4.1.1.3. CARTA DE CONSENTIMIENTO DE LOS VOLUNTARIOS:

Los voluntarios fueron informados claramente del propósito del estudio, así como de los riesgos del mismo. Se les dió una compensación económica y firmaron una carta de consentimiento. (De acuerdo a la regulación de la parte 50 del CFR capítulo 21)

3.4.1.1.4. ANÁLISIS CLÍNICOS:

Los análisis realizados a los voluntarios fueron:

- Biometría Hemática: hemoglobina, hematócrito, conteo total de glóbulos rojos, conteo total de glóbulos blancos, conteo estimado de plaquetas.

- Química Sanguínea: sodio, potasio, urea, ácido urico, creatinina, fosfatasa alcalina, asparto aminotransferasa, alanina aminotransferasa, gama GT, bilirrubina total, glucosa, colesterol, triglicéridos, proteínas totales, albúmina y marcadores de hepatitis.

- VIH, prueba para enfermedades venéreas, coproparasitoscópico exclusivamente al ingreso.

- Uroanálisis: gravedad específica, pH, proteínas, cetonas, urobilinogeno, glucosa y examen microscópico.

- Electrocardiograma (12 derivaciones) exclusivamente al ingreso.

3.4.1.2. REACCIONES ADVERSAS:

Se planeó el estudio de tal manera que todos los signos y síntomas de las reacciones adversas que pudieran ocurrir durante el estudio fueran reportados, en detalle, en el reporte de caso de cada sujeto, incluyendo la naturaleza de los signos y/o de los síntomas, la fecha en que se detectó, el tiempo en que aparecieron en relación con la fecha de administración, la duración del efecto, la severidad, si se requirió o no tratamiento y si la reacción estuvo relacionada o no con la administración del fármaco.

Cualquier reacción severa o síntoma anormal tenía que ser informada inmediatamente al médico principal, y por escrito, al director, investigador principal y monitor del estudio así como a los integrantes del comité de ética.

3.4.1.3. MUESTRA DE SANGRE:

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 debidamente etiquetados y se congelaron a -40°C sin conservadores.

3.4.1.4. HORARIO DE TOMA DE MUESTRA:

El horario fue el siguiente: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 30.0, 36.0 horas posteriores a la administración de cada formulación.

Entre los dos períodos 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.

3.4.1.5. ANÁLISIS DE MUESTRAS PLASMÁTICAS:

Las muestras se analizaron siguiendo el método analítico para la cuantificación simultánea de Trimetoprim y Sulfamoxazol en plasma descrito en la sección 3.3.1.

3.4.1.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DEL ESTUDIO PILOTO DE BIOEQUIVALENCIA (39, 39, 40):

El cálculo de los parámetros farmacocinéticos así como el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa BIOPAK^(R). Se verificó los supuestos estadísticos de la ANOVA con el programa SAS^(R).

3.4.1.6.1. CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS:

Los parámetros calculados para cada sujeto fueron los siguientes:

- 1- El área bajo la curva desde tiempo cero y hasta el último tiempo de muestreo (AUC_{0-t}) calculado por el método trapezoidal.
- 2- El área bajo la curva desde tiempo cero y hasta infinito ($AUC_{0-\infty}$) calculado como $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t / K$.
- 3- La concentración plasmática máxima (C_{max}) obtenida directamente de los datos sin interpolación..
- 4- El tiempo al cual se alcanza la concentración máxima (T_{max}) obtenido directamente de los datos sin interpolación.
- 5- La constante de eliminación (K)
- 6- La vida media de eliminación ($t_{1/2}$).
- 7- El área bajo la curva del primer momento desde el tiempo cero y hasta el último tiempo de muestreo ($AUMC_{0-t}$)
- 8- El área bajo la curva del primer momento desde el tiempo cero y hasta infinito ($AUMC_{0-\infty}$)
- 9- El Tiempo medio de Residencia (MRT), tomando $MRT = AUMC_{0-\infty} / AUC_{0-\infty}$

La bioequivalencia de productos generalmente se basa sobre AUC, Cmax y Tmax. Dado la dificultad de determinar con precisión Cmax y Tmax, se utilizó AUMC como alternativa de Tmax por ser un indicador de la velocidad de absorción del fármaco con menor variabilidad. La velocidad de absorción está mejor relacionada con el MRT que con AUMC pero, para evitar errores de extrapolación inherentes al cálculo de MRT y evitar la evaluación estadística de AUMC/AUC, se utilizó AUMC en lugar de MRT. (38)

3.4.1.6.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO (38, 39, 40):

Las pruebas estadísticas efectuadas fueron las siguientes:

1- Análisis de varianzas (ANOVA) evaluando los siguientes efectos:

- a. Secuencia (llamado también grupo o orden)
- b. Sujeto, anidado a la secuencia
- c. Período
- d. Tratamiento (llamado también de fármaco o formulaciones)

El efecto de secuencia fue probado usando la media cuadrática de [sujeto(secuencia)] resultante de la ANOVA como el término de error. Todos los otros efectos fueron probados contra el residual del error (media cuadrática del error) resultante de la ANOVA.

2- Prueba de "I" doble unilateral de Shuirmann.

3- Intervalo de Confianza Clásico.

4- Intervalo de Confianza de Westlake.

5- Prueba de Anderson Hauck.

6- Cálculo del poder del análisis.

7- Cálculo del número de sujetos requeridos para el estudio de bioequivalencia formal para poder evaluar una diferencia del 20% con una certidumbre del 95% (Alfa de 0.05) en función de la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos usando la siguiente fórmula (40):

$$N_e >= [t(\text{Alfa}/2, 2n-2) + t(\text{Beta}, 2n-2)]^2 (CV/20)^2$$

Donde:

$$CV = 100 [(MSE)^{1/2} / \mu_R]$$

MSE : Media cuadrática del error

μ_R : Media del parámetro farmacocinético del producto de referencia

n: Cantidad de sujetos que participaron en el estudio

CAPITULO 4:

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

4.1 FORMULACIÓN DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL COMPRIMIDOS.

4.1.1. DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL COMPRIMIDOS.

4.1.1.1. PREFORMULACIÓN:

A. Del estudio de confrontación de los posibles candidatos como componentes de la formulación en cámaras de estabilidad de Temperatura Ambiental (T.A) y de 40°C/75%HR durante 3 meses, no se encontraron cambios físicos (color, apariencia, consistencia) para ninguna de las muestras analizadas (mezclas e Ingredientes solos). Por lo tanto se puede decir que todos estos componentes son compatibles a reserva de mayores estudios.

B. En la Tabla 2.1 y 2.2 se presentan los resultados de las pruebas reológicas de los excipientes elegidos y de los principios activos.

C. Del estudio de compatibilidad de Principio activo/Excipientes por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se obtuvo lo siguiente:

Los estudios de DSC de las mezclas de Trimetoprim con el diluyente y el lubricante así como las de Sulfametoxazol con el desintegrante, el diluyente y el lubricante no presentaron cambios en comparación con sus comportamientos térmicos individuales, por lo tanto se puede concluir que existe una alta probabilidad de que estos componentes sean compatibles.

En cuanto a las mezclas de Trimetoprim con el desintegrante y el aglutinante así como las mezclas de Sulfametoxazol con el aglutinante, se puede observar desplazamientos de las endotermas y/o desaparición de endotermas, lo cual nos hace pensar que podría haber una incompatibilidad entre estos componentes. Sin embargo, esto debe de ser confirmado por métodos adicionales tales como Cromatografía en capa fina. Nosotros verificaremos la

problemática de esta interacción a través de estudios de estabilidad de la formulación final a condiciones de estabilidad acelerada (40°C/ 75%HR, 3 meses) y estabilidad a largo plazo (T.A).

También la mezcla de Trimetoprim/Sulfametoxazol presentó aparición de varias endotermas y exotermas sin embargo, ésta interacción de la mezcla de estos activos esta ampliamente reportada y no esta considerada como incompatibilidad.

D. De los estudios de caracterización de varios lotes de los excipientes y principios activos por DSC, se obtuvo una reproducibilidad muy buena para todos excepto para el lubricante. Esto puede deberse a una diferencia de composición de los diferentes ácidos grasos que forman el lubricante. Estas diferencias podrían ser la causa de las diferencias en cuanto a sus propiedades de lubricación.

E. De la evaluación de los proveedores de los activos y excipientes en función de la reproducibilidad interlote de las características reológicas, distribución de tamaño de partícula y comportamiento térmico, se encontraron problemas de reproducibilidad y/o de distribución de tamaño de partícula con algunos de los proveedores de los activos por lo cual en los dos casos, se eligió trabajar con el proveedor 1 (Tabla 2.2). El aglutinante y el diluyente se comportaron de manera homogénea. El desintegrante (Gráfica 2.1) y el lubricante (Gráfica 2.2) presentaron distribuciones de tamaño de partícula muy variables por lo cual se pensó que esto podría afectar las características de desintegración y/o de disolución de los comprimidos y por lo tanto estos ingredientes merecieron una atención especial durante nuestro desarrollo.

En la Gráfica 2.1, se muestra la comparación de distribución de tamaño de partícula para tres lotes de desintegrante en la que se puede observar que el lote C tiene partículas más grandes en general, esta característica podría indicarnos que probablemente al usar este lote, los gránulos y/o comprimidos liberarían más rápidamente el principio activo ya que el mecanismo de acción de este desintegrante es por hinchamiento al contacto con el medio de disolución y al existir partículas más grandes, el poder de hinchamiento, y por lo tanto de disolución, sería mayor.

Se ha reportado⁽²²⁾ que la composición química del lubricante puede no alterar su funcionalidad, no así el contenido de humedad, el área superficial y el tamaño de partícula. El tamaño de partícula puede ser causante del retraso en la velocidad de disolución ya que al existir partículas más pequeñas (Lotes A y C en la Gráfica 2.2), se genera más fácilmente la película lubricante y esta actúa como una barrera hidrofóbica modificando las características de disolución del producto.

F. La caracterización del producto innovador en cuanto a sus características físicas se encuentra en la Tabla 2.3, y su perfil de disolución en las Gráficas 2.13 y 2.14.

4.1.1.2 FORMULACIÓN y ROBUSTEZ:

A. Efecto de la proporción del agente desintegrante (Gráficas 2.3 y 2.4):

Se observó como era esperado, que al aumentar la concentración de este, la velocidad de disolución, tanto de Trimetoprim como de Sulfametoxazol, aumentan.

B. Efecto de la cantidad de agua utilizada para llevar a cabo el proceso de humectación (Gráfica 2.5 y 2.6):

Se puede observar un efecto irregular del incremento del volumen del agua sobre los perfiles de disolución de Trimetoprim y de Sulfametoxazol, ya que al aumentar el volumen de agua (Y) la velocidad de disolución en los primeros minutos se ve aumentada, probablemente porque los espacios entre los granulados son más reducidos (porosidad menor) y por lo tanto el efecto de hinchamiento del agente desintegrante se ve aumentado. Al incrementar más importantemente el volumen de agua el efecto sobresaliente es el incremento de la dureza de los gránulos formados y una mayor resistencia a la infiltración del medio de disolución en los espacios entre gránulos, lo cual se refleja en un principio, en una disminución de la velocidad de disolución. Esto se explica también porque, al aumentar la cantidad de agua, el tamaño de los gránulos

obtenidos aumenta, y por lo tanto se reduce el área de superficie de contacto con el medio de disolución, lo cual resulta en un perfil de disolución más lento.

Se reporta (35) que los requerimientos de líquido de humectación se encuentran en un intervalo muy estrecho, especialmente cuando la granulación se lleva a cabo en granuladores de alta velocidad. La cantidad de agua depende de un gran número de factores tales como la propiedad del material, la distribución de tamaño de partícula, su forma y área superficial, la solubilidad, la capacidad de absorción, características del líquido tales como la viscosidad, la tensión superficial y factores debidos al equipo y a su mecanismo de acción.

C. Efecto de la concentración del agente aglutinante (Gráficas 2.7 y 2.8):

Se observó como era esperado, que al aumentar la concentración de este, la velocidad de disolución, tanto de Trimetoprim como de Sulfametoxazol, disminuyen.

D. Efecto de la concentración del agente lubricante:

Se encontró la concentración adecuada del lubricante para eliminar la adhesión a punzones sin provocar problemas de laminación y sin disminuir importantemente el perfil de disolución.

E. Efecto de la dureza (Gráfica 2.9 y 2.10):

Se observó que con diferencias de 3.5 Kp, el comportamiento de liberación de Sulfametoxazol se ve muy significativamente afectado (aproximadamente 20% de diferencia desde los 5 min. hasta los 15 min.) mientras que el comportamiento de liberación de Trimetoprim no se ve afectado por el incremento de la dureza.

El comportamiento de Sulfametoxazol puede atribuirse al cambio elástico-plástico, al aumento de las uniones interpartículas y a la disminución de la porosidad de los comprimidos que evitan que el medio de disolución penetre fácilmente al comprimido.

Así que se puede decir que mientras el perfil de disolución de Sulfametoxazol puede ser controlado por cambios de la dureza del comprimido, el de Trimetoprim no.

Existen reportes (36) donde relacionan el efecto de la fuerza de compresión con la velocidad de disolución, esta relación no es fácil de predecir, sin embargo, este efecto es dependiente de la presión y de las propiedades de los componentes de la fórmula. Si la fragmentación de los gránulos ocurre durante la compresión, la disolución es más rápida conforme la fuerza de compresión se incrementa, ya que la fragmentación incrementa el área superficial de contacto. Por el contrario, si las uniones de partículas son el fenómeno predominante en el proceso de compresión, el incremento de la fuerza causa un decremento en la disolución, porque al existir más uniones de partículas hay una disminución de las porosidades del comprimido, impidiendo que el medio de disolución penetre fácilmente al interior del comprimido.

F. Repetibilidad (Gráficas 2.11 y 2.12)

Se observó que las características físicas así como el comportamiento de liberación de los dos principios activos fue reproducible y por lo tanto el proceso puede ser declarado repetible.

G. Estabilidad

Se analizaron los comprimidos en cuanto a Identificación, Uniformidad de Contenido, Valoración, Dureza, Friabilidad, Contenido de Agua y Prueba de disolución sin observar cambios significativos por lo cual se podrá otorgar al producto por lo menos dos años de caducidad. El periodo de caducidad deberá ser confirmado, y en su caso podrá ser alargado, en función de los estudios de estabilidad a largo plazo que se realizarán con tres lotes fabricados a nivel industrial.

H. Igualación de perfiles:

En base a todo lo anterior se estableció la formulación así como el procedimiento a seguir obteniendo características físicas adecuadas (Tabla 2.3) y perfiles de disolución similares (Gráficas 2.13 y 2.14).

TABLA 2.1:

RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LOS EXCIPIENTES ELEGIDOS PARA LA FORMULACIÓN DE LOS COMPRIMIDOS DE TRIMETOPRIM (TMP) Y SULFAMETOXAZOL (SMX)

CARACTERISTICAS	TMP	SMX	Aglutinante	Desintegrante	Lubricante	Diluyente
Humedad Relativa (%)	0.36	0.46	3.51	2.16	5.1	4.2
Angulo de Reposo (°)	48.33	50.96	55.30	46.78	43.33	56.48
Vel. de Flujo (g/mL)	No Fluye	No Fluye	0.90	0.85	No Fluye	No Fluye
Densidad Aparente (g/mL)	0.154	0.213	0.830	0.834	0.296	0.296
Densidad Compactada (g/mL)	0.283	0.437	0.960	0.981	0.169	0.411
Indice de Compactabilidad (%)	45.58	51.26	18.50	14.99	19.52	27.9

TABLA 2.2:

RESULTADOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTICULA DE TRIMETOPRIM Y DE SULFAMETOXAZOL REALIZADA POR EL MÉTODO MICROSCÓPICO (NIKON 20X) DE DIFERENTES PROVEEDORES

TAMAÑO DE PARTICULAS (Micras)	TRIMETOPRIM				SULFAMETOXAZOL		
	LOTES PROVEEDOR 1		LOTES PROVEEDOR 2		LOTES PROVEEDOR 1		LOTE PROVEEDOR 2
	A	B	A	B	A	B	A
0.1-10	94.32	98.99	33.66	73.99	94.30	98.62	26.66
10.1-20	6	3	46.65	26.66	5.66	1.33	43.99
>20	0	0	21.53	0.33	0	0	30

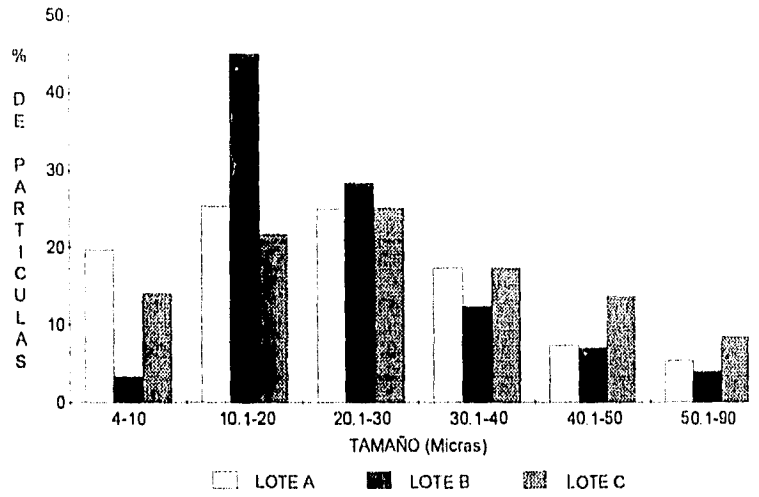
TABLA 2.3:

**RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS
PRODUCTOS INNOVADOR (B) Y DE PRUEBA (A) DE
TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL**

CARACTERISTICAS DEL PRODUCTO	INNOVADOR	GENERICO
Peso Promedio (mg)	1066.9	1114.7
Dureza Promedio (Kp)	14.00	12.65
Friabilidad (%)	0.311	0.200
Desintegracion (seg)	28	101

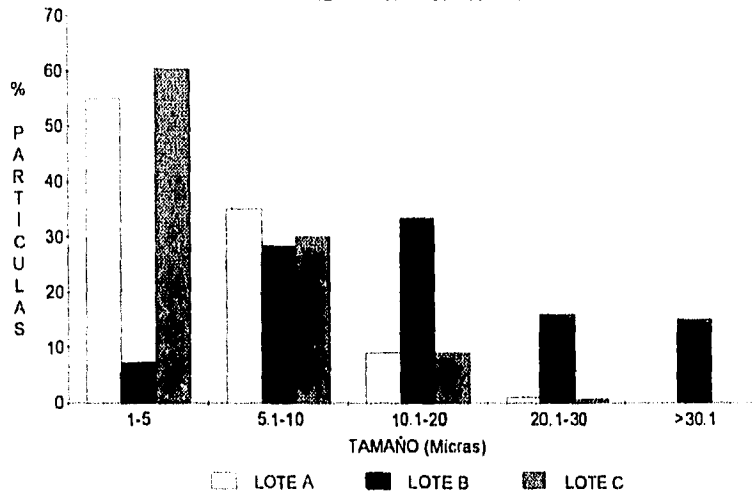
GRAFICA 2.1:

DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTICULA DE TRES LOTES DE UN MISMO PROVEEDOR DEL AGENTE DESINTEGRANTE

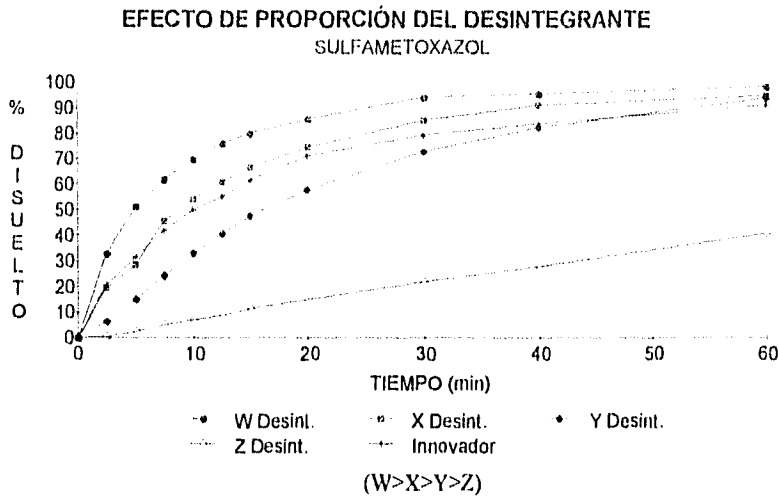


GRAFICA 2.2:

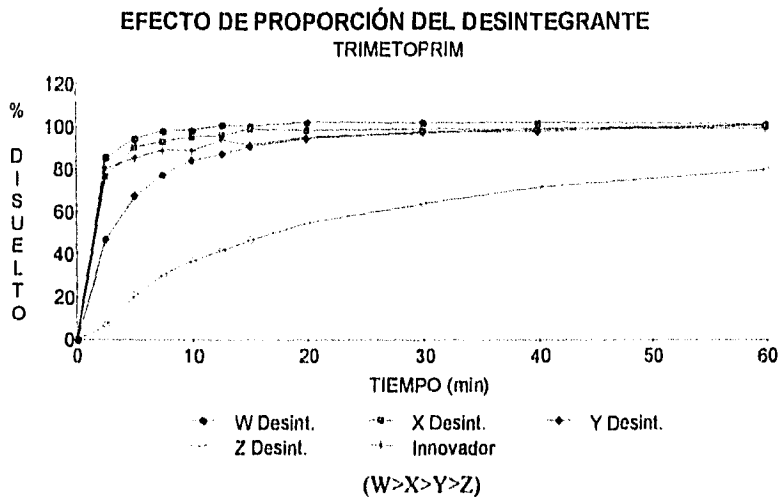
DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTICULA DE TRES LOTES DE UN MISMO PROVEEDOR DEL AGENTE LUBRICANTE



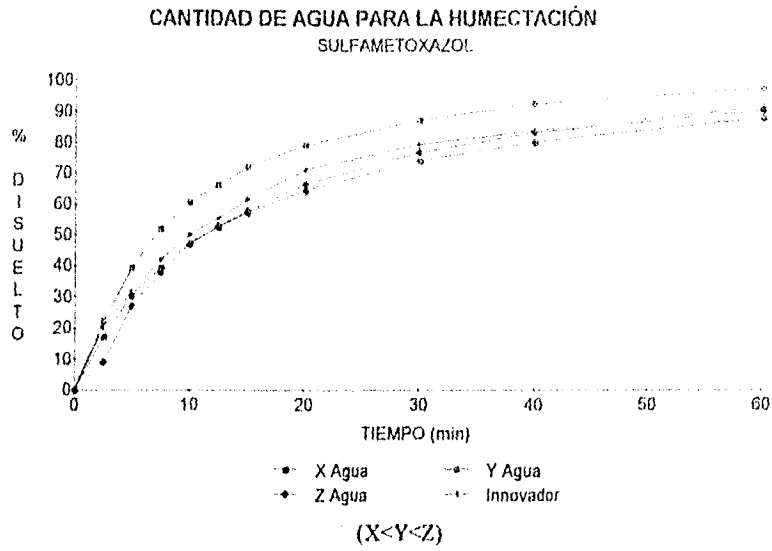
GRAFICA 2.3:



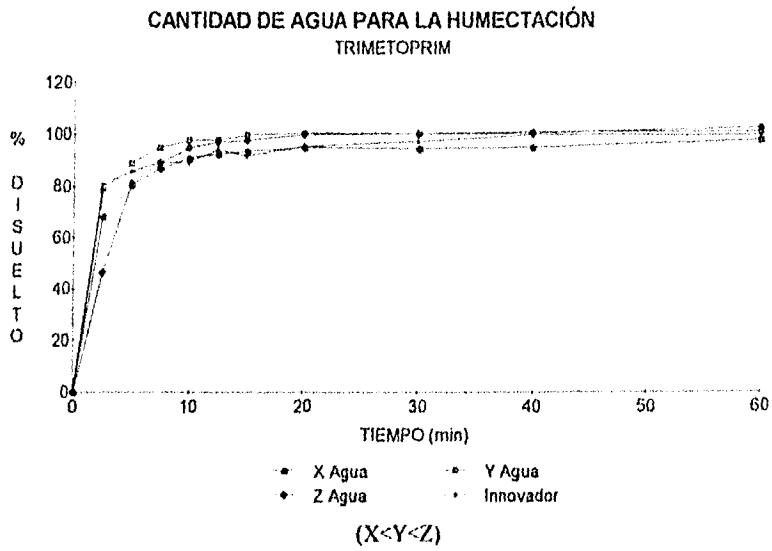
GRAFICA 2.4:



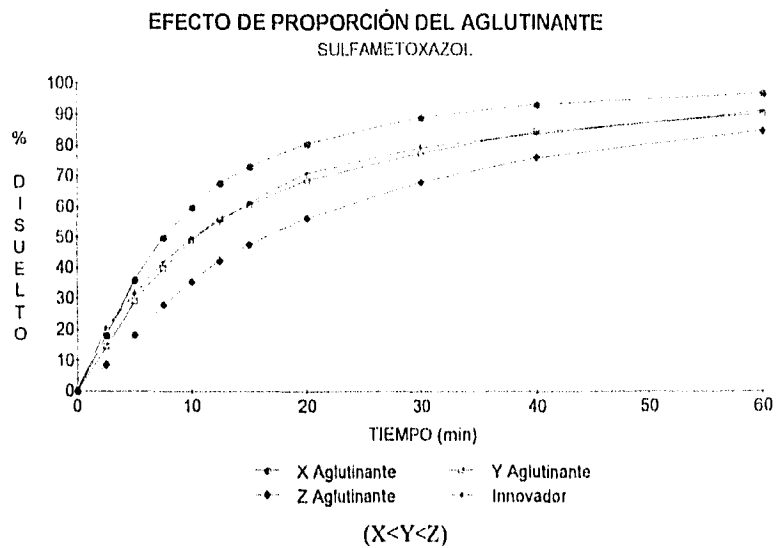
GRAFICA 2.5:



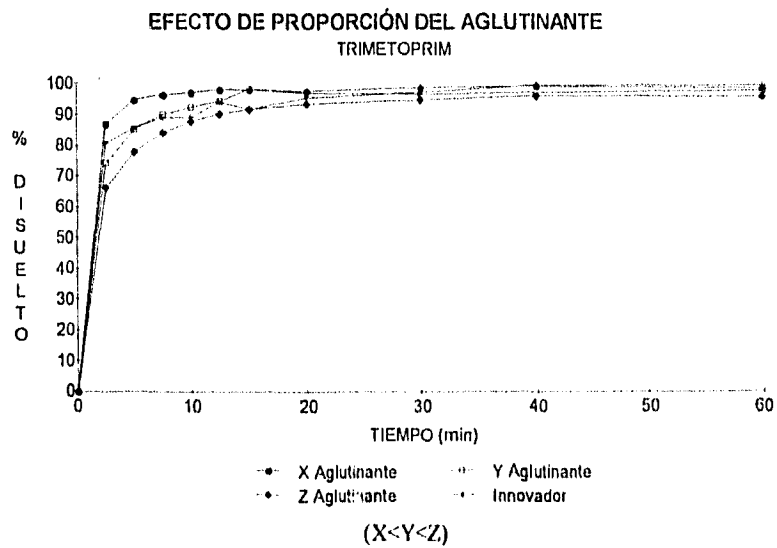
GRAFICA 2.6:



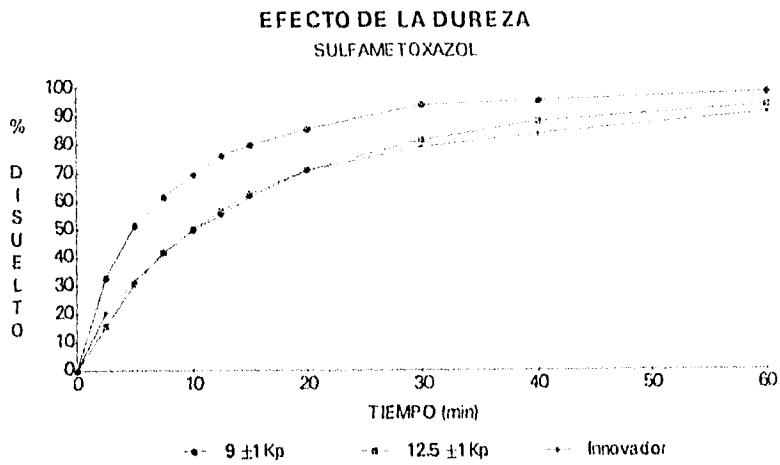
GRAFICA 2.7:



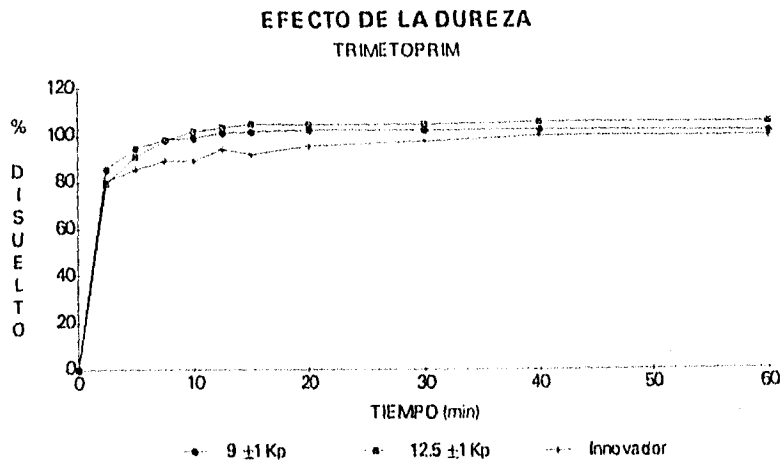
GRAFICA 2.8:



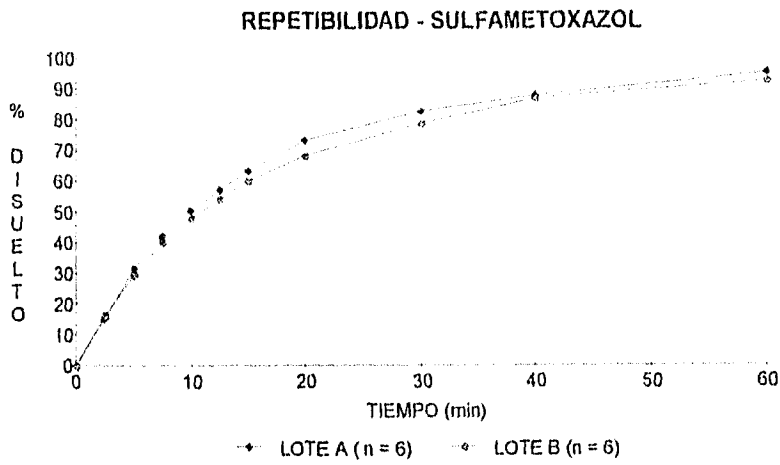
GRAFICA 2.9:



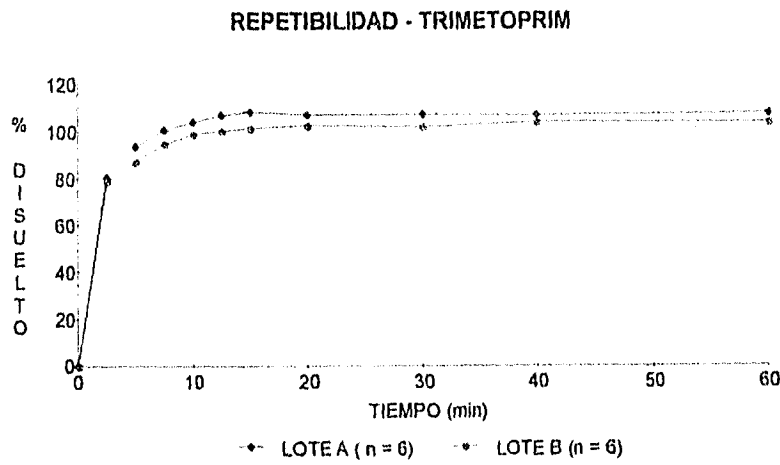
GRAFICA 2.10:



GRAFICA 2.11:

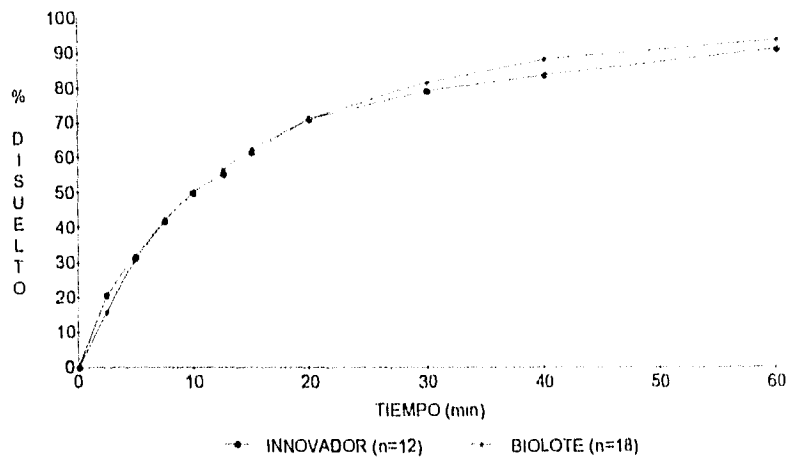


GRAFICA 2.12:



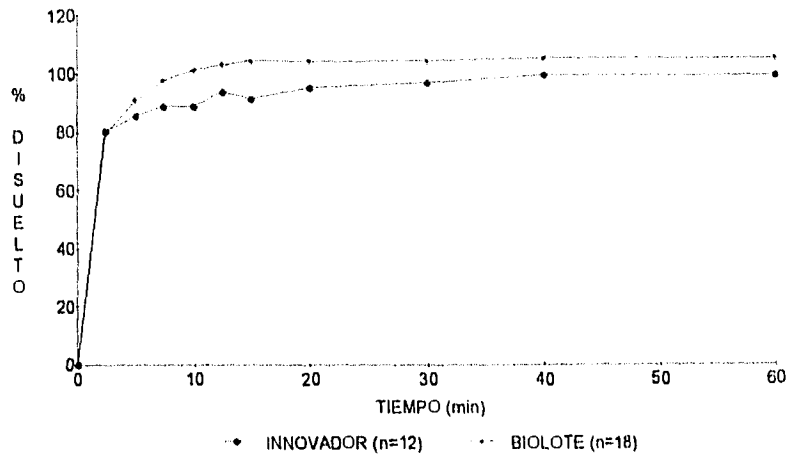
GRAFICA 2.13:

PERFIL DE DISOLUCIÓN - SULFAMETOXAZOL
INNOVADOR vs BIOLOTE



GRAFICA 2.14:

PERFIL DE DISOLUCIÓN - TRIMETOPRIM
INNOVADOR vs BIOLOTE



4.2. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS ^(27, 28):

4.2.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

Los resultados de validación fueron los siguientes:

1. Intervalo lineal y función respuesta:

El intervalo dinámico de trabajo se estableció de 0.1 a 3 µg/mL para Trimetoprim y de 1.75 a 75 µg/mL para Sulfametoxazol para los cuales se encontró una relación lineal entre la relación de alturas de picos (Fármaco/Estándar interno) y la concentración de Trimetoprim y Sulfametoxazol en las curvas patrón preparadas en cuatro días consecutivos. (Tabla 3.1, Figura 3.1 y Tabla 3.2, Figura 3.2 respectivamente).

2. Límite de Cuantificación:

El límite de cuantificación se estimó en 0.1 µg/mL para Trimetoprim y 1.75 µg/mL para Sulfametoxazol utilizando 0.5 mL de plasma.

3. Límite de Detección:

El límite de detección se estimó en 0.05 µg/mL para Trimetoprim y 1.0 µg/mL para Sulfametoxazol utilizando 0.5 mL de plasma.

4. Exactitud y Precisión:

En cuanto a la exactitud del método, se observa que la desviación máxima promedio encontrada en todas las concentraciones fue menor al 8% en todos los casos para ambos fármacos respecto al valor nominal. (Tabla 3.3 a 3.6).

La precisión intradía (o repetibilidad) sobre el intervalo dinámico de trabajo varió de 1.62 a 4.96 % para Trimetoprim y de 0.42 a 0.91% para Sulfametoxazol. (Tabla 3.5 y 3.6).

La precisión interdía (o reproducibilidad) mostró coeficientes de variación de 1.95 y 2.24% para Trimetoprim y de 0.66 a 1.84% para Sulfametoxazol en el intervalo de trabajo y de 14.23% y

17.29% para la concentración mínima cuantificable (CMC) de Trimetoprim y Sulfametoxazol respectivamente. (Tablas 3.3 y 3.4).

En todos los casos el método cumplió con los requisitos de precisión citados en la sección 3.3.2. inciso 4.a.

5. Eficiencia de Extracción:

El porcentaje de recobro promedio para Trimetoprim en plasma fue de 78.49% en el intervalo de 0.1 a 3.0 µg/mL y para Sulfametoxazol es de 78.46% en el intervalo de 1.75 a 70µg/mL y para sus estándares internos respectivos fue de 84.24% y 71.14% respectivamente. (Tablas 3.7 y 3.8)

6. Especificidad:

No se encontraron interferencias de metabolitos potenciales o compuestos endógenos del plasma que interfirieran en la región cromatográfica de Trimetoprim, Sulfametoxazol, Clorhidrato de Metoclopramida y Sulfizoxazol, ni tampoco de fármacos tales como Cafeína, Ácido Salicílico y Naproxén; asimismo, la Heparina no presentó interferencia. (Figura 3.5)

Los tiempos de retención aproximados de los diferentes compuestos fueron:

-Trimetoprim:	4.2 min.
-Clorhidrato de Metoclopramida:	7.4 min.
-Sulfametoxazol:	13.3 min.
-Sulfisoxazol:	16.4 min.

7. Estabilidad:

El Trimetoprim como el Sulfametoxazol en plasma resultaron ser estables a temperatura ambiente en el disolvente de reconstitución durante 48 horas (Tablas 3.9 y 3.10), en condiciones de almacenamiento a -40°C por 180 días (Figura 3.3 y 3.4) , así como después de 3 ciclos de congelación/descongelación de 24 horas cada uno. (Tablas 3.11 y 3.12).

TABLA 3.1

CURVA PATRÓN DE TRIMETOPRIM EN PLASMA.

DIA	PENDIENTE	INTERCEPTO	r ²
1	1.655512	-0.0230760	0.994602
2	1.636533	0.0255974	0.999840
3	1.608619	0.0247819	0.992856
4	1.626261	-0.0096962	0.999907

TABLA 3.2

CURVA PATRÓN DEL SULFAMETOXAZOL EN PLASMA.

DIA	PENDIENTE	INTERCEPTO	r ²
1	0.049973	-0.0169275	0.999951
2	0.048161	0.0080406	0.999966
3	0.050296	-0.0082041	0.999902
4	0.048713	-0.0063596	0.999960

TABLA 3.3

PRECISIÓN INTERDIA.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS ADICIONADAS DE TRIMETOPRIM (µg/mL).

DIA	REPLICA NÚMERO	CONCENTRACION ADICIONADA (µg/mL)		
		0.100	1.400	2.500
		CONCENTRACION CUANTIFICADA (µg/mL)		
1	1	0.110	1.475	2.402
	2	0.111	1.445	2.462
	3	0.109	1.444	2.450
2	1	0.092	1.461	2.471
	2	0.090	1.426	2.430
	3	0.080	1.442	2.394
3	1	0.085	1.426	2.375
	2	0.083	1.425	2.355
	3	0.078	1.461	2.349
n =		9	9	9
PROCEDIO =		0.083	1.454	2.411
D. E. =		0.0133 4	0.0293	0.0540
E. V. =		14.23	1.95	2.24
ERROR RELATIVO =		-7.00%	3.86%	-1.56%
LV PROCEDIO PARA TODOS LOS NIVELES DE CONCENTRACION PRUBADOS ES DE 4.8%				

TABLA 3.4

**PRECISIÓN INTERDÍA.
ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS ADICIONADAS DE SULFAMETOXAZOL (µg/mL).**

DÍA	REPETICIÓN	CONCENTRACION ADICIONADA (µg/mL)		
		65.000	37.500	1.750
		CONCENTRACION CUANTIFICADA (µg/mL)		
1	1	66.058	39.560	2.002
	2	67.322	38.814	2.087
2	2	65.110	39.281	2.111
	1	66.141	39.509	1.431
3	2	66.195	39.153	1.417
	3	66.259	39.381	1.436
3	1	65.527	39.133	1.885
	2	65.310	39.451	2.091
3	3	65.399	39.029	2.118
	n =		9	9
PROMEDIO =		65.421	39.267	1.843
D. E. =		1.2041	0.2591	0.3107
C. V. =		1.84	0.66	17.29
ERROR RELATIVO =		-0.45%	4.71%	-5.31%
CV PROMEDIO PARA TODOS LOS NIVELES DE CONCENTRACION PROBADO ES DE 7.6%				

TABLA 3.5

**PRECISIÓN INTRADÍA
ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS ADICIONADAS DE TRIMETOPRIM (µg/mL).**

MUESTRA	0.100	1.400	2.500
1	0.084	1.353	2.421
2	0.084	1.375	2.450
3	0.493	1.350	2.422
4	0.000	1.348	2.143
5	0.092	1.365	2.450
6	0.093	1.203	2.371
n =	6	6	6
PROMEDIO =	0.093	1.314	2.376
D.E. =	0.0015	0.0607	0.1178
C.V. =	1.62	4.58	4.96
% ERROR REL. =	-7.00%	-5.43%	-4.96%

TABLA 3.6

**PRECISIÓN INTRADÍA
ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS ADICIONADAS DE SULFAMETOXAZOL (µg/mL).**

MUESTRA	65.000	37.500	1.750
1	61.713	36.728	1.767
2	61.920	36.419	1.729
3	61.836	37.166	1.743
4	61.959	36.887	1.767
5	61.949	36.455	1.763
6	61.417	36.418	1.743
n =	6	6	6
PROMEDIO =	61.674	36.711	1.752
D.E. =	9.258	0.212	0.016
C.V. =	0.42	0.66	0.91
% ERROR REL. =	-5.12%	-2.10%	-0.11%

TABLA 3.7

PORCENTAJE DE RECOBRO ABSOLUTO DE TRIMETOPRIM EN PLASMA.

CONCENTRACION (µg/ml)	0.100	0.150	0.300	0.600	1.500	3.000
PORCENTAJE DE RECOBRO =	81.16	77.17	80.21	77.41	81.02	74.02
ESTADÍSTICOS DEL PORCENTAJE DE RECOBRO GLOBAL						
n =	6					
PROMEDIO =	78.49					
D.E. =	2.811					
C.V. =	3.58					

TABLA 3.8

PORCENTAJE DE RECOBRO ABSOLUTO DE SULFAMETOXAZOL EN PLASMA.

CONCENTRACION (µg/ml)	1.750	3.000	6.000	10.000	40.000	75.000
PORCENTAJE DE RECOBRO =	79.19	80.48	77.58	82.15	75.42	75.92
ESTADÍSTICOS DEL PORCENTAJE DE RECOBRO GLOBAL						
n =	6					
PROMEDIO =	78.46					
D.E. =	2.634					
C.V. =	3.36					

TABLA 3.9

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DE TRIMETOPRIM, PROCESADA A TEMPERATURA AMBIENTE.

HORAS	0.100	1.600	2.750
0.0	0.099 (99.00%)	1.605 (100.33%)	2.762 (100.44%)
24.0	0.099 (99.33%)	1.431 (89.46%)	2.471 (89.84%)
48.0	0.082 (81.67%)	1.488 (93.00%)	2.432 (88.45%)
* PROMEDIO DE TRES DETERMINACIONES			

TABLA 3.10

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DE SULFAMETOXAZOL, PROCESADA A TEMPERATURA AMBIENTE.

HORAS	70.000	35.500	1.750
0.0	72.123 (103.03%)	36.444 (102.66%)	1.799 (102.80%)
24.0	69.670 (99.53%)	35.334 (99.53%)	1.631 (93.18%)
48.0	70.075 (100.11%)	35.466 (99.91%)	1.794 (102.53%)
* PROMEDIO DE TRES DETERMINACIONES			

TABLA 3.11

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DE TRIMETOPRIM. CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DESPUES DE 3 CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN.

CONCENTRACIÓN	0.100	1.600	2.750
PROMEDIO (n=3)	0.102 (102.0%)	1.588 (99.3%)	2.761 (100.4%)

TABLA 3.12

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DE SULFAMETOXAZOL. CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DESPUES DE 3 CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN.

CONCENTRACIÓN	70.000	35.500	1.750
PROMEDIO (n=3)	74.381 (106.3%)	37.527 (105.7%)	2.078 (118.7%)

FIGURA 3.1

EJEMPLO DE CURVA PATRÓN TÍPICA EN PLASMA
TRIMETOPRIM (DIA 4)

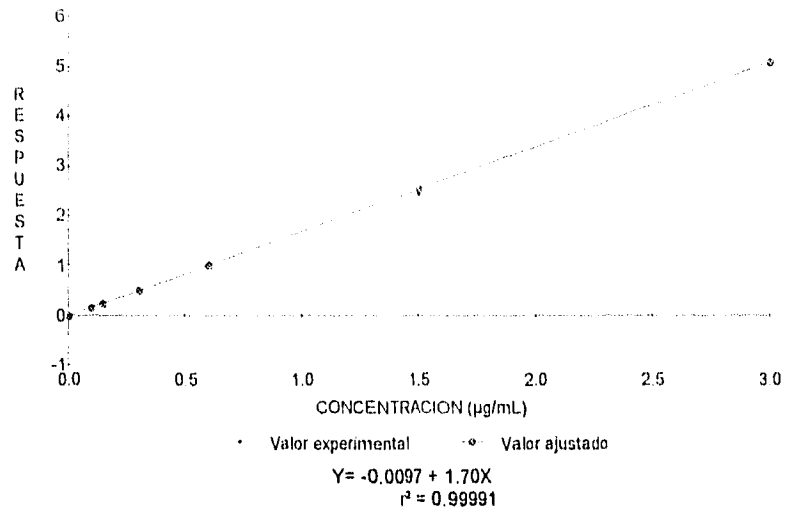


FIGURA 3.2

EJEMPLO DE CURVA PATRÓN TÍPICA EN PLASMA
SULFAMETOXAZOL (DIA 1)

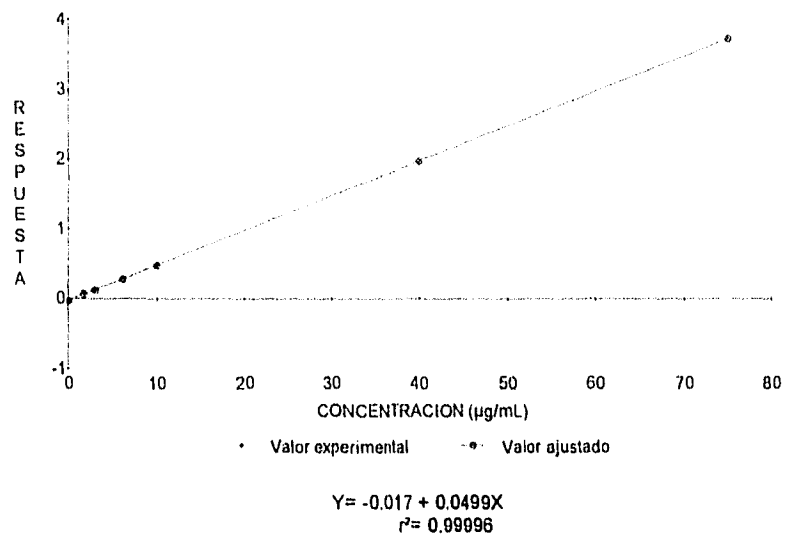


FIGURA 3.3

ESTABILIDAD DE TRIMETOPRIM A -40°C EN PLASMA
GRÁFICA TÍPICA /CONC. ALTA (2.75 µg/mL)

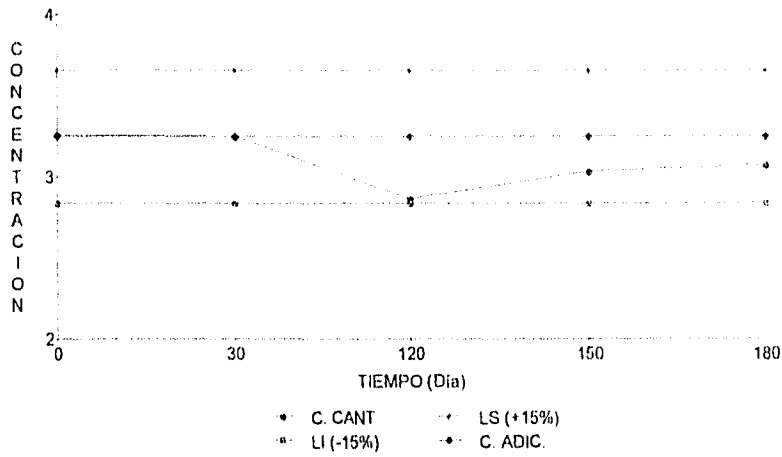


FIGURA 3.4

ESTABILIDAD DE SULFAMETOXAZOL A -40°C EN PLASMA
GRÁFICA TÍPICA /CONC. BAJA (1.75 µg/mL)

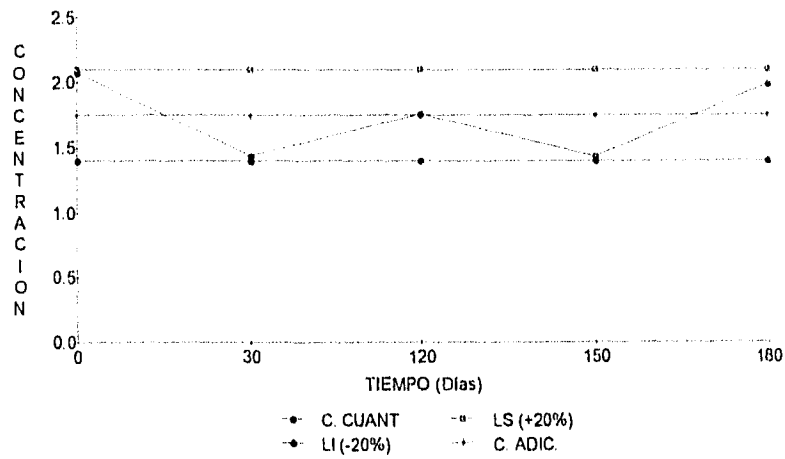
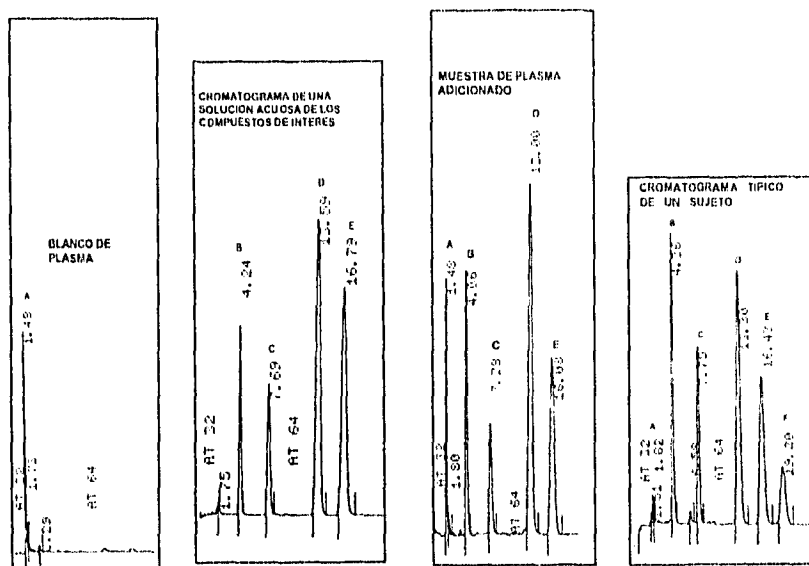


FIGURA 3.5

Cromatogramas típicos de muestras plasmáticas con Trimetoprim / Sulfametoxazol



A: Compuestos endogenos

B: Trimetoprim

C: Clorhidrato de Metoclopramida

D: Sulfametoxazol

E: Sulffsoxazol

F: N4-Acetil Sulfametoxazol

4.3. ESTUDIO PILOTO DE BIOEQUIVALENCIA DE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL COMPRIMIDOS:

4.3.1 PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS:

1. Una vez analizadas las muestras plasmáticas, los valores se interpolaron en la curva patrón correspondiente y se obtuvieron las concentraciones de cada sujeto para cada uno de los productos.

En las tablas y gráficas del Anexo A., se presentan los perfiles de concentración plasmática contra el tiempo de Trimetoprim y de Sulfametoxazol por sujeto y por formulación.

En las tablas 4.1 y 4.2, se presentan los resultados de concentración promedio y desviación estándar para cada fármaco de cada una de las formulaciones.

2. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos con ayuda del programa Biopak. En las tablas 4.3 a 4.6, se presentan los resultados para cada formulación por sujeto y por fármaco. En las tablas 4.7 y 4.8 se presentan los promedios y desviación estándar de estos parámetros farmacocinéticos por fármaco.

3. Tanto con Trimetoprim como con Sulfametoxazol, se puede observar una alta variabilidad intersujeto en las concentraciones plasmáticas (tablas 4.1 y 4.2) así como en algunos parámetros farmacocinéticos calculados (tablas 4.7 y 4.8). La variabilidad sin embargo es un poco menor en el caso de la formulación de prueba (A). Esta variabilidad se debe probablemente tanto a las características de los principios activos (por ejemplo, el metabolismo de Sulfametoxazol puede variar ya que está sujeto a un polimorfismo genético) como al número pequeño de sujetos (seis voluntarios por ser un estudio piloto con el objetivo de evaluar la probabilidad de éxito de la formulación).

4. Los resultados obtenidos del análisis farmacocinético (tablas 4.7 y 4.8) permitieron determinar la farmacocinética de Trimetoprim y Sulfametoxazol en la población Mexicana donde se puede observar que ambos fármacos se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal (Tmax promedio aproximadamente a las 2 horas) con Tiempos Medios de Residencia cortos (MRT promedios de aproximadamente 12.5 horas).

- En las tablas 4.13 y 4.14, se compararon los parámetros farmacocinéticos (Cmax, Tmax, AUC_{0-inf}, T½) obtenidos con cada formulación por fármaco con lo reportado en la literatura, obteniendo una gran similitud en los resultados.

Después de la administración de ambas formulaciones, el Trimetoprim en promedio presenta un Cmax de aproximadamente 1.5µg/mL contra 1 a 2 µg/mL reportado en la literatura, a un Tmax de aproximadamente 2.4 horas contra 1 a 4 horas reportado en la literatura, con AUC_{0-inf} de 21.4 µg.hr/mL contra 20 µg.hr/mL reportado en la literatura y con una vida media de 9 horas contra 8 a 15 reportado en la literatura.

Con ambas formulaciones, el Sulfametoxazol en promedio presenta un Cmax de aproximadamente 55µg/mL contra 40 a 60 µg/mL reportado en la literatura, a un Tmax de aproximadamente 2.2 horas contra 1 a 4 horas reportado en la literatura, con AUC_{0-inf} de 710µg.hr/mL contra 705µg.hr/mL reportado en la literatura y con una vida media de 8.5 horas contra 6 a 12 reportado en la literatura.

La depuración de Trimetoprim y Sulfametoxazol en ambas formulaciones en promedio fue de aproximadamente de 8.0 L/hr y 1.1 L/hr respectivamente lo que concuerda con lo reportado en la literatura de 9.2 L/hr y 1.3 L/hr (6) respectivamente.

Ambos fármacos se distribuyen rápida y ampliamente en los tejidos y fluidos corporales. El volumen de distribución de Trimetoprim es aproximadamente 7 veces mayor que el de Sulfametoxazol. En la literatura se reporta de 5 a 6 veces. Esta diferencia puede deberse a las estimaciones en el cálculo de la vida media.

5. La relación entre las concentraciones plasmáticas máximas promedio de Sulfametoxazol y Trimetoprim en ambas formulaciones fue aproximadamente de 35:1.

6. Los tiempos de muestreo elegidos caracterizan adecuadamente las fases de absorción y de eliminación así como Cmax y Tmax para ambos fármacos (Anexo A).

4.3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

4.3.2.1. FILOSOFÍA DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

A. Intervalos de confianza:

Cálculo de los Intervalos de Confianza para la relación (o diferencia) de las medias de las variables farmacocinéticas del producto de prueba contra el de referencia. Los límites de los intervalos de confianza obtenidos deben de caer en los intervalos de confianza preestablecidos con un nivel de significancia estadístico preestablecido.

B. Supuestos estadísticos:

Para el ANOVA los supuestos estadísticos son los siguientes:

1. Muestras aleatorias
2. Homogeneidad de varianzas
3. Aditividad (Linealidad) del modelo estadístico
4. Independencia y normalidad de los residuales

Estos supuestos, en un estudio de bioequivalencia, pueden interpretarse como:

1. Los sujetos elegidos del estudio fueron asignados a cada secuencia del estudio aleatoriamente.
2. Las varianzas asociadas a los dos tratamientos, así como entre los grupos de cada secuencia deben ser iguales o por lo menos comparables.

3. Los efectos principales del modelo estadístico, para un estudio cruzado estándar de 2x2, tales como efectos de sujeto, secuencia, periodo y tratamiento deben ser aditivos. No debe haber interacciones entre estos efectos.

4. Los residuales del modelo deben ser distribuidos normal e independientemente. En otras palabras los datos del estudio de bioequivalencia deben tener una distribución normal.

Si estos supuestos no se cumplen, pasos adicionales previos a la ANOVA incluyendo la transformación de los datos para mejorar el ajuste a los supuestos o el uso de estadística no paramétrica, puede usarse en lugar de la ANOVA, pero en general, el modelo es bastante robusto y cualquier desviación pequeña de estos supuestos no tendrá un efecto importante en el resultado final.

C. Efecto de secuencia:

Una gran limitación del diseño cruzado 2x2 es la confusión que pueda existir entre

- (i) un efecto verdadero de secuencia
- (ii) un efecto de acarreo o de desigualdad residual y
- (iii) de interacción entre el tratamiento y el período

Por lo tanto, aun cuando un estudio de bioequivalencia cruzado 2x2 presente un efecto estadísticamente significativo de secuencia, tal estudio puede ser aceptado por la FDA con tal que cumpla con lo siguiente:

1. El estudio es de dosis única.
2. Incluye únicamente sujetos sanos y normales.
3. El fármaco no es una entidad endógena.
4. Un período de lavado más que suficiente es permitido entre los dos periodos y no se presentaron niveles detectables del fármaco al tiempo cero del segundo período para ninguno de los sujetos.

5. El estudio cumple con todos los criterios científicos y estadísticos tales como:

- (i). Se tiene un protocolo del estudio aceptable.
- (ii). Se tiene un método analítico validado aceptable.
- (iii). Los datos del estudio son aceptables.
- (iv). Se llevó a cabo un análisis estadístico apropiado.
- (v). Se obtuvieron intervalos de confianza aceptables para los parámetros farmacocinéticos.

farmacocinéticos.

D. Criterios de aceptación (49):

1. ANOVA: La probabilidad de cada efecto analizado debe ser superior a 0.05 para concluir que no hay efecto de estos factores.
2. Los intervalos de confianza, tanto el Clásico como el de Westlake, concluyen a favor de la Bioequivalencia cuando los límites de los intervalos de confianza calculados están incluidos en el intervalo preestablecido de [80; 120]. Estos se analizarán con un nivel de confianza del 90%.
3. La prueba de t doble unilateral de Shuirmann concluye a favor de la Bioequivalencia cuando la suma de las probabilidades de que $(\mu_1 - \mu_2)$ sea inferior a 80% y de que sea superior a 120%, es inferior a 0.05.
4. La prueba de Anderson Hauck debe resultar inferior a 0.05 para poder concluir en favor de la bioequivalencia.
5. El poder de la prueba reportado debe ser mayor de 0.8 para concluir con mayor confianza en favor de la bioequivalencia.

4.3.2.2 RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

1. Los resultados del análisis estadístico utilizando el programa computacional BIOPAK (R) para Trimetoprim y Sulfametoxazol se presentan en las Tablas 4.9 y 4.10 respectivamente.
2. Para todos los parámetros farmacocinéticos y con ambos fármacos, después de la análisis con SAS, se obtuvo una distribución normal e independiente de residuales ya que en

todos los casos el valor obtenido en la prueba de Shapiro-Wilk se encontró en el intervalo de cero a uno y la gráfica de distribución de frecuencia de los residuales se representó por una función normal, así mismo, la gráfica de probabilidad normal se describió mediante una línea recta.

3. Al efectuar el análisis de varianza (ANOVA) para ambos fármacos, se obtuvieron valores de probabilidad superiores a 0.05 para todos los diferentes parámetros evaluados a excepción de C_{max} de Sulfametoxazol, por lo que se puede concluir que no hay efectos de periodo, formulación, sujeto y/o secuencia.

En el caso de C_{max} de Sulfametoxazol, el efecto de secuencia (o acarreo) se presenta significativo ya que el valor de probabilidad obtenido fue igual a 0.0061 (cual es menor a 0.05). En base a lo explicado en la sección 4.3.2.1.c, se puede concluir que este efecto de acarreo no representa un problema.

Por lo tanto, tanto el Trimetoprim como el Sulfametoxazol pasaron la prueba de ANOVA, y pueden ser representados por el siguiente modelo lineal general(40) de:

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

Donde:

i(sujeto) = 1,2...nk

j(período) = 1,2

k(secuencia) = 1,2

F_(j,k) = Efecto fijo directo de la formulación administrada en el período j de la secuencia k.

C_(j-1,k) = Efecto de acarreo residual desde el período (j -1) así al período j en la secuencia k.

e_{ijk} = Error aleatorio de la observación Y_{ijk}

4. Considerando que la constante de eliminación K de Trimetoprim está ligeramente fuera del Intervalo Clásico, se calculó la depuración de las formulaciones (presentados en las tablas 4.11 y 4.12) encontrándose que las depuraciones con ambas formulaciones son similares para un mismo sujeto y concluyendo así que la diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la constante de eliminación K y la vida media $T_{1/2}$ no se debe a un efecto de formulación sino probablemente a los problemas de estimación y cálculo del parámetro farmacocinético.

5. Se calculó el número de sujetos requeridos para el estudio de bioequivalencia formal para poder evaluar una diferencia del 20% con una certidumbre del 95% (Alfa de 0.05) en función de la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos (tabla 4.15), observando que el número de los sujetos fue suficiente para todos los parámetros excepto para el T_{max} en ambos fármacos donde se requería un número mayor de sujetos (15 sujetos para Sulfametoxazol y 20 sujetos para Trimetoprim). La variabilidad de los parámetros farmacocinéticos más alta fue para T_{max} (CV de 24.35% para SMX y de 28.69% para TMP).

6. El análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos de Sulfametoxazol (tanto medias aritméticas como medias geométricas) concluyeron a favor de la Bioequivalencia de éste fármaco en las dos formulaciones probadas (tabla 4.10). T_{max} resultó no ser equivalente, sin embargo como fue explicado anteriormente, este factor no es determinante en la decisión de rechazo o aceptación de la Hipótesis nula de bioinequivalencia.

7. El análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos de Trimetoprim (tabla 4.9) mostró que los parámetros de AUC y AUMC (tanto medias aritméticas como medias geométricas) son equivalentes, mientras que los parámetros de T_{max} y C_{max} mostraron diferencia significativa.

Además, cabe mencionar que los resultados del análisis estadístico de C_{max} fallan la prueba de Shulmann y del poder, pero pasan las pruebas de intervalo de confianza de Westlake y intervalo de confianza Clásico, así como la prueba de Anderson Hauck. Adicionalmente, cabe mencionar que el valor de la relación $\mu T/\mu R$ es de 103.75 (muy cercano a cien). Esto muestra que

probablemente la variabilidad alta intersujeto y el número reducido de sujetos fueron factores importantes en la dificultad para concluir con poder la bioequivalencia y por lo tanto se sugiere llevar a cabo el estudio de bioequivalencia completo (con 24 sujetos) para demostrar la bioequivalencia entre el producto genérico propuesto y el producto innovador.

4.3.3. REACCIONES ADVERSAS:

El sujeto 3 (secuencia BA) presentó al final del estudio indicios de escabiasis.

El sujeto 4 (secuencia AB) presentó durante el periodo de lavado una inflamación notoria del párpado inferior izquierdo y fue tratado durante este periodo con Neomicina Unguento. Al empezar el segundo periodo la inflamación había desaparecido y por lo tanto se suspendió el tratamiento.

Ambas reacciones fueron atribuidas al medicamento.

TABLA 4.1

**CONCENTRACIÓN PROMEDIO ±
DESVIACIÓN ESTANDAR DE TRIMETOPRIM EN
SEIS VOLUNTARIOS MASCULINOS SANOS**

TIEMPO (Horas)	FORMULACION DE PRUEBA A (µg/mL)	FORMULACION DE REFERENCIA B (µg/mL)
0.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.82 ± 0.53	0.96 ± 0.88
1.0	1.04 ± 0.44	1.07 ± 0.63
1.5	1.24 ± 0.30	1.12 ± 0.56
2.0	1.26 ± 0.19	1.17 ± 0.46
2.5	1.32 ± 0.23	1.25 ± 0.35
3.0	1.30 ± 0.13	1.12 ± 0.36
3.5	1.32 ± 0.24	1.20 ± 0.16
4.0	1.16 ± 0.08	1.14 ± 0.16
5.0	1.07 ± 0.21	1.14 ± 0.16
6.0	1.07 ± 0.12	1.03 ± 0.18
8.0	0.99 ± 0.25	0.91 ± 0.22
12.0	0.76 ± 0.20	0.77 ± 0.32
24.0	0.29 ± 0.12	0.34 ± 0.10 (A)
30.0	0.21 ± 0.05 (A)	0.19 ± 0.06 (A)
36.0	0.12 ± 0.03 (C)	0.13 ± 0.04 (B)

A:(n=5), B:(n=4), C:(n=3)

TABLA 4.2

**CONCENTRACIÓN PROMEDIO ± DESVIACIÓN
ESTANDAR DE SULFAMETOXAZOL SEIS
VOLUNTARIOS MASCULINOS SANOS**

TIEMPO (Horas)	FORMULACION DE PRUEBA A (µg/mL)	FORMULACION DE REFERENCIA B (µg/mL)
0.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	30.74 ± 17.53	15.46 ± 13.60
1.0	41.64 ± 11.47	18.88 ± 13.55
1.5	45.80 ± 12.86	24.94 ± 17.27
2.0	44.60 ± 10.55	39.89 ± 18.77
2.5	49.94 ± 4.27	51.85 ± 5.66
3.0	48.77 ± 4.02	50.21 ± 8.98
3.5	47.14 ± 4.75	47.12 ± 5.05
4.0	43.64 ± 3.87	46.25 ± 2.61
5.0	39.21 ± 3.60	41.15 ± 4.75
6.0	36.47 ± 3.36	37.84 ± 4.27
8.0	30.84 ± 2.67	32.04 ± 3.84
12.0	21.53 ± 2.71	22.37 ± 3.21
24.0	9.02 ± 1.96	9.51 ± 2.77
30.0	5.62 ± 1.28	5.63 ± 1.88
36.0	3.41 ± 0.92	3.34 ± 1.49

TABLA 4.3

**RESUMEN DE LOS PARAMETROS
FARMACOCINETICOS DEL PRODUCTO
DE PRUEBA A DE TRIMETOPRIM PARA
CADA VOLUNTARIO**

SUJETO	SECUENCIA	AUC_LAST ($\mu\text{g. hr/mL}$)	AUC_INF ($\mu\text{g. hr/mL}$)	Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	Tmax (hr)	K (1/hr)
1	BA	23.82	25.36	1.89	1.00	0.071
2	AB	13.52	13.52	1.44	1.50	0.104
3	BA	18.70	20.00	1.42	3.50	0.077
4	AB	25.00	25.00	1.65	3.50	0.087
5	AB	24.00	26.47	1.51	3.00	0.065
6	BA	18.86	18.86	1.16	3.00	0.078

SUJETO	SECUENCIA	T _{1/2} (hr)	AUMC_LAST ($\mu\text{g. hr/mL}$)	AUMC_INF ($\mu\text{g. hr/mL}$)	MRT (hr)
1	BA	9.72	266.37	343.55	13.55
2	AB	6.66	109.20	109.20	8.08
3	BA	9.03	208.97	272.82	13.64
4	AB	8.01	277.33	277.33	11.09
5	AB	10.73	292.73	420.16	15.87
6	BA	8.89	201.64	201.64	10.69

TABLA 4.4

**RESUMEN DE LOS PARAMETROS
FARMACOCINETICOS DEL PRODUCTO
DE REFERENCIA B DE TRIMETOPRIM
PARA CADA VOLUNTARIO**

SUJETO	SECUENCIA	AUC_LAST (µg. hr/mL)	AUC_INF (µg. hr/mL)	Cmax (µg/mL)	Tmax (hr)	K (1/hr)
1	BA	26.60	28.24	2.56	0.50	0.073
2	AB	12.25	12.25	1.51	2.50	0.131
3	BA	17.46	17.46	1.37	2.00	0.091
4	AB	24.43	25.53	1.39	5.00	0.090
5	AB	21.97	25.16	1.25	2.50	0.056
6	BA	18.06	19.41	1.33	1.00	0.075

SUJETO	SECUENCIA	T½ (hr)	AUMC_LAST (µg. hr/mL)	AUMC_INF (µg. hr/mL)	MRT (hr)
1	BA	9.47	290.05	371.47	13.16
2	AB	5.30	78.39	78.39	6.40
3	BA	7.62	172.08	172.08	9.86
4	AB	7.67	306.22	358.31	14.03
5	AB	12.30	285.11	456.77	18.16
6	BA	9.31	195.08	261.48	13.47

TABLA 4.5

**RESUMEN DE LOS PARAMETROS
FARMACOCINETICOS DEL PRODUCTO
DE PRUEBA A DE SULFAMETOXAZOL
PARA CADA VOLUNTARIO**

SUJETO	SECUENCIA	AUC_LAST ($\mu\text{g. hr/mL}$)	AUC_INF ($\mu\text{g. hr/mL}$)	Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	Tmax (hr)	K (1/hr)
1	BA	660.05	697.23	58.00	1.50	0.083
2	AB	582.98	612.57	50.03	1.50	0.085
3	BA	644.29	678.38	58.02	2.50	0.087
4	AB	662.25	701.81	59.56	0.50	0.081
5	AB	693.08	738.43	52.74	1.50	0.077
6	BA	782.08	857.50	50.64	3.00	0.068

SUJETO	SECUENCIA	T $\frac{1}{2}$ (hr)	AUMC_LAST ($\mu\text{g. hr/mL}$)	AUMC_INF ($\mu\text{g. hr/mL}$)	MRT (hr)
1	BA	8.39	6684.06	8472.88	12.15
2	AB	8.17	5837.23	7251.58	11.84
3	BA	7.96	6962.51	8580.94	12.65
4	AB	8.52	6612.66	8522.95	12.14
5	AB	8.96	7524.49	9743.06	13.19
6	BA	10.15	9066.46	12885.74	15.03

TABLA 4.6

**RESUMEN DE LOS PARAMETROS
FARMACOCINETICOS DEL PRODUCTO DE
REFERENCIA B DE SULFAMETOXAZOL
PARA CADA VOLUNTARIO**

SUJETO	SECUENCIA	AUC_LAST (µg. hr/mL)	AUC_INF (µg. hr/mL)	Cmax (µg/mL)	Tmax (hr)	K (1/hr)
1	BA	694.65	726.63	55.19	2.00	0.086
2	AB	576.98	605.98	56.30	2.50	0.089
3	BA	602.18	626.75	61.04	2.00	0.091
4	AB	635.78	678.24	46.92	3.50	0.081
5	AB	609.67	644.09	50.00	2.50	0.082
6	BA	848.16	942.35	65.91	3.00	0.067

SUJETO	SECUENCIA	T½ (hr)	AUMC_LAST (µg. hr/mL)	AUMC_INF (µg. hr/mL)	MRT (hr)
1	BA	8.06	7076.22	8599.51	11.83
2	AB	7.82	6453.93	7809.89	12.90
3	BA	7.60	6258.31	7412.21	11.83
4	AB	8.53	7155.53	9206.56	13.57
5	AB	8.49	6562.23	8223.29	12.77
6	BA	10.41	10438.39	15244.45	16.18

TABLA 4.7

**RESUMEN DE LOS PROMEDIOS DE LOS
PARAMETROS FARMACOCINETICOS ± SD
PARA TRIMETOPRIM**

PARAMETRO FARMACOCINETICO (PROMEDIO ± SD)	FORMULA DE PRUEBA A	FORMULA DE REFERENCIA B
AUC_LAST (µg.hr/mL)	20.65 ± 4.43	20.13 ± 5.24
AUC_INF (µg.hr/mL)	21.54 ± 4.99	21.34 ± 6.02
Cmax (µg/mL)	1.51 ± 0.24	1.57 ± 0.49
Tmax (hr)	2.58 ± 1.07	2.25 ± 1.57
AUMC_LAST (µg.hr/mL)	226.04 ± 68.18	221.15 ± 88.93
AUMC_INF (µg.hr/mL)	270.78 ± 108.21	283.08 ± 140.23
MRT (hr)	12.15 ± 2.75	12.51 ± 4.00
K (1/hr)	0.0802 ± 0.0138	0.0860 ± 0.0254
T½ (hr)	8.84 ± 1.40	8.61 ± 2.35

TABLA 4.8

**RESUMEN DE LOS PROMEDIOS DE LOS
PARAMETROS FARMACOCINETICOS ± SD
PARA SULFAMETOXAZOL**

PARAMETRO FARMACOCINETICO (PROMEDIO ± SD)	FORMULA DE PRUEBA A	FORMULA DE REFERENCIA B
AUC_LAST (µg.hr/mL)	670.79 ± 65.55	661.24 ± 99.95
AUC_INF (µg.hr/mL)	714.32 ± 81.45	703.95 ± 124.27
Cmax (µg/mL)	54.83 ± 4.18	55.89 ± 8.97
Tmax (hr)	1.75 ± 0.88	2.58 ± 0.58
AUMC_LAST (µg.hr/mL)	7114.57 ± 1101.81	7324.10 ± 1566.03
AUMC_INF (µg.hr/mL)	9242.86 ± 1951.17	9415.98 ± 2922.28
MRT (hr)	12.83 ± 1.18	13.18 ± 1.61
K (1/hr)	0.0803 ± 0.0067	0.0825 ± 0.0087
T½ (hr)	8.69 ± 0.79	8.49 ± 1.01

TABLA 4.9

**TABLA DE RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO
DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE
TRIMETOPRIM**

PARAMETRO PK	$\mu R - \mu T$	$\mu R / \mu T$	INTERVALO CLASICO	INTERVALO DE WESTLAKE	PRUEBA DE SHUIRMANN	PRUEBA DE ANDERSON HAUCK	PODER
T max	-0.333	87.10	56.34 - 117.86	63.26 - 136.75	0.3666	0.2819	0.1255
C max	0.057	103.75	86.84 - 120.66	82.05 - 117.95	0.0750	0.0348	0.4089
AUC_LAST	-0.524	97.46	90.54 - 104.39	92.01 - 107.99	0.0040	0.0018	0.9866
AUC_INF	-0.197	99.09	90.74 - 107.43	91.53 - 108.47	0.0070	0.0011	0.9608
AUMC_LAST	-4.885	97.04	86.21 - 109.46	87.86 - 112.14	0.0230	0.0077	0.7900
AUMC_INF	12.300	104.54	81.37 - 127.72	75.70 - 124.30	0.1575	0.0706	0.2060
MRT	0.360	102.96	82.08 - 123.84	78.58 - 121.42	0.1179	0.039	0.2560
K	0.006	107.28	91.92 - 122.64	80.97 - 119.03	0.0857	0.0664	0.5026

PARAMETRO PK	$\mu R - \mu T$	$\mu R / \mu T$	INTERVALO CLASICO	INTERVALO DE WESTLAKE	PRUEBA DE SHUIRMANN	PRUEBA DE ANDERSON HAUCK	PODER
Log C max	0.007	103.79	70.91 - 136.66	66.56 - 133.44	0.2750	0.0773	0.1142
Log AUC_LAST	-0.015	98.82	96.67 - 100.98	97.20 - 102.80	0.0000	0.0000	1.0000
Log AUC_INF	-0.009	99.29	96.50 - 102.09	96.98 - 103.02	0.0001	0.0000	0.9999
Log AUMC_LAST	-0.029	98.76	95.75 - 101.76	95.43 - 103.58	0.0001	0.0000	0.9999
Log AUMC_INF	-0.008	99.65	94.29 - 105.02	94.60 - 105.40	0.0014	0.0001	0.9969
Log MRT	0.001	100.10	90.86 - 109.33	90.77 - 109.23	0.0099	0.0002	0.9312

TABLA 4.10

**TABLA DE RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO
DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE
SULFAMETOXAZOL**

PARAMETRO PK	$\mu R/\mu T$	$\mu R/\mu T$ (%)	INTERVALO CLASICO	INTERVALO DE WESTLAKE	PRUEBA DE SHIRMANH	PRUEBA DE ANDERSON HAUCK	PODER
T max	0.833	147.62	103.36 - 191.88	2024 - 179.76	0.8885	0.8574	0.0821
C max	1.062	101.94	87.10 - 116.77	8484 - 115.16	0.0473	0.0129	0.5392
AUC_LAST	-9.554	98.58	92.28 - 104.87	9330 - 106.70	0.0026	0.0007	0.9923
AUC_INF	-10.369	98.55	91.41 - 105.69	9249 - 107.51	0.0041	0.0011	0.9840
AUMC_LAST	209.533	102.95	91.11 - 114.78	8726 - 112.74	0.0259	0.0114	0.7738
AUMC_INF	173.873	101.87	87.41 - 116.33	8523 - 114.77	0.0439	0.0118	0.5866
MRT	0.345	102.69	95.88 - 109.50	9200 - 108.00	0.0038	0.0018	0.9878
K	0.002	102.83	99.78 - 105.87	9495 - 105.05	0.0002	0.0001	0.9999

PARAMETRO PK	$\mu R/\mu T$	$\mu R/\mu T$	INTERVALO CLASICO	INTERVALO DE WESTLAKE	PRUEBA DE SHIRMANH	PRUEBA DE ANDERSON HAUCK	PODER
Log C max	0.007	100.38	96.69 - 104.06	96.27 - 103.73	0.0003	0.0000	0.9996
Log AUC_LAST	-0.008	99.71	98.76 - 100.65	98.95 - 101.05	0.0000	0.0000	1.0000
Log AUC_INF	-0.009	99.68	98.64 - 100.72	98.84 - 101.16	0.0000	0.0000	1.0000
Log AUMC_LAST	0.010	100.25	98.99 - 101.51	98.67 - 101.33	0.0000	0.0000	1.0000
Log AUMC_INF	0.001	100.03	98.60 - 101.46	98.57 - 101.43	0.0000	0.0000	1.0000
Log MRT	0.010	100.94	98.38 - 103.49	97.05 - 102.95	0.0001	0.0000	0.9999

TABLA 4.11

VALORES DE DEPURACIÓN DE TRIMETOPRIM PARA LOS SEIS VOLUNTARIOS

NUMERO DEL SUJETO	FORMULA DE PRUEBA A	FORMULA DE REFERENCIA B
1	6.31	5.67
2	11.83	13.06
3	8.00	9.16
4	6.40	6.27
5	6.04	6.36
6	8.48	8.24
PROMEDIO ± SD	7.84 ± 2.19	8.13 ± 2.76

CL/F= DOSIS/AUCinf
(L/hr)

TABLA 4.12

VALORES DE DEPURACIÓN DE SULFAMETOXAZOL PARA LOS SEIS VOLUNTARIOS

NUMERO DEL SUJETO	FORMULA DE PRUEBA A	FORMULA DE REFERENCIA B
1	1.15	1.10
2	1.31	1.32
3	1.18	1.28
4	1.14	1.18
5	1.08	1.24
6	0.93	0.85
PROMEDIO ± SD	1.13 ± 0.12	1.16 ± 0.17

CL/F= DOSIS/AUC_{inf}
(L/hr)

TABLA 4.13

COMPARACION DE PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE TRIMETOPRIM

(Estudios de Bioequivalencia y/o Farmacocinetica de
Trimetoprim/Sulfametoxazol 160:800 mg/comp en voluntarios sanos)

ESTUDIO/ PARAMETRO PK (Prom. ± SD)	ESTUDIO BE PILOTO	ESTUDIO BE PILOTO	REF. No 5	REF. No 6	REF. No 9	REF. No 10
CONDICIONES DEL ESTUDIO	BACTRIM 6 Sujetos	Lab.MEXICO 6 Sujetos	—	—	—	—
Cmax (µg/mL)	1.57 ± 0.49	1.51 ± 0.24	2	—	1-2	1.72
Tmax (Hr)	2.25 ± 1.57	2.58 ± 1.07	2	1-4	2-3	1-4
AUCinf (µg.hr/mL)	21.34 ± 6.02	21.54 ± 4.99	—	—	—	—
T½ (hr)	8.61 ± 2.35	8.84 ± 1.40	11	8-10	9-12	8-10

ESTUDIO/ PARAMETRO PK (Prom. ± SD)	REF. No 12	REF. No 12	REF. No 13	REF. No 41	REF. No 42
CONDICIONES DEL ESTUDIO	URO-TS D 10 Sujetos	BACTRIM 10 Sujetos	—	12 Sujetos	15 Sujetos
Cmax (µg/mL)	1.76 ± 0.35	1.75 ± 0.32	1.57 ± 0.26	1.25	1.57
Tmax (Hr)	1.89 ± 0.63	2.35 ± 0.70	1	1.5-2.0	1
AUCinf (µg.hr/mL)	18.6 ± 4.23	22.8 ± 5.80	—	—	—
T½ (hr)	13.06 ± 2.48	12.65 ± 2.55	8.9-11.8	9	10.3

TABLA 4.14

COMPARACION DE PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE SULFAMETOXAZOL .

(Estudios de Bioequivalencia y/o Farmacocinetica de
Trimetoprim/Sulfametoxazol 160:800 mg/comp en voluntarios sanos)

ESTUDIO/ PARAMETRO PK (Prom. ± SD)	ESTUDIO BE PILOTO	ESTUDIO BE PILOTO	REF. No 5	REF.N o 6	REF. No 9	REF. No 10
CONDICIONES DEL ESTUDIO	BACTRIM 6 Sujetos	Lab. MEXICO 6 Sujetos	—	—	—	—
Cmax (µg/mL)	55.89 ± 6.97	54.83 ± 4.18	40	—	—	57.4
Tmax (Hr)	2.58 ± 0.58	1.75 ± 0.88	4	2-4	—	1-4
AUCinf (µg.hr/mL)	703.95 ± 24.27	714.32 ± 81.45	—	—	—	—
T½ (hr)	8.49 ± 1.01	8.69 ± 0.79	10	6-12	9-12	10

ESTUDIO/ PARAMETRO PK (Prom. ± SD)	REF. No 12	REF. No 12	REF. No 13	REF. No 41	REF. No 42
CONDICIONES DEL ESTUDIO	URO-TS D 10 Sujetos	BACTRIM 10 Sujetos	—	12 Sujetos	15 Sujetos
Cmax (µg/mL)	56.46 ± 7.25	53.94 ± 2.7	59.6 ± 6.4	40	48.7
Tmax (Hr)	3.5 ± 0.64	3.10 ± 0.41	3	1.5-2.0	3
AUCinf (µg.hr/mL)	670.3 ± 67.6	738.5 ± 24.9	—	—	—
T½ (hr)	9.02 ± 0.28	8.82 ± 0.29	7.6-9.3	8.5	8.7

TABLA 4.15

**CALCULO DEL NUMERO DE SUJETOS (Ne)
REQUERIDOS PARA EL ESTUDIO DE
BIOEQUIVALENCIA DE SULFAMETOXAZOL**

PARAMETRO FC	CV	Ne
Cmax	11.82	4
Tmax	24.35	15
AUC_LAST	5.19	1
AUC_INF	5.89	1
AUMC_LAST	9.34	3
AUMC_INF	11.53	4
MRT	5.38	1

**CALCULO DEL NUMERO DE SUJETO (Ne)
REQUERIDOS PARA EL ESTUDIO DE
BIOEQUIVALENCIA DE TRIMETOPRIM**

PARAMETRO FC	CV	Ne
Cmax	13.24	5
Tmax	28.69	20
AUC_LAST	5.77	1
AUC_INF	6.84	2
AUMC_LAST	18.01	8
AUMC_INF	9.65	3
MRT	16.48	7

CAPITULO 5:

CONCLUSIONES

5.1. DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN:

- Se desarrolló una formulación que presentó características apropiadas (estabilidad, pruebas físicas), y un perfil de disolución similar al del innovador de Trimetoprim/Sulfametoxazol.

- Los estudios de preformulación (estudios de compatibilidad, reología, reproducibilidad y repetibilidad de proveedores de las materias primas, etc) son primordiales para un mejor entendimiento del proceso y de la formulación incluyendo la identificación y control de las variables críticas.

- Se identificaron y evaluaron algunas de las variables críticas relacionadas con la formulación así como con el proceso:

i. Los proveedores de los activos, del desintegrante y del lubricante son factores importantes ya que sus distribuciones de tamaño de partícula pueden afectar las características de disolución de los comprimidos.

ii. La cantidad de agua es crítica y debe ser controlada.

iii. El proceso de lubricación es crítico para evitar problemas de adhesión a punzones o de laminación.

iv. La dureza puede usarse como herramienta para controlar el perfil de disolución de Sulfametoxazol pero no el de Trimetoprim.

- Se obtuvo un proceso repetible y por lo tanto se decidió llevar a cabo un estudio piloto en seis voluntarios sanos para evaluar la probabilidad de bioequivalencia del producto genérico desarrollado en el laboratorio contra el producto innovador de los Laboratorios Roche.

5.2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS:

- Se desarrolló un método analítico para la cuantificación simultánea de Trimetoprim y Sulfametoxazol en muestras plasmáticas que cumple con todos los criterios de validación establecidos en la regulación.

5.3. ESTUDIO PILOTO DE BIOEQUIVALENCIA:

- Se calcularon algunos parámetros farmacocinéticos (C_{max} , T_{max} , AUC, CL , AUMC, MRT, K , $T_{1/2}$), los cuales al compararse con los reportados en la literatura resultaron ser similares y por lo tanto se puede concluir que la farmacocinética de Trimetoprim y Sulfametoxazol en voluntarios sanos Mexicanos no difiere de la observada en voluntarios sanos de las poblaciones Norteamericanas y Caucásica.

- La relación entre las concentraciones plasmáticas máximas promedio de Sulfametoxazol y Trimetoprim (SMX/TMP) en ambas formulaciones fué aproximadamente de 35:1 por lo que se puede concluir que se alcanzó la relación óptima para el efecto bacteriostático de co-trimoxazol (20:1 en la mayoría de las bacterias).

- Los parámetros farmacocinéticos y los datos de concentraciones plasmáticas de Trimetoprim y Sulfametoxazol cumplieron con las pruebas de independencia y normalidad de los residuales.

- Los datos de concentraciones plasmáticas de Trimetoprim y de Sulfametoxazol pasaron la prueba ANOVA, y pueden ser representados por el modelo lineal general.

- Se requiere por lo menos 20 sujetos para evaluar la bioequivalencia de comprimidos con Trimetoprim y Sulfametoxazol.

- Los tiempos de muestreo fueron adecuados y serán utilizados en el estudio de bioequivalencia formal.

- El análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos concluyó a favor de la Bioequivalencia para Sulfametoxazol y con menor grado de certidumbre para Trimetoprim.

6.4. CONCLUSIÓN GENERAL:

La formulación que fue desarrollada puede ser escalada a nivel industrial y se puede probar su bioequivalencia en un estudio oficial con 24 sujetos, con el objeto de comercializar el producto tanto en México como en Estados Unidos asegurando así su eficacia y seguridad para el paciente así como su intercambiabilidad con productos en el mercado.

CAPITULO 6:

BIBLIOGRAFÍA

1. Martindale "The Extra Pharmacopoeia" 29th ed. pag 108, 205-214, 306-308 y 328-331. (1989).
2. "Merck index" 11th edition pag 1407 y 1528 Merck and Co. Inc. USA.
3. K. Florey "Analytical Profiles Drug Substances" Academic Press Inc. Vol 2, pag 467-486 y 1978, Vol 7, pag 445-475, (1973).
4. U.S. Department of Health and Human Services. "Approved Drug Products With Therapeutic Equivalence Evaluations, (Orange Book)" 14th ed., Rockville MD. pag 3-252. (1994).
5. Goodman and Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 18th edition pag 1047-1064, 1708 y 1713, (1991).
6. USP DI 13th Ed. Vol 1 "Drug Information for Health Care Professional" pag 2525-2530, Vol 2 "Advice for Patient Drug Information in Lay Language" pag 1248-1251 y Vol 3 "Approved Drug Products and Legal Requirements" pag III/383.
7. Secretaría de Salud, Comisión permanente de la "Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)" 5a ed., pag 1492-1493, (1988).
8. "Diccionario de Especialidades Farmacéuticas" 40a ed. Ediciones PLM S.A. de C.V. pag 162BAC-164BAC, (1994).
9. "Remington's Pharmaceutical Sciences" 18th ed., pag 1178, 1179 y 1223, (1990).
10. Roche "Instructivo de Bactrim de los Laboratorios Roche."
11. U.S. Pharmacopelal Convention, Inc. "The United States Pharmacopeia" ed. 23, National Formulary ed. 18, Rockville MD. pag 1461, 1464 y 1602, (1994).
12. F.J. Flores, G. Castañeda, J.C. Menedez, F. Chavez, J.E. Herrera y E. Hong "Pharmacokinetics of Sulfamethoxazole and Trimethoprim in Mexicans: Bioequivalence of two oral formulations (URO-TSD and Bactrim F)", *Blepharm. & Drug Dispos.* Vol 11, pag 765-772, (1990).
13. P. Kremers, J. Duviervier, and C. Heusghem, "Pharmacokinetic Studies of Co-Trimoxazole in Man After Single and Repeated Doses", *The J. of Clin. Pharm.*, pag 112-117, (1974).
14. R.H. Rubin, M. N. Swartz, "Trimethoprim-Sulfamethoxazole"; *The N. Engl. J. of Med.* Vol 303, pag 426-431, (1980).
15. H. Clifford L, B.E. Laughon, J. Falloon, J.A. Kovacs, R.T. Davey, M.A. Poils, y H. Masur "Conferencia NIH, Avances recientes en el manejo de las infecciones oportunistas relacionadas con el SIDA"; *Ann. Intern. Med., Ed Mexicana* Vol. 2 Num. 5, pag 248-259, (1994).
16. R. C. Stevens; S. C. Laizure; C. L. Williams; and D. S. Stein; "Pharmacokinetics and Adverse Effects of 20-mg/kg/Day Trimethoprim and 100mg/kg/Day Sulfamethoxazole in Healthy Adult Subjects"; *Antimic. Agents and Chemo.*, pag 1884-1890, (Sept. 1991).
17. M. M. Hess; B. A. Boucher, S. C. Laizure, R. C. Stevens, P. L. Sanders, S. W. Janning, A. Croce, and T. C. Fabian, "Trimethoprim-Sulfamethoxazole Pharmacokinetics in Trauma Patients"; *Clin. Res. Articles; Pharmacotherapy*, Vol 13, Num. 6, pag 602-606, (1993).

18. R. C. Stevens; S. C. Laizure; P. L. Sanders; and D. S. Stein; "Multiple-Dose Pharmacokinetics of 12 Milligrams of Trimethoprim and 60 Milligrams of Sulfamethoxazole per Kilogram of Body Weight per Day in Healthy Volunteers"; *Antimic. Agents and Chemo.*, pag 448-452, (1993).
19. J. Torbett. "Estan las Empresas Farmaceuticas Mexicanas Listas para el Tratado de Libre Comercio de Norteamerica?" *Rev. Mex. de Cienc. Farm.*, pag 34-36, (1994).
20. R. A. Hamer "Importation of Drugs and Medical Devices in the US: An Overview of FDA Pre-Market Approval Requirements", *Pharm. Int.* pag 214-219, (1986).
21. G.K. Bolhuis "The Effect of Magnesium Stearate mixing in different Types of Laboratory and Industrial Mixers on Tablet Crushing strength." *Drug Dev. Ind. Pharm.* Vol 13 Num 9-11 pag 1547-1567, (1987).
22. U.I. Leinonen, "Physical and Lubrication Properties of Magnesium Stearate." *J. Pharm. Sci.* Vol 81 Num 12, pag 1194-1198, (1992).
23. M.E. Johansson, "The effect of Scaling-Up of the Mixing Process on the Lubricating Effect of Powdered and Granular Magnesium Stearate". *Acta Pharm. Tec.* Vol 32, pag 39-42, (1986).
24. Z.T. Chowhan "Aspects of Granulation Scale-Up in High-Shear Mixers." *Pharm. Tec.* Vol 12 Num 2, pag. 26-44, (1988).
25. W.A. Hanson "Handbook of Dissolution Testing" Aster Publishing Corp. Eugene, Oregon. (1990).
26. H. M. Abdou "Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence" Mack Pub.Co. Easton, Pennsylvania, (1989).
27. G. Piemonte, F. Tagliaro, M. Marigo y A. Frigerio. "Developments in Analytical methods in Pharmaceutical, Biomedical and Forensic Sciences" Plenum Press, N.Y. (1987).
28. G.L. Hawk, P.B. Champlin, H.C. Jordi y D. Wenke. "Biological/Biomedical of Liquid Chromatography" M. Dekker Inc., (1982).
29. "Bioavailability and Bioequivalence Requirements" 21 CFR Part 320, (1994).
30. Canadian Health Protection Branch, The U.S. Food and Drug Administration, and the United States Pharmacopeia. "Memories of the International Open Conference on Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence." Toronto, Canada, (1992).
31. V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman, and S. Spector. "Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies". *J. of Pharm. Sci.* Vol. 81, Num.3, pag 588-592, (1992).
32. O. Spreas-Varoquaux, J.P. Chapalain, N. P. Cordonnier and C. Advenier: "Determination of Trimethoprim, Sulphamethoxazole and its N4-acetyl metabolite in biological fluids by high-performance liquid chromatography", *J. of Chrom.*, Vol 274, pag 187-199, (1983).
33. V. Ascalone. "Assay of Trimethoprim, Sulfadiazine and its N4-Acetyl metabolite in biological fluids by normal-phase High Performance Liquid Chromatography". *J. of Chrom.*, Vol 224, pag 59-66, (1981).

34. G.C. Athanassiou, D.M. Rekkas and N.H. Choulis. "Correlation of in vitro dissolution data with in vivo plasma concentrations, for three, orally administered, formulations of SMX-TMP, by statistical moments analysis". *Int. J. of Pharm.*, Vol 90, pag 51-58, (1993).
35. H.G. Kristensen "Granulation: A review on Pharmaceutical Wet-Granulation." *Drug Dev. Ind. Pharm.* Vol 13 Num 4-5, pag 803-872, (1987).
36. H.A. Lieberman, L. Lachman, "Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets." Vol. 2. Marcel Dekker, Inc. New York.
- 37.A.C. Cartwright "International Harmonization and Consensus DIA Meeting on Bioavailability and Bioequivalence Testing requirements and Standards" *Drug Inform. J.*, Vol 25, pag 471-482, (1991).
38. "Bioequivalence guideline" FDA, (1990).
39. "Guidance, Statistical Procedures for Bioequivalence Studies Using a Standard Two-Treatment Crossover Design" FDA, (1992).
40. S.C. Chow and J.P. Liu, "Design and analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies" M. Dekker Inc. (1992).
41. V. Hutt, I. Klingmann, G.U. Pabst, Z. Salama, H. Jalger "Studies of Pharmacokinetics and Bioavailability of a new Trimetoprim/Sulfametoxazol formulation In healthy volunteers". *Arzneim-Forsch*, Vol 38, pag 1347-1350, (1988).
42. P. Kremers, J. Duvivier, C. Heusghem, "Pharmacokinetics studies of Co-Trimoxazol in man after single and repeated doses." *J. of Clin. Pharm.*, Vol 14, pag 112-117, (1974).
43. C.T. Rohdes, "Generic substitution: Does Interchangeability mean equality of all functional relevant attributes?" *Clin. Res. & Reg. Affairs*, Vol 12, Num 4, pag 267-272, (1995).
44. T.R. Covington, "Generic Drug Utilization: Overview and Guidelines fro prudent use" *Clin. Res. & Reg. Affairs*, Vol 9, Num 2, pag 103-126, (1992)

ANEXO A

TRIMETOPRIM

SUJETO 1

TIEMPO (Horas)	PERIODO I	PERIODO II
	FORM B	FORM A
	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.00	0.00
0.5	2.56	1.84
1.0	1.96	1.89
1.5	1.91	1.65
2.0	1.72	1.45
2.5	1.64	1.42
3.0	1.61	1.33
3.5	1.50	1.34
4.0	1.41	1.25
5.0	1.26	1.21
6.0	1.22	1.20
8.0	1.09	1.02
12.0	0.92	0.77
24.0	0.39	0.38
30.0	0.25	0.24
36.0	0.12	0.11

SUJETO 2

TIEMPO (Horas)	PERIODO I	PERIODO II
	FORM A	FORM B
	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.00	0.00
0.5	0.39	0.68
1.0	0.78	1.08
1.5	1.44	1.06
2.0	1.00	1.26
2.5	1.07	1.51
3.0	1.15	1.39
3.5	1.00	1.18
4.0	1.13	1.06
5.0	1.05	1.09
6.0	0.86	0.80
8.0	0.70	0.60
12.0	0.49	0.41
24.0	0.10	0.00
30.0	0.00	0.00
36.0	0.00	0.00

TRIMETOPRIM

SUJETO 3

TIEMPO (Horas)	PERIODO I	PERIODO II
	FORM B CONC. ($\mu\text{g/mL}$)	FORM A CONC. ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.00	0.00
0.5	0.94	0.56
1.0	1.07	0.75
1.5	1.29	1.03
2.0	1.37	1.25
2.5	1.25	1.37
3.0	1.12	1.32
3.5	1.17	1.42
4.0	1.09	1.17
5.0	1.02	0.69
6.0	0.95	1.05
8.0	0.83	0.86
12.0	0.62	0.68
24.0	0.22	0.27
30.0	0.11	0.16
36.0	0.00	0.10

SUJETO 4

TIEMPO (Horas)	PERIODO I	PERIODO II
	FORM A CONC. ($\mu\text{g/mL}$)	FORM B CONC. ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.00	0.00
0.5	0.79	0.00
1.0	0.74	0.00
1.5	0.85	0.17
2.0	1.43	0.34
2.5	1.60	0.63
3.0	1.34	0.63
3.5	1.65	1.10
4.0	1.11	0.96
5.0	1.06	1.39
6.0	1.09	1.26
8.0	1.44	1.22
12.0	1.09	1.32
24.0	0.31	0.37
30.0	0.24	0.19
36.0	0.00	0.10

TRIMETOPRIM

SUJETO 5

TIEMPO (Horas)	PERIODO I	PERIODO II
	FORM A	FORM B
	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.00	0.00
0.5	0.50	0.43
1.0	1.06	0.98
1.5	1.38	1.09
2.0	1.37	1.12
2.5	1.46	1.25
3.0	1.51	1.15
3.5	1.41	1.03
4.0	1.24	1.24
5.0	1.29	1.10
6.0	1.18	1.06
8.0	1.06	0.91
12.0	0.81	0.72
24.0	0.44	0.47
30.0	0.26	0.26
36.0	0.16	0.18

SUJETO 6

TIEMPO (Horas)	PERIODO I	PERIODO II
	FORM B	FORM A
	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.00	0.00
0.5	1.17	0.86
1.0	1.33	0.99
1.5	1.21	1.06
2.0	1.21	1.08
2.5	1.21	1.01
3.0	0.79	1.16
3.5	1.24	1.10
4.0	1.05	1.04
5.0	0.96	1.11
6.0	0.91	1.06
8.0	0.82	0.87
12.0	0.62	0.73
24.0	0.25	0.26
30.0	0.15	0.16
36.0	0.10	0.00

SULFAMETOXAZOL

SUJETO 1

TIEMPO (Horas)	PERIODO I	PERIODO II
	FORM B	FORM A
	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.00	0.00
0.5	40.28	32.13
1.0	37.22	52.53
1.5	54.32	58.00
2.0	55.19	50.59
2.5	52.43	49.13
3.0	49.71	47.16
3.5	47.69	44.74
4.0	46.03	41.68
5.0	41.36	38.33
6.0	39.08	36.97
8.0	31.61	29.53
12.0	22.21	20.88
24.0	8.99	8.14
30.0	5.01	4.96
36.0	2.75	3.07

SUJETO 2

TIEMPO (Horas)	PERIODO I	PERIODO II
	FORM A	FORM B
	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.00	0.00
0.5	28.47	3.13
1.0	43.62	4.34
1.5	50.03	4.57
2.0	48.88	7.16
2.5	47.76	56.30
3.0	42.45	54.32
3.5	42.03	46.83
4.0	38.92	44.90
5.0	34.03	39.87
6.0	30.46	35.89
8.0	26.27	29.43
12.0	18.44	20.57
24.0	6.77	7.96
30.0	4.61	4.86
36.0	2.51	2.54

SULFAMETOXAZOL

SUJETO 3

TIEMPO (Horas)	PERIODO I	PERIODO II
	FORM B	FORM A
	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.00	0.00
0.5	11.15	11.69
1.0	12.54	20.04
1.5	17.48	21.95
2.0	61.04	23.98
2.5	50.48	58.02
3.0	46.71	54.66
3.5	46.62	55.62
4.0	43.81	49.06
5.0	39.44	40.68
6.0	35.72	38.21
8.0	30.23	31.55
12.0	20.27	21.75
24.0	7.68	8.74
30.0	4.10	5.05
36.0	2.24	2.97

SUJETO 4

TIEMPO (Horas)	PERIODO I	PERIODO II
	FORM A	FORM B
	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)
0.0	0.00	0.00
0.5	59.56	4.87
1.0	49.60	7.11
1.5	50.66	17.71
2.0	48.36	37.30
2.5	47.12	42.78
3.0	48.67	41.27
3.5	45.71	46.92
4.0	42.65	44.95
5.0	38.54	43.79
6.0	36.71	38.04
8.0	31.03	33.17
12.0	19.48	22.65
24.0	8.07	8.74
30.0	5.10	5.42
36.0	3.22	3.45

SULFAMETOXAZOL

SUJETO 5

TIEMPO (Horas)	PERIODO I	PERIODO II
	FORM A	FORM B
	CONC. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CONC. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.0	0.00	0.00
0.5	14.12	20.11
1.0	43.53	32.70
1.5	52.74	34.43
2.0	52.44	38.70
2.5	51.03	50.00
3.0	49.03	43.35
3.5	45.52	39.38
4.0	41.97	46.62
5.0	38.62	34.12
6.0	35.92	32.91
8.0	33.22	28.64
12.0	22.44	19.99
24.0	9.97	8.61
30.0	5.91	5.02
36.0	3.51	2.81

SUJETO 6

TIEMPO (Horas)	PERIODO I	PERIODO II
	FORM B	FORM A
	CONC. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CONC. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.0	0.00	0.00
0.5	13.21	38.45
1.0	19.37	40.51
1.5	21.15	41.43
2.0	39.92	43.32
2.5	59.11	46.58
3.0	65.91	50.64
3.5	55.30	49.24
4.0	51.19	47.57
5.0	48.34	45.07
6.0	45.38	40.54
8.0	39.16	33.43
12.0	28.54	26.18
24.0	15.06	12.42
30.0	9.37	8.08
36.0	6.27	5.15

