



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE HIDROCLOROTIAZIDA EN MUESTRAS DE
PLASMA Y ORINA

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN FARMACIA (BIOFARMACIA)

PRESENTA

QFB JORGE ANTONIO CARLIN HERNANDEZ



TUTOR: DRA. HELGI JUNG COOK

AÑO: 2008



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a la Dra. Helgi Jung Cook por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella, por sus consejos y dirección en este trabajo. Por compartir conmigo su gran experiencia y su conocimiento.

Al QFB Juan Angeles Uribe por el apoyo y el interés mostrado hacia mi trabajo, mi más sincero aprecio y distinción.

A mis amigos y compañeros del Centro AF de Estudios Tecnológicos, S. A., mil gracias por compartirme sus conocimientos.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Jorge Carlín Montes y Martina Hernández Hernández

No existe modo ni magnitud para expresarles mi más profundo agradecimiento por todo lo que han hecho por mi y mi familia.

A mi esposa:

María Cirenía . . . mi fuente de inspiración y la culpable de todo mi presente y futuro

A mis hijos:

Alain y Axel . . . ánimo! tienen toda la vida para comerse el mundo

“y Yo que” . . . Maria Teresa . . . te agradezco la lección de vida que me estas dando.

Lugar en donde se desarrollo el tema:

Facultad de Química, Edificio E, L-112.

Centro A. F. de Estudios Tecnológicos, S. A.

Asociación Mexicana para la Investigación Clínica, A. C.

“ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE HIDROCLOROTIAZIDA EN MUESTRAS DE ORINA Y PLASMA”

TABLA DE CONTENIDO

	Página
ABSTRACT	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO	3
2. INFORMACIÓN GENERAL	5
2.1. Hidroclorotiazida.	5
2.1.1. Descripción y propiedades fisicoquímicas.	5
2.1.2. Propiedades farmacológicas.	7
2.1.3. Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME).	7
2.1.4. Efectos terapéuticos.	13
2.1.5. Indicaciones y dosificación.	13
2.1.6. Efectos secundarios.	14
2.1.7. Interacciones y consideraciones especiales.	15
2.1.8. Reacciones adversas y toxicidad.	15
2.1.9. Estudios de bioequivalencia	16
2.2. Bioequivalencia	19
2.2.1. Semblanza internacional	19
2.2.2. Regulación en México	24
2.2.3. Guía para estudios de biodisponibilidad y disolución de tabletas orales conteniendo hidroclorotiazida.	30
2.2.4. Correlación de datos plasmáticos y urinarios	31
2.3. Métodos analíticos para cuantificar hidroclorotiazida en fluidos biológicos	32
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	35
4. PARTE EXPERIMENTAL	36
4.1. Selección de los productos	36

	Página
4.2. Pruebas de control de calidad.	36
4.3. Validación de métodos analíticos	37
4.3.1. Validación del método analítico para cuantificar hidroclorotiazida en orina	37
4.3.1.1. Función respuesta	37
4.3.1.2. Exactitud	39
4.3.1.3. Precisión	39
4.3.1.4. Límite de detección	39
4.3.1.5. Límite de cuantificación	39
4.3.1.6. Selectividad	39
4.3.1.7. Recobro absoluto	40
4.3.1.8. Estabilidad de la muestra durante la inyección	40
4.3.1.9. Estabilidad de la muestra sobre la mesa de trabajo	40
4.3.1.10. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación – descongelación	40
4.3.1.11. Estabilidad de la muestra en refrigeración	41
4.3.1.12. Estabilidad de la muestra a largo plazo almacenada a -40°C	41
4.3.2. Validación del método analítico para cuantificar hidroclorotiazida en plasma	41
4.3.2.1. Función respuesta	42
4.3.2.2. Exactitud	42
4.3.2.3. Precisión	42
4.3.2.4. Límite de detección	42
4.3.2.5. Límite de cuantificación	42
4.3.2.6. Selectividad	42
4.3.2.7. Recobro absoluto	42
4.3.2.8. Estabilidad de la muestra durante la inyección	43
4.3.2.9. Estabilidad de la muestra sobre la mesa de trabajo	43
4.3.2.10. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación - descongelación	43

	Página
4.3.2.11. Estabilidad de la muestra a largo plazo almacenada a -40°C	43
4.3.1.12. Efecto del anticoagulante en la cuantificación	44
4.4. Estudio de bioequivalencia	44
4.1.1. Fase clínica. Estudio de biodisponibilidad relativa.	44
4.1.1.1. Selección de voluntarios	44
4.1.1.2. Informe de consentimiento	44
4.4.2. Diseño experimental del estudio de bioequivalencia.	45
4.4.3. Protocolo experimental	45
4.4.4. Análisis de las muestras	47
4.4.5. Análisis de los datos	47
5. RESULTADOS	49
5.1. Control de calidad de los productos.	49
5.2. Perfil de disolución	49
5.3. Estudio de bioequivalencia	51
5.3.1. Resultados de la validación de los métodos bioanalíticos	51
5.3.2. Datos urinarios.	54
5.3.3. Datos plasmáticos	60
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS	63
6.1. Estudios <i>in vitro</i> de los productos	63
6.2. Validación de los métodos analíticos	63
6.2.1 Resultados de la validación del método para cuantificar hidroclorotiazida en orina	63
6.2.1.1. Función respuesta	63
6.2.1.2. Exactitud	64
6.2.1.3. Precisión	64
6.2.1.4. Límite de detección	64
6.2.1.5. Límite de cuantificación	64
6.2.1.6. Selectividad	64
6.2.1.7. Recobro absoluto	65
6.2.1.8. Estabilidad de la muestra durante la inyección	65

	Página
6.2.1.9. Estabilidad de la muestra sobre la mesa de trabajo	65
6.2.1.10. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación - descongelación	65
6.2.1.11. Estabilidad de la muestra en refrigeración	65
6.2.1.12. Estabilidad de la muestra a largo plazo almacenada a -40°C	65
6.2.2 Resultados de la validación del método para cuantificar hidroclorotiazida en plasma	66
6.2.2.1. Función respuesta	66
6.2.2.2. Exactitud	66
6.2.2.3. Precisión	66
6.2.2.4. Límite de detección	66
6.2.2.5. Límite de cuantificación	67
6.2.2.6. Selectividad	67
6.2.2.7. Recobro absoluto	67
6.2.2.8. Estabilidad de la muestra durante la inyección	67
6.2.2.9. Estabilidad de la muestra sobre la mesa de trabajo	67
6.2.2.10. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación - descongelación	67
6.2.2.11. Estabilidad de la muestra a largo plazo almacenada a -40°C	68
6.2.2.12. Efecto del anticoagulante en la cuantificación de hidroclorotiazida en plasma	68
6.3. Estudio de bioequivalencia	68
6.3.1. Análisis de datos urinarios.	68
6.3.2. Análisis de los datos plasmáticos.	73
7. COMPARACIÓN DE RESULTADOS URINARIOS VS PLASMÁTICOS	80
8. CONCLUSIONES	86
9. ANEXOS	87
10. BIBLIOGRAFÍA	92

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de la hidroclorotiazida.	5
Figura 2. Sitios de protonación de hidroclorotiazida a los que corresponden los valores de pK_{a1} y pK_{a2} .	6
Figura 3. Reacción de hidrólisis para la hidroclorotiazida.	6
Figura 4. Esquema de la válvula de conmutación de columnas.	38
Figura 5. Perfiles de disolución de Hidroclorotiazida	50
Figura 6. Cromatogramas de hidroclorotiazida en orina.	52
Figura 7. Cromatogramas de hidroclorotiazida en plasma.	53
Figura 8. Cantidad acumulada excretada (promedio \pm error estándar) vs tiempo	55
Figura 9. Logaritmo de la velocidad de excreción (promedio \pm error estándar) vs tiempo medio	55
Figura 10. Logaritmo de la concentración plasmática (promedio \pm error estándar) vs tiempo	61
Figura 11. Cantidad acumulada excretada del sujeto 21 en cada tiempo de muestreo.	69
Figura 12. Cantidad acumulada excretada del sujeto 12 en cada tiempo de muestreo.	70
Figura 13. Histogramas de A-B y $\text{Log}(A/B)$ para $AUC_{(0-30)}$	77
Figura 14. Histogramas de A-B y $\text{Log}(A/B)$ para $AUC_{(0-\text{infinito})}$	78
Figura 15. Histogramas de A-B y $\text{Log}(A/B)$ para $C_{(\text{máx})}$	79
Figura 16. Valores promedio de la concentración plasmática y velocidad de excreción con respecto al tiempo del producto de prueba.	81
Figura 17. Valores promedio de la concentración plasmática y la velocidad de excreción con respecto al tiempo del producto innovador.	81
Figura 18. Relación lineal entre el área bajo la curva de concentración plasmática y la cantidad excretada acumulada del producto de prueba.	82
Figura 19. Relación lineal entre el área bajo la curva de concentración plasmática	82

y la cantidad excretada acumulada del producto innovador.

Figura 20. Valores promedio de la depuración total \pm desviación estándar con respecto al tiempo. 83

Figura 21. Valores de pH urinario a los diferentes tiempos de muestreo. 83

Figura 22. Relación entre la depuración total y el pH en función del tiempo. 84

Producto de prueba.

Figura 23. Relación entre la depuración total y el pH en función del tiempo. 84

Producto innovador.

Figura 24. Efecto del cambio de concentración de la Hidroclorotiazida en la presión arterial promedio. Producto de prueba. 85

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Constantes de velocidad de la hidroclorotiazida	10
Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos de la hidroclorotiazida	11
Tabla 3. Indicaciones y dosificación	13
Tabla 4. Diseño experimental empleado en el estudio de bioequivalencia de Hidroclorotiazida 50 mg	45
Tabla 5. Resultados de las pruebas de control de calidad.	49
Tabla 6. Resultados del porcentaje disuelto en cada tiempo de muestreo por producto	50
Tabla 7. Resultados de la validación de los métodos analíticos para cuantificar Hidroclorotiazida en los fluidos biológicos.	51
Tabla 8. Cantidad acumulada excretada de hidroclorotiazida en orina.	54
Tabla 9. Valores de la velocidad de excreción de hidroclorotiazida en orina.	56
Tabla 10. Cantidad excretada acumulada total (μg) y el porcentaje recuperado por sujeto y producto.	57
Tabla 11. Velocidad máxima de excreción ($\mu\text{g}/\text{h}$) y tiempo (h) para alcanzar la velocidad máxima por sujeto y producto	58
Tabla 12. Constante de velocidad de eliminación ($1/\text{h}$) y tiempo de vida media de eliminación (h).	59
Tabla 13. Concentración plasmática (ng/ml) de hidroclorotiazida en cada tiempo de muestreo	60
Tabla 14. Resultados de los parámetros farmacocinéticos al utilizar datos plasmáticos.	62
Tabla 15. Intervalos de confianza al utilizar los parámetros en función logarítmica.	62
Tabla 16. Análisis de varianza de la cantidad acumulada excretada de hidroclorotiazida en orina por intervalo de muestreo usando sumatoria tipo III.	71
Tabla 17. Análisis de varianza de la velocidad de excreción de hidroclorotiazida en orina por intervalo de muestreo usando sumatoria tipo III.	71
Tabla 18. Estadística de biodisponibilidad de la cantidad excretada acumulada	73

total y máxima velocidad de excreción de hidroclorotiazida en la orina

Tabla 19. Análisis de varianza de la concentración de hidroclorotiazida en plasma por intervalo de muestreo usando sumatoria tipo III. 74

Tabla 20. Estadística de biodisponibilidad de las áreas bajo la curva concentración plasmática - tiempo y de la máxima concentración plasmática 76

ABSTRACT

The bioequivalence of two oral formulations of HYDROCHLOROTHIAZIDE 50 mg was assessed, with the purpose of obtaining its approval as a generic product by the Food and Drug Administration (FDA) of the United States of America. A mexican product was compared with the innovator product Hydrodiuril (Merck) 50 mg, using an experimental crossover design of two ways, cross, single blind and totally randomized study in healthy subjects

Blood samples were taken at 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.5, 5.0, 7.0, 10.0, 18.0, 30.0 and 42.0 hours. Urine samples were taken at -1-0, 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-6, 6-8, 8-12, 12-24, 24-36 and 36-48 hours and analyzed using High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) methods previously validated.

The following pharmacokinetic parameters were calculated using an independent model method: area under the curve concentration-time from zero to the last time (AUC_{0-t}), area under the curve concentration-time from zero to infinity (AUC_{0-inf}), peak concentration plasma (C_{max}), time to get the peak concentration plasma (T_{max}), half life of elimination ($t_{1/2}$), mean residence time (MRT), cumulative excretion (Ae), total cumulative excretion (Ae_t), maximal rate of excretion, rate of excretion and clearance (Cl).

Statistical analysis was performed by the methods of classical confidence interval and Schürman's hypothesis, results showed that both products are bioequivalent.

RESUMEN

Se estudió la bioequivalencia de una formulación de HIDROCLOROTIAZIDA 50 mg en comprimidos de un laboratorio mexicano respecto al producto innovador Hydrodiuril (Merck) comprimidos 50 mg; utilizando para ello un diseño experimental de dos vías, cruzado simple ciego y completamente al azar en voluntarios sanos, con el propósito de obtener la aprobación del producto mexicano como genérico por la “*Food and Drug Administration*” (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica.

Se obtuvieron muestras sanguíneas a las 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.5, 5.0, 7.0, 10.0, 18.0, 30.0 y 42.0 horas, y muestras urinarias a las -1-0, 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-6, 6-8, 8-12, 12-24, 24-36 y 36-48 horas, después de la administración de la dosis, las cuales fueron analizadas utilizando métodos de Cromatografía de Líquidos de alta Resolución (CLAR) previamente validados.

Se determinaron los siguientes parámetros farmacocinéticos utilizando el método de modelo independiente: área bajo la curva concentración – tiempo desde 0 hasta el último tiempo de muestreo (AUC_{0-t}), área bajo la curva concentración - tiempo desde 0 hasta infinito (AUC_{0-inf}), concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima (T_{max}), tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$), tiempo medio de residencia (MRT), cantidad acumulada excretada (A_e) y velocidad de excreción a cada tiempo de muestreo, cantidad acumulada excretada total (A_{e_t}), velocidad máxima de excreción, y depuración (Cl).

Al efectuar el análisis estadístico utilizando las pruebas estadísticas de intervalo de confianza clásico y la prueba de hipótesis de Schüirman's, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$), por lo que se concluye que los productos son bioequivalentes.

1. INTRODUCCION Y OBJETIVO

INTRODUCCIÓN

La hidroclorotiazida es un fármaco ampliamente prescrito como diurético, ocupa el lugar #17 entre los fármacos de mayor uso en los Estados Unidos y en México, genera ventas de más de \$ 100 millones de dólares.⁽ⁱ⁾ Es relativamente insoluble en fluidos acuosos y por lo tanto, tiene el potencial de ser pobremente absorbido en el tracto gastrointestinal. Prescott y Nimmo, en 1971, discutiendo observaciones de inequivalencia de genéricos en sujetos humanos, listaron 14 ejemplos de fármacos inequivalentes entre los cuales se encontró la hidroclorotiazida,⁽ⁱⁱ⁾ así mismo, por lo menos un reporte indica que la formulación del producto puede afectar la biodisponibilidad de la hidroclorotiazida en las formas farmacéuticas.⁽ⁱⁱⁱ⁾ En 1973 el reporte del *Ad Hoc Committee on Drug Selection* de la *Academy of General Practice of Pharmacy* y la *Academy of Pharmaceutical Sciences*, caracterizó a la hidroclorotiazida como un fármaco con “bajo o inexistente riesgo potencial” con respecto a problemas de biodisponibilidad. Un reporte de 1974 de la *Academy of Pharmaceutical Sciences* colocó a la hidroclorotiazida en la “Lista C”, que es un grupo de fármacos a los cuales aún no se les tenía evidencia suficiente si tenían o no problemas de bioequivalencia, lo cual se reflejaría en la terapia. En el mismo año, el reporte del *Drug Bioequivalence Study Panel* a la *Office of Technology Assessment (OTA)* incluyó a la hidroclorotiazida en una lista de 24 fármacos “para los cuales, se ha demostrado que existen diferencias en la biodisponibilidad de productos químicamente equivalentes”.

Este fármaco ha sido catalogado por FDA, OMS, *Prescription Drugs*, *Federal Register*, *Hew Publication* y *Eurodocument* como un fármaco con problemas potenciales de biodisponibilidad. En la actualidad la hidroclorotiazida está clasificada en el grupo IV del sistema de clasificación biofarmacéutica, lo cual indica que es fármaco de baja solubilidad y baja permeabilidad.

(i) Hydrochlorothiazide - RxLists Monographs, <http://www.rxlist.com/cgi/generic/hctz.htm>; 23:38:32 08/05/98.

(ii) Chodos, D.J. and DiSanto A. R.: Basics of Bioavailability and Description of Upjohn Single - Dose Study Design; Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan USA, 1973

(iii) Meyer M. C.; J. Am. Phar. Ass. NS16:47-50(1976)

En México existe la hidroclorotiazida como monofármaco, y combinado con otros fármacos como amilorida, lisinopril, triamtereno, metoprolol, timolol, metildopa, enalapril y captopril; lo cual hace de este fármaco una entidad interesante para realizar estudios de bioequivalencia.

OBJETIVO

Evaluar la bioequivalencia de comprimidos con 50 mg de hidroclorotiazida de un laboratorio mexicano con respecto al innovador Hydrodiuril[®] (Merck).

Objetivos particulares

- Evaluar la bioequivalencia de los productos conteniendo hidroclorotiazida tomando como base los datos urinarios.
- Evaluar la bioequivalencia de los productos conteniendo hidroclorotiazida tomando como base los datos plasmáticos.
- Comparar los resultados de los estudios obtenidos con datos urinarios vs plasmáticos.
- Comparar las concentraciones de hidroclorotiazida obtenidas en mexicanos con respecto a las reportadas en otros países.

2. INFORMACIÓN GENERAL

2.1. HIDROCLOROTIAZIDA

2.1.1. Descripción y propiedades fisicoquímicas. ^(1,2,3,4,5)

La hidroclorotiazida es un diurético y antihipertensivo ampliamente estudiado de la familia de las benzotiazidas. Es el derivado 3,4-dihidro de la clorotiazida. El nombre químico con que se le conoce es 6-cloro-3,4-dihidro-2*H*-1,2,4-benzotiadiazin-7-sulfonamida 1,1-dióxido y su fórmula empírica es C₇H₈ClN₃O₄S₂.

Se presenta como un polvo cristalino blanco o prácticamente blanco, inodoro y con ligero sabor amargo, con un punto de fusión entre 263°C y 275°C. En esta forma física la hidroclorotiazida es sumamente estable, aún exponiéndose a la intemperie y a la luz solar directa. Su peso molecular es de 297.7 y su estructura química es la siguiente:

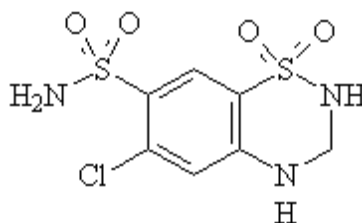


Figura 1. Estructura química de la hidroclorotiazida.

La hidroclorotiazida es prácticamente insoluble en agua, pero es soluble en soluciones de alcalinas inorgánicas como hidróxido de sodio o hidróxido de amonio y en soluciones alcalinas orgánicas como n-butilamina.

La hidroclorotiazida es un ácido orgánico débil. En soluciones acuosas tiene dos valores de pKa, pKa₁= 7.9 y pKa₂=9.2. La primera constante se atribuye al grupo sulfamoyl mientras que la segunda constante se presenta por la ionización de la benzotiadiazina (Figura 2).

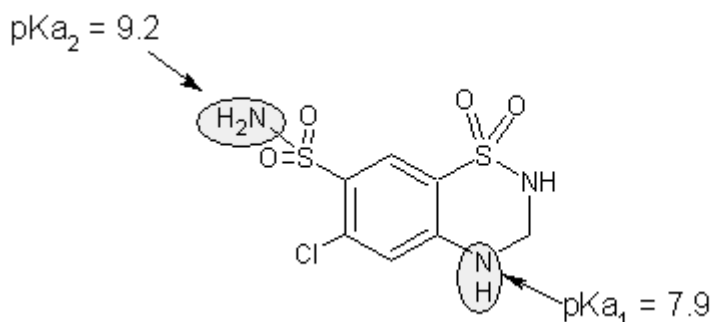


Figura 2. Sitios de protonación de hidroclorotiazida a los que corresponden los valores de pKa₁ y pKa₂.

Con respecto a sus propiedades espectrales al infrarrojo, los principales picos se presentan a las longitudes de onda de 1318, 1180, 1150, 1168, 1602 y 1060 cm⁻¹(KBr), y en el espectro ultravioleta en solución acuosa ácida 272 nm (A₁¹=644 a), 318 nm y solución acuosa alcalina 274 nm (A₁¹=520 a), 324 nm.

En soluciones acuosas de hidróxido de sodio e hidróxido de amonio, la hidroclorotiazida sufre un proceso de hidrólisis para dar formaldehído y 4-amino-6-cloro-1,3-benceno disulfonamida (Figura 3).

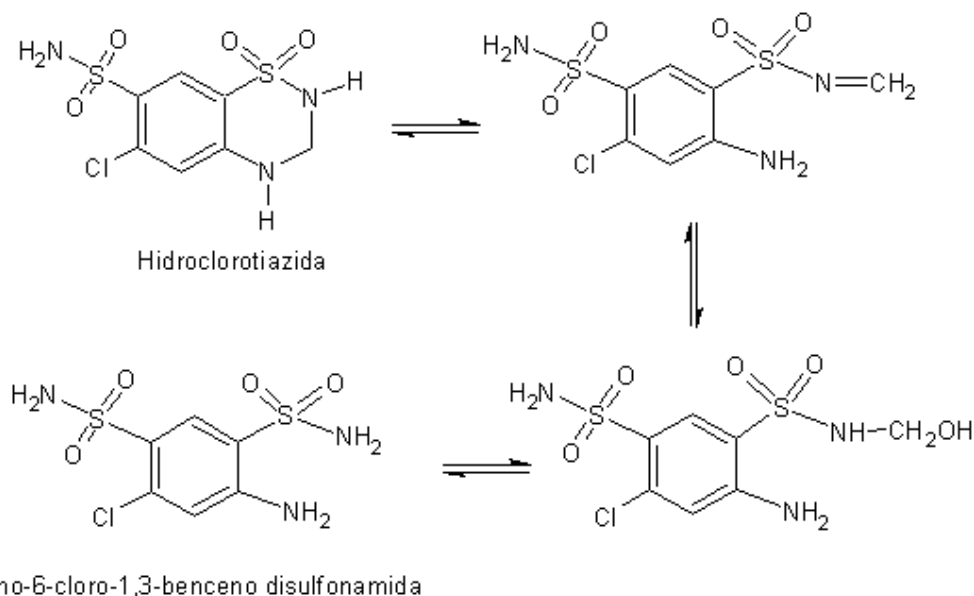


Figura 3. Reacción de hidrólisis para la hidroclorotiazida.

2.1.2. Propiedades farmacológicas

La hidroclorotiazida presenta los siguientes efectos farmacológicos:

- Disminución de la presión sanguínea abatiendo el sodio corporal almacenado. Inicialmente, disminuye el volumen sanguíneo y el gasto cardíaco; después de 6-8 semanas, el gasto cardíaco regresa a la normalidad mientras declina la resistencia vascular periférica.
- Reducción de la acumulación de edema.
- Incremento de la reabsorción distal de calcio provocando un efecto hipocalciúrico.
- Efecto diurético, el cual presenta su efecto máximo a las 4 horas y dura de 6 a 12 horas.

2.1.3. Absorción, Distribución, Metabolismo y Eliminación (ADME) ⁽¹⁰⁾

La hidroclorotiazida pertenece al grupo de las benzotiazidas. Esta clase de diuréticos tiene una historia interesante y ofrece un ejemplo instructivo de la forma en que agentes recién sintetizados pueden poseer propiedades eficaces e imprevistas. Se sintetizaron a partir de estudios sobre inhibidores de la anhidrasa carbónica. En el examen de ciertas benceno disulfonamidas se comprobó el cierre del anillo entre un grupo acilamino y el correspondiente grupo orto sulfamilo, lo cual alteró las características fundamentales de la diuresis. La orina evacuada contenía mayores cantidades de cloruro, respuesta muy diferente a la producida por los compuestos originales. Estudios subsiguientes indicaron que las benzotiazidas tienen un efecto directo sobre el transporte renal de sodio y cloruro que es independiente de cualquier efecto sobre la anhidrasa carbónica.

La clorotiazida fue el primer miembro de esta clase que se estudió ampliamente; aunque posteriormente se prepararon muchos análogos, la acción farmacológica básica es la misma que la de la clorotiazida.

El perfil de la hidroclorotiazida en el plasma es diferente al de la clorotiazida durante la fase posterior a la absorción; la clorotiazida exhibe una pendiente inicial rápida en los

niveles plasmáticos hasta las 12 horas y después declina irregularmente. ⁽¹¹⁾ Las concentraciones de la hidroclorotiazida también presentan una pendiente inicial rápida hasta las 12 horas, pero posteriormente se presenta un declive consistente y lento con un tiempo de vida media de 8-10 h. ⁽¹¹⁾ El tiempo de vida media de la clorotiazida es de 1-2 horas. ⁽¹¹⁾

2.1.3.1. Absorción. Aunque la hidroclorotiazida solamente se diferencia químicamente de la clorotiazida por la adición de dos átomos de hidrógeno, las características de absorción de los dos compuestos son notablemente diferentes.

En sus estudios con hidroclorotiazida marcada (¹⁴C), Beerman ^(12,13) demostró que la hidroclorotiazida no se metaboliza y se elimina por vía renal. Una pequeña porción del fármaco se absorbe del estómago, la mayoría se absorbe en el duodeno y el yeyuno superior. El recobro urinario de la hidroclorotiazida marcada (¹⁴C) administrada por vía oral alcanza el 70% (60-80%) de la dosis en comparación al 90-95% después de una administración intravenosa. La absorción de hidroclorotiazida es proporcional a la dosis cuando se administran 25, 50 y 100 mg.

Otro estudio en el que se administró hidroclorotiazida marcada con ¹⁴C a voluntarios y pacientes, en una dosis única intravenosa (1, 35, 65 mg, n=3 voluntarios) u oral (5, 50, 65 mg; 4 y 6 voluntarios), se encontró que el 90-93% y 53-83% de la dosis se excretó por la orina, respectivamente. De lo anterior, se confirmó que la absorción del fármaco se encuentra en el rango 60-80%. Así mismo, se encontró que la proporción de fármaco eliminado se puede reducir al 40% cuando los pacientes padecen falla cardíaca congestiva o renal y enfermedades hepáticas. ⁽¹²⁾

2.1.3.2. Distribución y metabolismo. El fármaco se une a proteínas plasmáticas en una proporción menor al 40%, con una relación de concentración en sangre/plasma entre 2.5 y 3.0; por lo que se sospecha una posible unión a eritrocitos. Para sustentar esta idea, Lindström ⁽¹⁴⁾ y Beerman ⁽¹²⁾, realizaron un estudio en el cual se encontró que las concentraciones en plasma en 3 pacientes fueron 260, 386 y 616

ng/ml en el intervalo 3-4 horas, que corresponden al triple de los valores en los eritrocitos.

El volumen de distribución de la hidroclorotiazida es de aproximadamente 3.0 L/Kg, se distribuye principalmente en el hígado, y en proporciones menores en el bazo, músculo y cerebro.

2.1.3.3. Eliminación. La vida media de eliminación se ha estimado entre 5.6 y 14.8 horas; su efecto diurético se presenta después de 2 horas y llega al máximo en 4 horas aproximadamente.

Durante los experimentos que se han realizado, se observó que después de una dosis oral única de 12.5 mg - 75 mg, el recobro urinario es 65-72%, lo que indica que es independiente de la dosis.⁽¹¹⁾ En otro estudio realizado por Beerman,⁽¹⁵⁾ donde se evaluó la bioequivalencia de 2 productos (tabletas de 25 mg), los valores del porcentaje excretado se encontraron en el mismo rango 70.8% ± 14.9% vs. 65.2% ± 10.1%.

Resulta interesante que a pesar de que los niveles plasmáticos son proporcionales a la velocidad de excreción urinaria de la hidroclorotiazida, el incremento de la excreción de electrolitos es independiente de la dosis en el rango 25 – 100 mg.⁽¹⁶⁾

El mecanismo de eliminación bifásico, aún no se puede explicar claramente pero se estima que se debe a la paulatina liberación del fármaco a partir de los tejidos y, por otra parte, a que la hidroclorotiazida se puede acumular en los glóbulos rojos, alcanzándose el equilibrio entre el agua plasmática y los eritrocitos 4 horas después de administrar una dosis oral.⁽¹⁷⁾

Los valores de las constantes de velocidad de primer orden obtenidos por Patel,⁽¹⁷⁾ con la ecuación $C = xe^{-at} + ye^{-\beta t} + ze^{-\gamma t}$, a partir de perfiles plasmáticos individuales

después de la administración de tabletas de 25, 50 y 100 mg de hidroclorotiazida, se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 1. Constantes de velocidad de la hidroclorotiazida

Dosis (mg)	α (h^{-1})	β (h^{-1})	γ (h^{-1})
25	0.40 ± 0.35	0.085 ± 0.084	0.90 ± 0.30
50	0.32 ± 0.28	0.082 ± 0.084	0.99 ± 0.34
100	0.32 ± 0.12	0.10 ± 0.11	0.85 ± 0.77

Se estima que la depuración renal es de 319 a 345 mL/min y que después de 24 horas se elimina una proporción del 65% a 72% del total de la dosis absorbida. Esto es lo que hace a la hidroclorotiazida, un candidato para determinar la biodisponibilidad mediante mediciones de la excreción acumulada del fármaco en orina.

En la Tabla 2 se presentan parámetros farmacocinéticos reportados por algunos autores.

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos de la hidroclorotiazida (H: Hombres; M: Mujeres)

Autor	Dosis (mg)	Número de voluntarios	Edad (años)	C _{max} (media ± d.e.) (ng / ml)	T _{max} (media ± d.e.) (h)	AUC (ng.h/ml)	Cl _r (media ± d.e.) (ml/min)	T _{1/2} (media ± d.e.) (h)	% Recuperado (media ± d.e.) (0-48h)
Patel ⁽¹⁷⁾ (EUA)	50	12	22-29	280 ± 108	2.1 ± 1.0	1968 ± 390 (0 - 36 h)	222 ± 36	8.4 ± 5.4	54.5
	100	12	22-29	437 ± 105	2.3 ± 1.0	3554 ± 779 (0 - 36 h)	232 ± 52	12.1 ± 8.9	50.3
Redalieu ⁽¹⁸⁾ (EUA)	100	4	23 - 29	657	2.0	4421 (0 - ∞)			
Kraml ⁽¹⁹⁾ (CANADA)	25	22	22 - 29	185 ± 11	3.35 ± 0.3	1683 ± 87 (0 - 48 h)		13.9 ± 2.2	
	25	19	22 - 29	238 ± 24	2.13 ± 0.2	1226 ± 95 (0 - 12 h)			
Barbahalya ⁽²⁰⁾ (EUA)	50	8 (en ayuno)	23 - 35	310 ± 130	2.4 ± 1.8	2097 ± 717 (0 - 24 h)	307 ± 124		75 ± 8.4
	50	8 (con alimentos)	23 - 35	241 ± 66	2.9 ± 1.5	1777 ± 384 (0 - 24 h)	320 ± 100		70.5 ± 9.3
Sabanathan ⁽²¹⁾ (INGLATERRA)	50	6	22 - 29	297.83 ± 25.58		3378.50 ± 349.82 (0 - 24 h)		9.92 ± 4.03	
	100	6	69 - 77	483.67 ± 32.19		7633.80 ± 471.31 (0 - 24 h)		11.36 ± 2.18	

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos de la hidroclorotiazida (H: Hombres; M: Mujeres). Continuación.

Autor	Dosis (mg)	Número de voluntarios	Edad (años)	C _{max} (media ± d.e.) (ng / ml)	T _{max} (media ± d.e.) (h)	AUC (ng.h/ml)	Cl _r (media ± d.e.) (ml/min)	T _{1/2} (media ± d.e.)	% Recuperado (media ± d.e.) (0-48h)
Beerman ⁽¹⁵⁾ (Suecia)	25	8 (4H, 4M)	18 - 32	142 ± 50	2 - 5	613 ± 276 (0 - 9 h)	332 ± 139		72
	50	8 (4H, 4M)	18 - 32	260 ± 88	2 - 4	1275 ± 526 (0 - 9 h)	340 ± 121		65
	75	8 (4H, 4M)	18 - 32	376 ± 70	2 - 4	1923 ± 295 (0 - 9 h)	319 ± 86		65.2
Beerman ⁽¹⁶⁾ (Suecia)	75	8 (4H, 4M)	18 - 32	512 ± 190	2.6 ± 0.8	2399 ± 932 (0 - 9 h)	304		70.8 ± 14.9
	75	10	18 - 32	376 ± 70	2.9 ± 0.8	1923 ± 295 (0 - 9 h)	319		35.2 ± 10.1
Williams ⁽²²⁾ (E.U.A.)	50	10	20 - 35	229 ± 53		1100 ± 160 (0 - 8 h)	355 ± 60		63.1 ± 9.0
	100	8 (1H, 7M)	20 - 35	233 ± 1.7		2050 ± 410 (0 - 8 h)	315 ± 75		53.7 ± 7.5

2.1.4. Efectos terapéuticos ^(1,6,7,8,9)

Diurético. La hidroclorotiazida afecta el mecanismo tubular renal distal de la reabsorción de electrolito. A la máxima dosis terapéutica todas las tiazidas son aproximadamente iguales en su eficacia diurética. La hidroclorotiazida incrementa la excreción de sodio y cloruro en aproximadamente proporciones equivalentes. La natriuresis puede acompañarse de algo de pérdida de potasio y bicarbonato. Después de la administración oral, la diuresis comienza en 2 horas, alcanza el máximo en aproximadamente 4 horas y perdura alrededor de 6 a 12 horas.

Antihipertensivo. La hidroclorotiazida controla la hipertensión, pero no la cura. El mecanismo del efecto antihipertensivo funciona al hacer que los riñones eliminen el agua y la sal innecesarias a través de la orina.

2.1.5. Indicaciones y dosificación

En la Tabla 3, se describen las indicaciones y dosis de la hidroclorotiazida.

Tabla 3. Indicaciones y dosificación

Indicación	Acción	Dosis
Adulto	Diurético	25 a 100 mg, 1 ó 2 veces diarias
	Antihipertensivo	25 a 100 mg, 1 ó 2 veces diarias. La dosis se ajusta de acuerdo a la respuesta
	Edema	25 - 100 mg por vía oral diarios o intermitentemente para mantenimiento con objeto de reducir al mínimo el desequilibrio electrolítico
Pediátrico	Diurético	1 ó 2 mg por Kg de peso corporal, 1 ó 2 veces al día. La dosis se ajusta de acuerdo con la respuesta.
	Edema	Niños mayores de 6 meses: 2.2 mg / Kg por vía oral diarios, divididos en 2 dosis diarias. Niños menores de 6 meses: hasta 3.3 mg / Kg por vía oral diarios divididos en 2 dosis.

Las dosis disponibles en tabletas de hidroclorotiazida como monofármaco en el mercado de América del Norte son:

País	Producto	Laboratorio
México ^(a)	Rofucal (25 mg),	Probiomed
Estados Unidos de América y Canadá ^(b)	Oretic (50 mg) Esidrix (25mg y 50 mg) Hydrochlorothiazide (25mg y 50mg)	Abbott Novartis Clonmel Healthcare; Ivax Pharms; Pharm Form; Purepac Pharm; Sandoz; Vintage Pharms

(a) Relación de medicamentos innovadores o productos de referencia. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios; Comisión de Autorización Sanitaria, SSA México (Febrero 2006).

(b) Electronic Orange Book. Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations. Current through February 2006. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research; Office of Pharmaceutical Science; Office of Generic Drugs.

2.1.6. Efectos secundarios⁽⁹⁾

Los efectos secundarios reportados son:

Hematológicos: Anemia aplásica, agranulocitosis, leucopenia, trombocitopenia.

Cardiovasculares: Disminución de volumen y deshidratación, hipotensión ortostática.

Gastrointestinales: Anorexia, náusea, pancreatitis.

Hepáticos: Encefalopatía hepática.

Metabólicos: Hipopotasemia, hiperuricemia asintomática, hiperglucemia y alteración de la tolerancia a la glucosa, desequilibrio electrolítico, incluyendo hiponatremia e hipercloremia por dilución, alcalosis metabólica, hipercalcemia, gota.

Piel: Dermatitis, fotosensibilidad, erupción

Otros: Reacciones de hipersensibilidad como neumonitis y vasculitis.

2.1.7. Interacciones y consideraciones especiales⁽⁹⁾

La interacción con colestiramina y colestipol disminuye la absorción intestinal de tiazidas, por lo que se recomienda separar las dosis tanto como sea posible.

La combinación con diazóxido aumenta los efectos hipertensores, hiperglucémicos e hiperuricémicos, por lo que deberá tenerse mucha precaución al administrarlos conjuntamente.

Contraindicada en anuria; hipersensibilidad a otras tiazidas o derivados de sulfonamida. Debe usarse con precaución en trastorno renal grave, disfunción hepática, enfermedad hepática progresiva.

- Se debe verificar con regularidad la ingestión y excreción de agua, peso, electrolitos séricos, en particular potasio. La debilidad y calambres musculares son signos de hipopotasemia.
- Se deben medir con regularidad las concentraciones de creatinina sérica. El medicamento NO es eficaz si los valores son 2 veces más altos de lo normal.
- La concentración de ácido úrico debe cuantificarse, especialmente en personas con historia de gota.
- Los requerimientos de insulina deben comprobarse en pacientes con diabetes. Es posible el uso de agentes antidiabéticos orales para hiperglucemia grave.
- En hipertensión, la respuesta terapéutica puede tardar varios días.
- El medicamento se tomará en la mañana para prevenir la nocturia.
- Personas de edad avanzada son especialmente susceptibles a diuresis excesiva.

2.1.8. Reacciones adversas y toxicidad

Cuando el tratamiento es prolongado o en el caso de pacientes susceptibles, la pérdida de potasio puede ser tan importante como para producir hipocalcemia. Así mismo, los enfermos que toman concomitantemente digitálicos tienen mayor riesgo de intoxicación

con este alcaloide debido a que la hidroclorotiazida disminuye los niveles de potasio, por lo que es probable que se requiera de una dieta rica en este catión o un diurético que afecte en menor grado este parámetro. Entre los alimentos ricos en potasio se encuentran las frutas cítricas, tomates, plátanos, dátiles y chabacanos.

2.1.9. Estudios de bioequivalencia

A continuación se presentan otros estudios de bioequivalencia que se han realizado:

- Hidroclorotiazida y Triamtereno: Blume,^(23,24) Sharoky,⁽²⁵⁾ Williams,⁽²⁶⁾ Knauf,⁽²⁷⁾ realizaron estudios de bioequivalencia de productos con triamtereno e hidroclorotiazida (genérico, Dyazide y Maxzide), en los cuales no se observaron diferencias significativas en la cantidad excretada, velocidad máxima de excreción y el tiempo para alcanzar la velocidad máxima de excreción urinaria entre ambos productos. La combinación triamtereno - hidroclorotiazida (1:1.5) evitó la caída brusca de los niveles de potasio. Por otra parte, encontraron que, conforme aumenta la dosis de triamtereno aumenta la cantidad excretada inalterada de hidroclorotiazida en la orina, provocando una menor biodisponibilidad del diurético. Posteriormente Upton⁽²⁸⁾ demostró que no existe interacción entre los fármacos, y por lo tanto, se pueden administrar en forma separada o combinada.
- Hidroclorotiazida y Mepindolol: Krause⁽²⁹⁾ realizó un estudio de bioequivalencia de mepindolol, comparando los monofármacos Corindolan (mepindolol 10 mg) y Esidrex (hidroclorotiazida 25 mg) con respecto al producto combinado (Tenesor), utilizando un diseño cruzado en el que participaron 5 voluntarios sanos. La cantidad excretada inalterada de hidroclorotiazida eliminada por vía renal después de 48 h fue de aproximadamente el 60% de la dosis y el tiempo de vida media 3 h.

- Hidroclorotiazida y Enalapril: Howes ⁽³⁰⁾ realizó un estudio de farmacocinética de enalapril (tabletas 10 mg) e hidroclorotiazida (tabletas 25 mg), encontrando que la hidroclorotiazida fue bioequivalente tanto al administrar las tabletas en forma separada como simultáneamente. Gómez ⁽³¹⁾ verificó que el enalapril atenúa los cambios diuréticos indeseables de la hidroclorotiazida.
- Hidroclorotiazida - Guanabenz: Chiang ⁽³²⁾ comparó la farmacocinética de guanabenz (16 mg) e hidroclorotiazida (25 mg), después de administrarlos por separado y en combinación. Las concentraciones plasmáticas promedio de hidroclorotiazida, administrada en forma separada, fueron similares hasta las 3 h, pero con el producto combinado fueron más altas en el intervalo 4 - 48 h ($p < 0.05$). Aún cuando los niveles fueron más altos, la velocidad de absorción de la hidroclorotiazida para la tableta combinada no se modificó sustancialmente (biodisponibilidad promedio 120%), por lo que no se consideró clínicamente significativo. Se propone que este aumento pudo haber sido debido a la disponibilidad sistémica creciente de la hidroclorotiazida en presencia del guanabenz, un agonista alfa-adrenérgico, que pudo haber demorado el transporte intestinal de la hidroclorotiazida, dando por resultado el aumento de la absorción gastrointestinal.
- Hidroclorotiazida - Amilorida: Morales ⁽³³⁾ realizó en México un estudio para comparar formulaciones de hidroclorotiazida y amilorida en tres productos, con 9 pacientes (5 hombres y 4 mujeres), y encontró que los productos eran bioequivalentes con porcentajes de recobro de aproximadamente 54.76% - 55.3%.
- Hidroclorotiazida - Polivinilpirrolidona: Corrigan ⁽³⁴⁾ demostró que la polivinilpirrolidona mejora la biodisponibilidad de la hidroclorotiazida, aunque el incremento fue menor al esperado. Las pruebas de disolución que realizó no correlacionaron cuando usó el método de canastilla USP, mientras que al utilizar el método de Levy con agitación de 40 rpm obtuvo entonces una buena

correlación entre el porcentaje disuelto a los 30 minutos y la cantidad excretada inalterada después de 24 h. Las pruebas de disolución revelaron que PVP retarda la disolución inicial de las cápsulas, probablemente retardando la desintegración y la dispersión de las partículas del fármaco.

- Hidroclorotiazida - Colestiramina: Hunninghake ^(35,36) evaluó la biodisponibilidad de formulaciones conteniendo hidroclorotiazida (75 mg) y colestiramina (8 mg), y encontró que la cantidad excretada en la orina de hidroclorotiazida inalterada disminuyó en un 35%, lo cual concordaba con los datos obtenidos de plasma, ya que el $AUC_{0-\infty}$ y C_{max} disminuyeron en un 32% y 31%, respectivamente.
- Hidroclorotiazida - Alimentos: Melander ⁽³⁷⁾ y Beerman ⁽³⁸⁾ determinaron que la presencia de alimento en el tracto gastrointestinal aumenta la biodisponibilidad de la hidroclorotiazida. De los resultados de sus estudios obtuvieron una diferencia significativa ($p < 0.01$) en la cantidad excretada inalterada en la orina, ya que después de administrar una dosis de 75 mg la cantidad excretada inalterada fue de 55.6 ± 4.9 mg, mientras que en ayuno el valor fue de 47 ± 6.0 mg,

2.2. BIOEQUIVALENCIA

2.2.1. Semblanza internacional.

ESTADOS UNIDOS^(39,40,41,42,43,44)

La producción de guías propuestas y lineamientos para la evaluación de fármacos en EU es muy abundante; de hecho, fue el primer país que comenzó a desarrollar medidas para el aseguramiento de la efectividad y la seguridad de los medicamentos

En 1974, la FDA convocó a una consulta acerca del tema de “*bioequivalencia y biodisponibilidad*” para comenzar a conformar una regulación al respecto. El resultado de esta consulta es el documento “Regulación para la biodisponibilidad y la bioequivalencia de medicamentos” editado en 1977, que en la subparte C incluye los criterios para el establecimiento de la bioequivalencia entre medicamentos, así como los requisitos de estudios *in vitro* y de comercialización del producto. A partir de aquí, los requisitos para establecer la biodisponibilidad y bioequivalencia de los medicamentos, se incluyeron en el Code Federal Regulation (CFR), título 21, parte 320.

En 1984 se dio un giro a la regulación, mediante la Enmienda Waxman-Hatch, la cual estimulaba la competencia entre las NDA y las ANDA ya que para los primeros se podía ampliar el período de exclusividad de la patente y para los segundos se disminuyeron los trámites de aprobación de los productos, lo cual trajo como consecuencia el aumento en la calidad de producción, la disminución de costos, el incremento en la competitividad y un estímulo para la investigación.

En otros países como Canadá los primeros intentos de regulación aparecen en 1973, cuando la agencia gubernamental *Health Protection Branch* (HPB) publica un documento que incluye conceptos de biodisponibilidad y biodisponibilidad relativa, que se aplicaron de forma práctica a algunos medicamentos de producción nacional como primer intento de establecer la bioequivalencia. Posteriormente el Comité de Expertos Consejeros elabora un informe denominado “Guías y estándares para biodisponibilidad de formas de dosificación oral de medicamentos usados para efectos sistémicos” que envía al HPB, y de donde se toman los conceptos más importantes, poniendo un especial énfasis en las formas de dosificación “normales” y las “complicadas”, y que son tratadas con diseños y

criterios diferentes. Asimismo, se establecen requerimientos diferentes para evaluar las formulaciones de “*liberación inmediata*” y de “*liberación modificada*”. En lo referente a los métodos analíticos es necesario asegurar que estos son sensibles, precisos, específicos y reproducibles. Capaces de cuantificar de manera satisfactoria el fármaco en la matriz biológica designada.

El intervalo de confianza del cociente Prueba / Referencia de medias geométricas, para la C_{max} y AUC, deben ajustarse al rango 80-125%, incluso para los fármacos de estrecho margen terapéutico.

Adicionalmente, se establece que los valores de los intervalos de confianza no deberían redondearse, o sea, que para cumplir el criterio de 80% a 125%, el límite inferior no debe ser menor de 80.00 y el límite superior no debe ser mayor de 125.00. Sin embargo, en las guías para la industria, se proponen otros dos criterios como son la Bioequivalencia Poblacional y la Individual.

CANADA ⁽⁴⁶⁾

Las recomendaciones de este país contenidas en el documento *GUIDANCE FOR INDUSTRY Conduct and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies - Part A: Oral Dosage Formulations Used for Systemic Effects, 1992*, para fármacos de características no complicadas, establecen los siguientes criterios – obtenidos de estudios cruzados de biodisponibilidad comparativa a dosis única - para declarar bioequivalencia:

- El intervalo de confianza al 90% del cociente Prueba / Referencia de medias geométricas de AUC_{0-t} debe estar dentro de 80% a 125%.
- El cociente Prueba / Referencia de medias geométricas de C_{max} debe estar dentro de 80% a 125%.

Asimismo, la guía presenta un método de cálculo para corregir los cocientes de C_{max} y AUC obtenidos, así como los intervalos de confianza, tomando como base a las diferencias de título de las formulaciones administradas. El *título* es la cantidad de fármaco por unidad posológica que se consigna en el marbete. Usualmente, se constata en la prueba de control de calidad del lote de cada formulación administrada. Generalmente, la cantidad de fármaco contenida en cada unidad posológica se halla dentro de un $\pm 10\%$ de

la cantidad declarada en el envase; sin embargo, ese ámbito de permisividad suele ser menor en los fármacos de estrecha ventana terapéutica (por ej., $\pm 5\%$ para comprimidos de Litio) y mayor en el caso contrario (por ej., 90-120% para formulaciones orales de Amoxicilina).

Con respecto a T_{max} , la guía aclara que a pesar de que es un parámetro útil para evaluar la velocidad de absorción, a menudo es difícil determinar este parámetro con exactitud y la significancia entre las diferencias varía de fármaco en fármaco.

Otra característica de la guía es que en caso de que el intervalo de confianza sea muy amplio, se pueden agregar más sujetos al estudio siempre que se siga el mismo protocolo y se lleve a cabo una prueba F y ANADEVIA, a un α de 5%, para examinar la interacción Formulación por estudio entre los estudios secuenciales realizados.

JAPON⁽⁴⁷⁾

Según la guía para estudios de bioequivalencia, (2002):

- a) Los dos productos son considerados bioequivalentes, si el intervalo de confianza al 90% de la diferencia entre los valores promedio del logaritmo de AUC y C_{max} de los productos Prueba y Referencia se halla dentro del rango aceptable de $\text{Log}(0.8) - \text{Log}(1.25)$.
- b) Sin embargo, aún cuando el intervalo de confianza no estuviera dentro del rango anterior, ambos productos pueden ser considerados bioequivalentes, si se cumplen las siguientes tres condiciones:
 - i. El tamaño total de la muestra del estudio inicial de bioequivalencia no es menor que 20 ($n = 10/\text{grupo}$) y el tamaño de muestra combinado del estudio inicial y el estudio agregado no es menor que 30,
 - ii. Las diferencias en los valores medios del logaritmo de AUC y C_{max} entre ambos productos se hallan entre $\text{Log}(0.9) - \text{Log}(1.11)$ y
 - iii. Se evalúa que las velocidades de disolución de ambos productos son equivalentes en todas las condiciones de disolución establecidas.

Si se halla una diferencia significativa entre los parámetros AUC y C_{max} de los productos Prueba y Referencia, los efectos de esta diferencia sobre la equivalencia terapéutica deben ser explicados.

Otras variantes que recomienda son:

- Estudios a dosis múltiples o con isótopos estables pueden ser útiles para fármacos de alta variabilidad que requieran tamaños de muestra más grandes.
- Para fármacos con acciones farmacológicas suaves, un rango más amplio puede ser aceptable.

OMS ^(48,49,50)

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 1996) establece las características farmacocinéticas a ser evaluadas, los procedimientos del estudio e indica que deben establecerse de antemano las normas en el protocolo. Un cambio post hoc en los métodos especificados para la evaluación estadística es aceptable sólo si el cumplimiento del protocolo excluyera una evaluación significativa y si tal cambio en el procedimiento ha sido completamente justificado. Los rangos de aceptación para las principales características son:

- a. Cociente de AUC. El intervalo de confianza al 90% de esta medida de biodisponibilidad relativa, debe generalmente estar dentro de un rango de bioequivalencia de 80-125%. Si el rango terapéutico es particularmente estrecho, podría ser necesario que el rango de aceptación fuera más reducido. Un rango más amplio puede ser aceptable si es clínicamente apropiado.
- b. Cociente de C_{max} . Esta medida de biodisponibilidad relativa es inherentemente más variable que, por ejemplo, el cociente de AUC, y un rango de aceptación más amplio puede ser apropiado. El rango usado debe estar justificado tomando en cuenta consideraciones de seguridad y eficacia.
- c. Diferencia de T_{max} . La evaluación estadística de T_{max} sólo tiene sentido si hay una justificación clínicamente relevante de acción o liberación rápida o signos de una relación con efectos adversos. El intervalo de confianza no paramétrico al 90% para esta medida de biodisponibilidad relativa debería estar dentro de un rango clínicamente relevante.

UNION EUROPEA ⁽⁵¹⁾

En los estudios para determinar bioequivalencia promedio, los rangos de aceptación para los Parámetros de Biodisponibilidad se detallan a continuación:

- a. Cociente de AUC. El intervalo de confianza al 90%, para esta medición de biodisponibilidad relativa, debería estar dentro de un intervalo de aceptación de 0.80 a 1.25. En casos específicos de estrecho rango terapéutico, podría necesitarse que el intervalo de aceptación sea más ajustado. En raros casos, puede ser aceptable un rango de aceptación más amplio, fundamentado en una justificación clínica lógica.
- b. Cociente de C_{max} . El intervalo de confianza al 90%, para esta medición de biodisponibilidad relativa, debería estar dentro de un intervalo de aceptación de 0.80 a 1.25. En casos específicos de estrecho rango terapéutico, podría requerirse un intervalo de confianza más cercano. En otros casos, un intervalo más amplio puede ser aceptable. El intervalo - por ejemplo 0.75 a 1.33- debe definirse y justificarse prospectivamente.
- c. Diferencia de T_{max} . La evaluación estadística de T_{max} sólo tiene sentido si hay un intervalo clínicamente relevante de acción o liberación rápida o signos de una relación con efectos adversos. El intervalo de confianza no paramétrico al 90% para esta medida de biodisponibilidad relativa debería estar dentro de un rango clínicamente relevante.

En síntesis, las diferencias principales tienen que ver con distintos grados de flexibilidad:

ESTADOS UNIDOS establece el criterio más estricto (80%-125% para los intervalos de confianza del cociente de medias geométricas de Prueba / Referencia, tanto para C_{max} como para ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$.

CANADA, si bien establece un criterio semejante para AUC (aunque sólo exige que AUC_{0-t} lo cumpla, no $AUC_{0-\infty}$, reconoce que C_{max} es un parámetro de mayor variabilidad y

el límite 80%-125% lo aplica, en el caso de este parámetro, directamente al cociente de medias geométricas, Prueba / Referencia (o sea, no calcula los límites de confianza para C_{max}). Asimismo, permite la corrección de los cocientes y sus límites de confianza, según el *título* del lote de las formulaciones empleadas y autoriza la realización de estudios secuenciales.

JAPON, de ser necesario, se independiza de la variabilidad de los parámetros C_{max} y AUC, estrechando el rango a 90%-110%; pero aplicándolo sólo a los cocientes de medias geométricas (no exige la inclusión de los límites de confianza dentro del intervalo). Asimismo, considera la posibilidad de estudios secuenciales.

Tanto la OMS como la UNION EUROPEA dejan abierta la posibilidad de flexibilización del rango 80-125% para el intervalo de confianza de ambos parámetros, atendiendo justificaciones prospectivas en casos especiales y reconociendo particularmente la mayor variabilidad de C_{max} .

2.2.2. Regulación en México

En México se ha tratado de crear una mayor conciencia en lo relacionado a la necesidad de medicamentos intercambiables (con el mismo fármaco y con la misma forma farmacéutica) en el mercado, lo cual ha conducido a un interés especial de las autoridades de Salud por establecer un documento que reglamente las pruebas de disolución, biodisponibilidad y bioequivalencia.

En el esfuerzo por generar un sistema para el control de productos genéricos destacan los siguientes:

La primera publicación del gobierno por parte de la Secretaría de Salud, con respecto al control de medicamentos genéricos se dio el 4 de febrero de 1998, en el Reglamento de Insumos para la Salud, Capítulo VII Medicamentos Genéricos Intercambiables, Artículo 75 que a letra dice:

ARTICULO 75. Se incorporan Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables únicamente las especialidades farmacéuticas que reúnan los siguientes requisitos:

- I. *Que cuente con registro sanitario vigente;*

- II. *Que respecto del medicamento innovador o producto de referencia, tengan la misma sustancia activa y forma farmacéutica, con igual concentración o potencia, utilicen la misma vía de administración y con especificaciones farmacopeicas iguales o comparables;*
- III. *Que cumplan con las pruebas establecidas por el Consejo de Salubridad General y la Secretaría de Salud;*
- IV. *Que comprueben que sus perfiles de disolución o su biodisponibilidad u otros parámetros, según sea el caso, son equivalentes a los del medicamentos innovador o producto de referencia;*
- V. *Que estén incluidos en el Cuadro Básico de Insumos para el primer nivel y en el Catálogo de Insumos para el segundo y tercer nivel.*

Posteriormente el 19 de marzo de 1998 se publicó el *Acuerdo por el que se relacionan las Especialidades Farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables y se determinan las pruebas que deberán aplicárseles*. En este documento se indican los criterios para determinar el tipo de prueba que debe aplicarse a un medicamento para ser considerado como genérico intercambiable, y se presenta el Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables.

Con base en este acuerdo los medicamentos que no requieren someterse a pruebas de disolución o bioequivalencia son:

- a. Las soluciones acuosas para uso parenteral, en las que se mantengan las condiciones del medicamento innovador;
- b. Las soluciones orales exentas de excipientes conocidos que modifiquen los parámetros farmacocinéticos;
- c. Los gases;
- d. Los medicamentos tópicos de uso no-sistémico, cuya absorción no implique riesgo;
- e. Los medicamentos para inhalación en solución acuosa, y
- f. Los medicamentos para inhalación en suspensión, que demuestren que el tamaño de la partícula es equivalente con el innovador.

Por otra parte, en este acuerdo indica que los medicamentos que deben cumplir con estudios de bioequivalencia son:

- a. Los medicamentos sólidos orales, con fármacos que requieran para su efecto terapéutico de una concentración estable y precisa, por tener un margen terapéutico estrecho;
- b. Los medicamentos empleados para enfermedades graves;
- c. Los medicamentos de los cuales se tenga conocimiento, por reportes previos, que tienen problemas de biodisponibilidad, como es el caso cuando presentan una pobre absorción; un efecto de primer paso acentuado, metabolismo hepático mayor del 70%; eliminación presistémica; ventana de absorción y cinética no lineal;
- d. Los medicamentos que presenten propiedades fisicoquímicas adversas, como baja solubilidad, inestabilidad y otras similares;
- e. Los medicamentos que tengan una forma farmacéutica de liberación modificada;
- f. Los medicamentos que presenten una proporción elevada de excipientes respecto del principio activo;
- g. Los medicamentos que sean de administración tópica para efecto sistémico, como supositorios, parches transdérmicos, geles de aplicación en mucosas y otros similares;
- h. Las combinaciones fijas de principios activos para acción sistémica;
- i. Los medicamentos que sean de administración tópica de efecto no sistémico, cuya absorción sea riesgosa, los cuales deberán demostrar mediante un estudio de biodisponibilidad su no-absorción, y
- j. Los antibióticos en presentación sólida con vía de administración oral, que previamente a la prueba de bioequivalencia deberán realizar, como parte de las pruebas de control de calidad, un estudio de concentración mínima inhibitoria.

Adicionalmente, en este acuerdo se indica que todos los medicamentos sólidos orales, con excepción de los que se encuentren en alguno o más de los supuestos señalados antes, deben someterse a pruebas de perfil de disolución.

El 25 marzo de 1998 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-003-SSA1-1998, *Medicamentos genéricos intercambiables* y el 7 de mayo de 1999, la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, *Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas*. En estos documentos se establecen los criterios y requisitos que se deben cumplir al realizar pruebas para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos y, también los requisitos para los establecimientos donde se lleven a cabo estos estudios.

Se define a un medicamento genérico intercambiable como: *"el medicamento con el mismo fármaco o sustancia activa y forma farmacéutica, con igual concentración o potencia, que utiliza la misma vía de administración y con especificaciones farmacopéicas iguales o comparables, que después de cumplir con las pruebas requeridas ha comprobado que sus perfiles de disolución o su biodisponibilidad u otros parámetros, según sea el caso, son equivalentes a las del medicamento innovador o producto de referencia, y que se encuentre registrado en el catálogo de medicamentos genéricos intercambiables y se identifique con su denominación genérica"*.

En los criterios y requisitos para las pruebas se señala entre otras cosas que:

- Los productos de referencia y de prueba deben ser de un mismo lote;
- El contenido o potencia de los medicamentos de referencia y de prueba no debe diferir en más del 5%;
- Se debe evaluar la uniformidad de contenido, tanto del medicamento de prueba como del de referencia y los resultados deben cumplir con el criterio de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos vigente (FEUM);
- Los métodos de análisis utilizados durante los estudios deben ser previamente validados y aplicados en las mismas condiciones en ambos productos, cuidando la identidad y estabilidad de las muestras biológicas;
- Se deben registrar todos los acontecimientos ocurridos durante el estudio.

Con respecto a los criterios y requisitos para las pruebas de bioequivalencia en humanos se indica que:

- Los estudios se realizarán con base en lo dispuesto a la Ley General de Salud y en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación por la Salud;
- Se debe emitir un protocolo, que cumple con la legislación citada, el cual debe ser revisado y aprobado por el coordinador general o investigador principal, previo sometimiento a los comités respectivos; y debe ser aprobado por un comité de ética
- Los voluntarios deben ser sanos, tener edades entre 18 y 55 años, con un peso $\pm 10\%$ del ideal, sin antecedentes de abuso de alcohol, café o bebidas de cola, ni consumo de drogas o medicación concomitante. Deben firmar una carta de aceptación para participar en el estudio.
- El diseño experimental que se recomienda para la comparación de dos productos con la administración de una dosis única, es un diseño cruzado aleatorio y el período de lavado debe de ser de por lo menos 7 vidas medias del compuesto bajo estudio
- Se debe establecer el tamaño de muestra estadísticamente, de modo que sea un estimador confiable de los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$ y $T_{m\acute{a}x}$, y no deberá ser inferior a doce;
- La administración de los medicamentos se debe ser vía oral con 250 ml de agua; los voluntarios deben ayunar por los menos 10 horas antes de la administración y se sugiere que se mantengan así hasta dos horas después;
- El horario de la toma de muestras debe diseñarse de tal manera que es posible obtener muestras de sangre durante al menos 11 diferentes tiempos de muestreo, se cubre el 80% del área bajo la curva de concentración plasmática (aproximadamente 4 vidas medias), y permite la caracterización de la velocidad y el grado de absorción, para estimar $C_{m\acute{a}x}$, el área bajo la curva de concentración plasmática y otros parámetros farmacocinéticos;
- A partir de la determinación de las concentraciones plasmáticas y/o urinarias se requiere el cálculo de: ABC_{0-t} , $ABC_{0-\infty}$, $C_{m\acute{a}x}$, $T_{m\acute{a}x}$, Ae , Ae_{∞} , dAe/dt ; y con carácter complementario: $t_{1/2}$ y TMR;

- Sólo deben autorizarse procedimientos para el análisis de datos y estadística que no superen el riesgo simbólico del 5%;
- Se debe elaborar un informe detallado de los datos individuales, así como de las presentaciones gráficas, Tablas y la interpretación, en la cual se especifica si los medicamentos son o no bioequivalentes, o si no es posible concluir bioequivalencia.

La publicación más reciente en la regulación mexicana es el *Acuerdo por el que se adiciona y modifica la relación de especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos y se determinan las pruebas que deberán aplicarseles* (DOF 21 de febrero de 2008).

En esta publicación se establece que es necesario realizar la prueba de tamaño de partícula además del perfil de disolución para las especialidades siguientes:

- Beclometasona (suspensión en aerosol)
- Budesonida (polvo para inhalación)
- Budesonida (suspensión en aerosol)
- Budesonida (suspensión para nebulizar)
- Budesonida-formoterol (polvo para inhalación)

La prueba de perfil de disolución para:

- Ácido risedronico (grageas)
- Alendronato de sodio (comprimidos)
- Clorfenamina (tabletas)
- Ergotamina y cafeina (tabletas o grageas)
- Metoprolol (tabletas o grageas)
- Paracetamol (tabletas)
- Pinaverio (tabletas)

se debe realizar a 3 diferentes pH: a) Solución 0.1 N de ácido clorhídrico o fluido gástrico simulado sin enzima, b) Solución reguladora pH 4.5 y c) Solución reguladora pH 6.8 o fluido intestinal simulado sin enzima. Deben cumplir el criterio de F2 en los tres pH, independientemente de la cantidad disuelta.

También se establece en este acuerdo, que es necesario un estudio de bioequivalencia especial para:

- ACARBOSA (Tabletas)
- VALPROATO DE MAGNESIO (Suspensión oral)

2.2.3. Guía para estudios de biodisponibilidad y disolución de tabletas orales conteniendo hidroclorotiazida (FDA, 1987) ⁽⁵⁴⁾

La guía indica en su apartado “estudios de bioequivalencia”, que el estudio de biodisponibilidad se debe llevar cabo utilizando un diseño cruzado 2x2 empleando al menos 20 voluntarios varones adultos, sanos y normales.

Los sujetos se deben seleccionar con base a un historial clínico, un examen físico y pruebas de laboratorio clínico. Los voluntarios no deben tomar ningún medicamento durante un período de al menos una semana previa al estudio y durante el mismo. Tampoco deben consumir bebidas alcohólicas o que contengan xantinas durante al menos 48 horas antes a la administración de la hidroclorotiazida.

Se debe considerar un intervalo de lavado de al menos 2 semanas entre los períodos de administración.

El producto de prueba debe provenir de un lote de producción o de un lote bajo condiciones de producción. El producto de referencia debe ser Hydrodiuril® (Merck). Después de una noche en ayuno, se debe administrar una dosis única en una tableta conteniendo 50 mg del producto de prueba o de referencia con 240 ml de agua y después de transcurrir 2 horas a partir del momento de la administración, los voluntarios pueden tomar sus alimentos.

Se debe tomar muestras de orina a -1-0, 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-6, 6-8, 8-12 y 12-24 horas. Durante el estudio, los voluntarios deben tomar 120 ml de agua después de la colección de muestra para asegurar la hidratación. Se deberá cuantificar la hidroclorotiazida inalterada con un método específico para este fármaco. Se recomienda que sea un método de cromatografía de líquidos (HPLC) o gases (GC).

Con los datos de excreción urinaria obtenidos de cada sujeto se calculan las velocidades de excreción y la cantidad excretada acumulada, y posteriormente, se deben

examinar estadísticamente. El análisis estadístico debe incluir el análisis de varianza de la cantidad excretada en cada tiempo de muestreo, de la cantidad excretada acumulada y de la velocidad de excreción.

Con respecto a los perfiles de disolución la guía indica que las condiciones de la prueba son:

Número de unidades: 12 tabletas con 50 mg de hidroclorotiazida,

Tiempos de muestreo: 15, 30, 45 y 60 minutos,

Metodología: Aparato I USP XXI, 100 r.p.m., 37°C, 900 ml de solución 0.1 N de ácido clorhídrico.

Cuantificar las muestras al U.V. (272 nm)

La especificación indica que debe disolverse no menos del 60% a los 60 minutos.

2.2.4. Correlación de datos plasmáticos y urinarios

En la guía para estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia publicada en los Estados Unidos de América (Federal Register Jan 7, 1977), se identificó al grupo las tiazidas con problemas potenciales de bioequivalencia. Para asegurar la bioequivalencia de estos productos, se propuso la disolución *in vitro* y requisitos de biodisponibilidad *in vivo*. Los requisitos *in vivo* consistían en estudios de biodisponibilidad en humanos y la comparación de los niveles plasmáticos y/o perfiles de excreción urinaria del fármaco con respecto a un producto de referencia.

De modo general, se supone que la medida de niveles en sangre (plasma o suero) proporciona una mejor información acerca de la biodisponibilidad y/o bioequivalencia con relación a un estudio en orina debido a la complicación de las consideraciones farmacocinéticas tales como el metabolismo del fármaco y los problemas de colección de orina. En ocasiones se argumenta que la presencia de fármaco en la sangre no es un estimador real de la disponibilidad del fármaco en el sitio de acción y solamente se considera como un estimador de la biodisponibilidad; por esta razón se prefiere determinar la cantidad de fármaco en el sitio de acción o medir el efecto terapéutico, aunque generalmente estos dos procedimientos no son factibles.

Los diuréticos tiazidas son inhibidores de la anhidrasa carbónica, que incrementan la excreción renal de iones sodio y cloruro, acompañados de un volumen de agua debido a la diuresis. Este efecto terapéutico se debe a la inhibición de la reabsorción de iones en el túbulo distal. Las tiazidas se excretan inalteradas principalmente en la orina por secreción tubular.

A partir de los párrafos anteriores y desde el punto de vista farmacológico y terapéutico, la medición de la excreción urinaria del fármaco parece ser la elección lógica para asegurar la biodisponibilidad de la forma farmacéutica del diurético. Por otra parte, en los estudios realizados con clorotiazida e hidroclorotiazida se sugiere que la medición de los niveles urinarios proporciona información adecuada para asegurar la biodisponibilidad y bioequivalencia, de hecho los estudios realizados por Beerman ⁽²¹⁾, demostraron que no existe relación entre el área bajo la curva de concentración plasmática – tiempo (AUC) y la cantidad excretada en orina (AE). En otros estudios ⁽⁵⁵⁾ que se realizaron con tiazidas, el análisis de los datos obtenidos reveló que se presenta una mayor variación de los datos de AUC con respecto a los datos de AE, y por consecuencia, sugieren la ausencia de correlación, la cual no puede explicarse con certeza. Una explicación podría ser que las tiazidas interaccionan con los glóbulos rojos. Todas las tiazidas tienen un grupo sulfonamida y los compuestos con estos grupos ha demostrado que interaccionan y se unen a los glóbulos rojos ⁽⁵⁶⁾, este fenómeno afecta los resultados de AUC, porque es difícil asegurar la proporción de fármaco absorbido.

2.3. Métodos analíticos para cuantificar hidroclorotiazida en fluidos biológicos

Se han reportado diversos métodos para la cuantificación de Hidroclorotiazida en fluidos biológicos utilizando diferentes técnicas de cuantificación.

En 1981, Barbhaiya ⁽¹¹⁾ y colaboradores reportaron un método para la cuantificación de Hidroclorotiazida en plasma y orina, empleando una columna C18 con detección al UV a 228 nm para plasma y 271 nm para orina. La fase móvil para la cuantificación en orina estaba constituida de una mezcla de acetonitrilo y solución 0.01M de perclorato de sodio a pH 4.6 (4:96), y para plasma, se utilizó una mezcla metanol y solución 0.01M de perclorato de sodio a pH 4.6 (15:85). La extracción de Hidroclorotiazida de la orina (1ml),

se realizó con acetato de etilo, después de ajustar el pH en 5 con solución amortiguadora de acetatos. La fase orgánica se evaporó y se reconstituyó con metanol. El procesamiento de las muestras de plasma consistió en una extracción de la muestra (2 ml) con tolueno y se extrajo la fase con acetato de etilo, después de ajustar el pH en 3.8 con solución amortiguadora de acetatos. La fase orgánica se evaporó y se reconstituyó en metanol.

En 1984 Koopmans, Ginneken y Gribnau ⁽⁵⁷⁾ desarrollaron un método para determinar hidroclorotiazida en plasma y orina por CLAR, utilizando una columna Lichrosorb RP-18, controlando la temperatura a 38°C. La fase móvil consistió de metanol y agua (20:80), conteniendo sulfato de tetrabutilamonio 0.01024 M y tris-(hidrometil) aminometano 0.00976 M a un pH de 5.5. Se utilizó un detector UV a 272 nm. El pH de la muestra (0.5 ml) se ajustó con una solución amortiguadora de acetatos a 3.8 y posteriormente se extrajo con 5 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se transfirió a un tubo limpio conteniendo 400 mg de bicarbonato de sodio; se mezcló, se centrifugó y se llevó a sequedad, para posteriormente reconstituirla en 0.5 ml de fase móvil, e inyectar 30 µl al sistema cromatográfico.

El método reportado por Van Der Meer y Brown ⁽⁵⁸⁾ en 1987, utiliza una columna Spherosorb ODS, una fase móvil constituida por acetonitrilo – metanol - fosfato de tetrametilamonio a pH 2.8 (10:9:100), y un detector UV a 271 nm. En éste método, a 1 ml de plasma se adiciona solución amortiguadora de carbonatos a pH 10, y se extrae con 5 ml de acetato de etilo. Después de agitar y centrifugar, la fase orgánica se transfiere a un tubo limpio y se reconstituye en 100 µl de fase móvil para inyectar 50 µl al sistema cromatográfico.

Park ⁽⁵⁹⁾ realizó un método el cual cuantifica diferentes diuréticos en orina, entre ellos, hidroclorotiazida. El sistema cromatográfico que utilizó emplea una columna Hypersil ODS y como fase móvil un sistema de gradiente utilizando solución amortiguadora de fosfatos y acetonitrilo, donde la proporción de acetonitrilo se incrementó desde el 4% hasta el 60%. La columna se mantuvo a 40°C y la detección se realiza mediante un detector de arreglo de diodos a 220, 273 y 328 nm.

Azumaya ⁽⁶⁰⁾ reportó un método por CLAR para la cuantificación de hidroclorotiazida en plasma humano, utilizando una columna Hypersil ODS, con detección UV a 272 nm, y una fase móvil compuesta por acetonitrilo – solución 0.007 M de heptanosulfonato de sodio (18:82) conteniendo 1% de ácido acético glacial y 0.035% de trietilamina. El método requiere de 0.5 ml de plasma y extracción con 5 ml de metil ter-butil éter. La fase orgánica se evaporó y el residuo se reconstituyó con 200 μ l de fase móvil, se inyectaron 100 μ l al sistema cromatográfico.

Campins ⁽⁶¹⁾ publicó en 1992 un método para cuantificar diversos diuréticos en orina por cromatografía de líquidos con detección UV. Utilizó una columna Hypersil ODS, con detección a 230 nm. La fase móvil se preparó con acetonitrilo – solución amortiguadora de fosfatos a pH 3 conteniendo 1.4 ml de propilamina por litro, y un sistema de gradiente en el cual se incrementó la concentración de acetonitrilo desde 15% hasta 80%, se extrajo utilizando columnas de extracción en fase sólida C18, sin embargo los recobros fueron bajos.

Cortés ⁽⁶²⁾ desarrolló y validó en 1995, un método HPLC para cuantificar hidroclorotiazida en plasma durante un estudio de bioequivalencia. El método desarrollado permitió separar y cuantificar a la hidroclorotiazida en un intervalo lineal de 10 a 600 ng/mL, sin la interferencia de compuestos endógenos. La cantidad mínima detectable fue de 3 ng/mL y el recobro de hidroclorotiazida fue de alrededor de 87%.

Botello ⁽⁶³⁾ desarrolló en 1996, un método para determinar a la hidroclorotiazida en la orina, basado en la saturación salina de la orina, seguido de una extracción líquido-líquido con acetato de etilo, para su posterior separación por HPLC y detección a 272 nm. El método se validó en dos intervalos de trabajo que abarcaron de 0.5 a 10.0 μ g/mL y de 10.0 a 100.0 μ g/mL. En el primer intervalo el recobro fue de 78.2% y en el segundo fue de 75.96%.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se requiere exportar un producto mexicano a los Estados Unidos de Norteamérica, el cual contiene 50 mg de hidroclorotiazida y esta formulado en comprimidos.

Para poder comercializarlo en ese mercado, es necesario cumplir con la legislación mexicana para producirlo y, demostrar conforme a la legislación norteamericana, que es bioequivalente con el producto innovador.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Selección de productos

Se revisó el *Orange Book* para determinar cual era el producto de referencia para realizar el estudio de bioequivalencia de un producto genérico de comprimidos con 50 mg de hidroclorotiazida.

Los productos evaluados en el estudio fueron:

Producto de referencia. Hydrodiuril 50 mg, comprimidos
Merck & Co.

Producto de prueba Hidroclorotiazida 50 mg, comprimidos
Aplicaciones Farmacéuticas, S. A. de C. V.

4.2. Pruebas de control de calidad

Antes de realizar el estudio de bioequivalencia, se realizaron las pruebas de valoración del principio activo, uniformidad de contenido y disolución, conforme a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica.

(a) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5ª ed., Comisión Permanente de la Farmacopea, Secretaría de Salud. México 1988, pp 1256-1257.

(b) The United States Pharmacopoeia (USP 23 – NF 18) The United States Pharmacopoeial Convention, USA 1995, pp 750-751

4.3. Validación de métodos analíticos

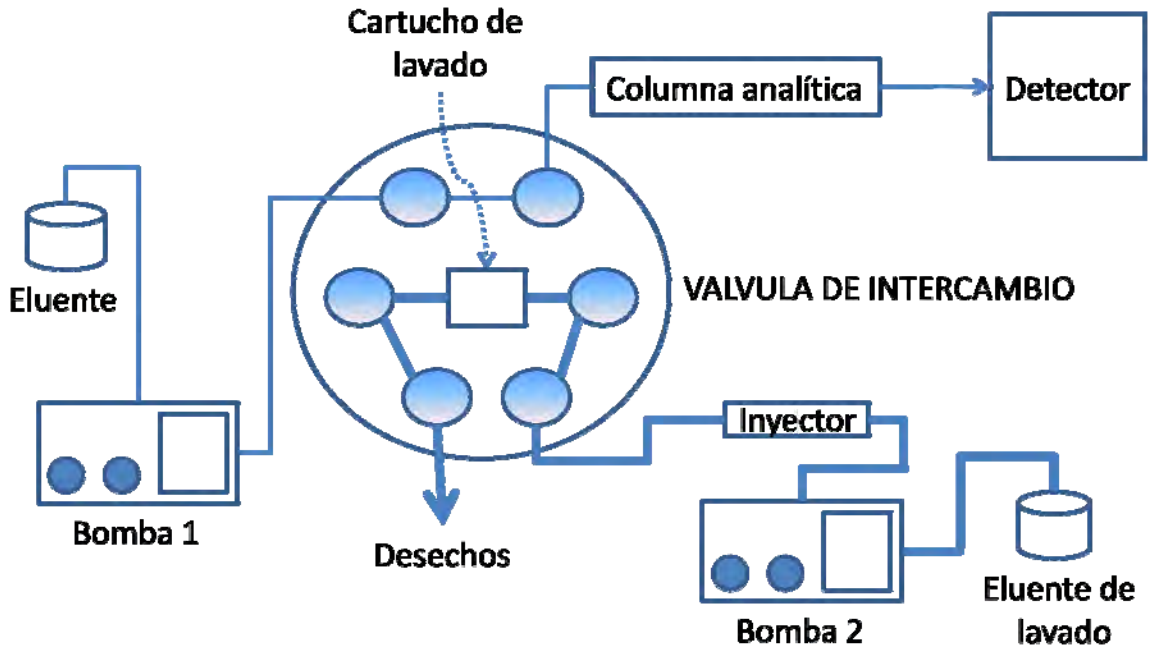
4.3.1. Validación del método analítico para cuantificar hidroclorotiazida en orina

El método utilizado para cuantificar hidroclorotiazida en orina consistió en adicionar a 500 microlitros de orina, 300 microlitros de agua y 200 microlitros de solución de tinidazol (estándar interno). La muestra de orina diluida, se paso a través de un cartucho de extracción en fase sólida con empaque C18 en el cual se retuvieron los compuestos liposolubles y dejando eluir los compuestos de interés. La fracción eluida se inyectó al sistema cromatográfico el cual está ensamblado con una válvula de conmutación de columnas (ver Figura 4), en la cual los compuestos de interés se depositan en una columna Zorbax CN - SB (4.0 mm de diámetro interno x 1.2 cm de longitud) para la limpieza en línea de las muestras con agua. Después de un minuto de lavado se continuó con la separación de los compuestos de interés en un sistema cromatográfico que utiliza columna Ultrasphere C18 (4.6x250mm) Beckman, con una fase móvil constituida por solución 0.01M de fosfato monobásico de sodio – acetonitrilo – metanol (85:7.5:7.5) pH 7, con detección a 272 nm.

Para validar el método se evaluaron los siguientes parámetros: función - respuesta, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad, recobro absoluto y estabilidad de las muestras de Hidroclorotiazida en orina.

4.3.1.1 Función respuesta. Para evaluar la función respuesta se analizaron curvas patrón de Hidroclorotiazida en orina durante cuatro días consecutivos. Los puntos de calibración fueron 1.000, 2.500, 10.00, 25.00, 50.00 y 100.0 µg/mL. Se procesaron 2 réplicas por concentración en cada uno de los experimentos.

Limpieza de la muestra. La hidroclorotiazida y el estándar interno quedan retenidos en el cartucho de lavado, mientras la fase móvil analítica pasa a través de la columna analítica.



Separación analítica. La fase móvil analítica pasa en contra flujo a través del cartucho de lavado para transferir la muestra a la columna analítica; mientras tanto, el eluyente de lavado es desechado.

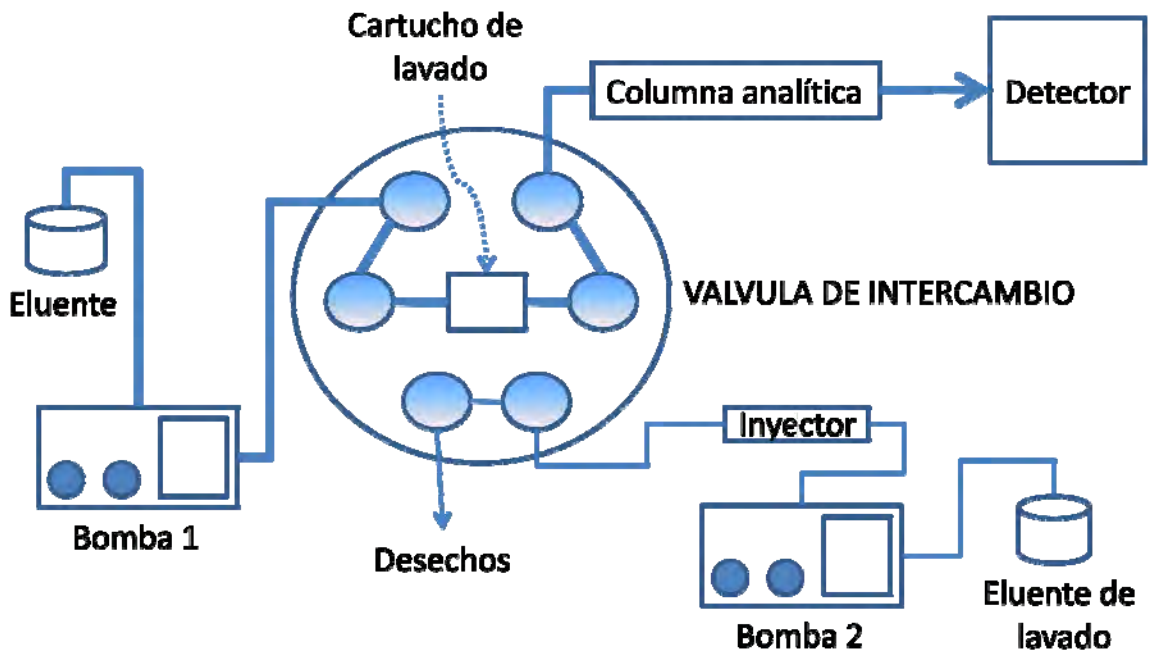


Figura 4. Esquema de la válvula de conmutación de columnas.

Con los resultados obtenidos se efectuó un análisis de regresión lineal calculando: la ordenada al origen (A), pendiente (B), coeficiente de determinación (r^2), error estándar de la pendiente y la calidad de ajuste para cada concentración. La calidad del ajuste se evaluó al comparar la concentración adicionada con la concentración interpolada de los puntos de curva patrón, y se expresó para cada concentración como porcentaje de desviación absoluta.

4.3.1.2. Exactitud. Para evaluar la exactitud se prepararon soluciones de orina adicionadas con Hidroclorotiazida a las concentraciones de 1, 3, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/mL}$, las cuales se procesaron por triplicado durante tres días. Se determinó su concentración por medio de la interpolación de la respuesta sobre la curva patrón. La concentración interpolada fue comparada con la concentración adicionada y se calculó la desviación absoluta.

4.3.1.3. Precisión. Se utilizaron los datos del estudio de exactitud. Para evaluar la precisión intra-día se analizaron las mismas muestras de exactitud por sextuplicado.

4.3.1.4. Límite de detección. Se evaluó por el análisis de soluciones diluidas de orina adicionada con Hidroclorotiazida. La cantidad mínima detectable se consideró a aquella que proporcionara una señal de 2 a 4 veces el nivel del ruido cromatográfico.

4.3.1.5. Límite de cuantificación. La cantidad mínima cuantificable se determinó con los datos de exactitud, precisión y de la función respuesta.

4.3.1.6. Selectividad. Se documentó la ausencia de interferencias causadas por los compuestos endógenos de la orina, el metabolito de la Hidroclorotiazida (4-amino-6-cloro-1,3-benceno disulfonamida), el conservador utilizado para preservar la orina (cloruro de benzalconio), los reactivos utilizados en el

procesamiento de muestras y algunos fármacos usados comúnmente. Ello se llevó a cabo mediante la inyección al sistema cromatográfico de las siguientes muestras: blanco de orina proveniente de 6 sujetos, blanco de reactivos, soluciones de ácido salicílico, 4-amino-6-cloro-1,3-benceno disulfonamida, cafeína, y cloruro de benzalconio al 0.01% llevando a cabo la detección al UV a 272 nm.

4.3.1.7. Recobro absoluto. El recobro absoluto se determinó al analizar seis niveles de concentración tanto en el disolvente de inyección como en muestras en orina a las concentraciones de 1, 2.5, 10, 25, 50 y 100 µg/mL. Cada muestra se analizó por quintuplicado. Para obtener el porcentaje de recobro se compararon las áreas de hidroclorotiazida de las muestras en orina, con respecto a la muestra correspondiente en el disolvente de inyección.

4.3.1.8. Estabilidad de la muestra procesada. Se evaluó inyectando las muestras al sistema cromatográfico durante un período de 48 horas. Para este propósito, se procesaron por triplicado soluciones de orina adicionadas con Hidroclorotiazida a concentraciones de 3.00, 40.0 y 80.0 µg/mL y se colocaron en el inyector automático bajo condiciones de laboratorio inyectándose a las 0, 24 y 48 horas de su procesamiento. Se determinó el promedio de áreas relativas, así como el coeficiente de variación.

4.3.1.9. Estabilidad de la muestra sobre la mesa de trabajo. La estabilidad de las muestras de Hidroclorotiazida a concentraciones de 3.00, 40.0 y 80.0 µg/mL en orina sobre la mesa de trabajo se realizó de la siguiente manera: se mantuvieron durante 6 horas a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo, se procesaron y se determinó su concentración por medio de la interpolación de la respuesta en una curva patrón preparada el día de análisis.

4.3.1.10. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación – descongelación. Se prepararon muestras de Hidroclorotiazida en orina a concentraciones de 3.00,

40.0 y 80.0 µg/mL, las cuales se almacenaron en un ultracongelador a temperatura de $-40^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante un período de 1.5 h. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente 1.5 h y se volvieron a introducir al ultracongelador por un período de 1.5 h. Se repitió el proceso dos veces más y al finalizar se procesaron las muestras de acuerdo con el método propuesto. Se calculó su concentración por medio de la interpolación de la respuesta en una curva patrón preparada el día de análisis.

4.3.1.11. Estabilidad de la muestra en refrigeración. Las muestras de orina adicionadas con hidroclorotiazida a concentraciones de 3.00, 40.0 y 80.0 µg/mL se mantuvieron durante 18 horas en refrigeración y se procesaron conjuntamente con una curva patrón preparada el día del análisis.

4.3.1.12. Estabilidad de la muestra a largo plazo almacenada a -40°C . Se prepararon muestras de Hidroclorotiazida en orina a concentración de 3.000, 40.00 y 80.00 µg/mL y se almacenaron a -40°C . Se descongelaron y analizaron por triplicado a los 0, 28, 59, 89, 121, 152 y 178 días.

4.3.2. Validación del método analítico para cuantificar hidroclorotiazida en plasma

Para cuantificar las muestras de plasmas se utilizó un sistema C.L.A.R. en fase reversa constituido por: una fase móvil preparada con solución 0.05M de fosfato monobásico – acetonitrilo (90:10) pH 3.0, una columna Symetry C18 de Waters (3.9 mm de diámetro interno x 15 cm de longitud) y detección al UV a 313 nm. La preparación de la muestra consistió en adicionar a 500 microlitros de plasma, 500 microlitros de solución diluida de borato de sodio (pH 9) y 100 microlitros de solución de tinidazol como estándar interno. La hidroclorotiazida se extrajo con acetato de etilo. Se separó la fase orgánica y se evaporó (45°C) bajo corriente de nitrógeno. La muestra se reconstituyó en la fase móvil y se inyectó al sistema cromatográfico.

La validación del método se llevó a cabo por la evaluación de los siguientes parámetros: función - respuesta, exactitud, precisión, límite de detección, límite de

cuantificación, selectividad, recobro absoluto y estabilidad de las muestras de hidroclorotiazida en plasma, así como efecto del anticoagulante.

4.3.2.1. Función respuesta. El intervalo de concentración evaluado fue de 10.00 a 600.0 ng/mL. La curva patrón se constituyó por 6 niveles de concentración y cada concentración se procesó por duplicado. La curva patrón se inyectó al inicio de la corrida analítica, inyectando la primera réplica de manera ascendente y la segunda réplica de manera descendente.

4.3.2.2. Exactitud. La exactitud se evaluó por el análisis, con el método bajo estudio, de soluciones de plasma adicionadas con Hidroclorotiazida a las concentraciones de 10.00, 30.00, 150.0, 250.0 y 500.0 ng/mL.

4.3.2.3. Precisión. Se evaluó usando los datos del estudio de exactitud para evaluar la precisión día a día, y para evaluar la precisión intra-día se analizaron las mismas muestras de exactitud por sextuplicado.

4.3.2.4. Límite de detección. El límite de detección se considero como aquella concentración a la cual se produce la respuesta de dos a cuatro veces el nivel de ruido cromatográfico.

4.3.2.5. Límite de cuantificación. Se determinó con los cálculos de la determinación de exactitud, precisión y de la función respuesta.

4.3.2.6. Selectividad. Se evaluó mediante la inyección al sistema cromatográfico de: plasma blanco proveniente de 6 sujetos, blanco de reactivos, soluciones de ácido salicílico, 4-amino-6-cloro-1,3-bencendisulfonamida, naproxén, cafeína y heparina llevando a cabo la detección al UV a 313 nm.

4.3.2.7. Recobro absoluto. Los recobros absolutos se midieron por la comparación del área de cada muestra de la matriz biológica adicionada con

Hidroclorotiazida a 10.00, 20.00, 50.00, 100.0, 300.0 y 600.0 ng/mL y el área de soluciones en fase móvil, a las mismas concentraciones.

4.3.2.8. Estabilidad de la muestra durante la inyección. Se evaluó por la inyección de las muestras dentro del sistema cromatográfico durante un período de 72 horas. Para este propósito, se procesaron por triplicado en cuatro series, soluciones de plasma adicionadas con Hidroclorotiazida a 30.00, 250.0 y 500.0 ng/mL y se colocaron en el inyector automático bajo condiciones de laboratorio inyectándose a las 0, 24, 48 y 72 horas de su procesamiento.

4.3.2.9. Estabilidad de la muestra sobre la mesa de trabajo. La estabilidad de las muestras de Hidroclorotiazida en plasma sobre la mesa de trabajo se realizó de la siguiente manera: las muestras plasmáticas adicionadas de Hidroclorotiazida a concentraciones de 30, 250 y 500 ng/mL, se mantuvieron durante 4 horas a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo y se determinó su concentración mediante la interpolación de la respuesta en una curva patrón preparada el día de análisis.

4.3.2.10. Estabilidad a ciclos de congelación - descongelación. Se prepararon muestras de Hidroclorotiazida en plasma a concentraciones de 30.00, 250.0 y 500.0 ng/mL, las cuales se almacenaron en un ultracongelador a temperatura de $-40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por un período de 1.5 h; posteriormente, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 1.5 horas y se volvieron a introducir al ultracongelador por un periodo de 1.5 horas. Se repitió el proceso dos veces más y al finalizar, se procesaron las muestras utilizando el método propuesto.

4.3.2.11. Estabilidad de la muestra a largo plazo almacenada a -40°C . Se prepararon muestras de Hidroclorotiazida en plasma a concentración de 30.00, 250.0 y 500.0 ng/mL y se almacenaron a -40°C . Se descongelaron y analizaron por triplicado a los 0, 34, 62, 94, 123, 152 y 182 días de su preparación. Se

calculó su concentración por medio de la interpolación de la repuesta sobre curvas patrón preparadas en cada día de análisis.

4.3.2.12. Efecto del anticoagulante en la cuantificación. Se prepararon muestras de Hidroclorotiazida en plasma heparinizado a concentraciones de 30.00, 250.0 y 500.0 ng/mL, las cuales se procesaron por triplicado y se cuantificaron contra una curva patrón en plasma con citrato – fosfato - dextrosa (CPD). Además, estas muestras se compararon contra muestras a las mismas concentraciones en plasma con CPD.

4.4. Estudio de bioequivalencia

4.4.1. Fase clínica. Estudio bioequivalencia

La parte clínica del estudio se realizó en las instalaciones de la Asociación Mexicana de Investigación Clínica, A. C., localizadas en el Hospital de la Secretaria de Salud, carretera México Pachuca, Pachuca, Hidalgo.

4.4.1.1. Selección de voluntarios. En el estudio de Bioequivalencia participaron 24 voluntarios adultos sanos de sexo masculino entre 18 y 45 años de edad, cuyos pesos corporales fueran proporcionales a su altura y talla, de acuerdo a las Tablas de relación altura/peso del *Metropolitan Life Statistical Bulletin*. Se efectuó exploración física y análisis clínicos cuidando que los resultados no difirieran más del 10% de los valores normales, electrocardiograma y placa torácica de rayos X.

4.4.1.2. Informe de consentimiento. De acuerdo al *Code Federal Regulation*, Titulo 21, parte 50: *Protection of Human Subjects*, los participantes firmaron una hoja de consentimiento. Los voluntarios fueron informados de la naturaleza y fines del

estudio, así como de los efectos secundarios del fármaco y las indicaciones a seguir durante la realización del estudio.

4.4.2. Diseño experimental del estudio de bioequivalencia

La asignación de los voluntarios se realizó al azar, de manera que los 24 voluntarios se dividieron en 4 grupos constituidos de 6 individuos cada grupo. La administración de los productos de prueba y referencia se realizó de acuerdo a un diseño cruzado al azar de 2 tratamientos, 2 períodos y 2 secuencias (2x2) (Tabla 4).

Tabla 4. Diseño experimental empleado en el estudio de bioequivalencia de Hidroclorotiazida 50 mg

Sujeto	Periodo 1	Periodo 2	Sujeto	Periodo 1	Periodo 2
1	A	B	13	B	A
2	B	A	14	B	A
3	B	A	15	B	A
4	A	B	16	A	B
5	B	A	17	B	A
6	A	B	18	B	A
7	A	B	19	A	B
8	B	A	20	A	B
9	A	B	21	B	A
10	B	A	22	A	B
11	A	B	23	B	A
12	A	B	24	A	B

Tratamiento A. Producto de prueba (Hidroclorotiazida 50 mg)
Tratamiento B. Producto innovador (Hydrodiuril 50 mg, Merck)

4.4.3. Protocolo experimental

Durante ambos períodos del estudio, los voluntarios se ajustaron al protocolo siguiente:

- a) A cada voluntario se administró una dosis de 50 mg de Hidroclorotiazida en forma de comprimido en ayunas, con 250 mL de agua y verificación visual, para asegurar la ingestión del comprimido.

- b) El primer alimento se administró 3 horas después de haber ingerido el medicamento; la comida 6 horas después y la cena 12 horas después de la administración del fármaco. Todas las comidas fueron ingeridas en un periodo de 20 a 25 minutos.
- c) Los voluntarios tomaron 120 mL de agua después de cada colección de muestra urinaria para asegurar la hidratación. Se determinaron el pH y volumen urinarios.
- d) Se obtuvieron 10 mL de sangre venosa mediante venopunción con catéter de tipo "Punzocat" número 18, acondicionado con una jeringa insulínica conteniendo heparina para mantener la permeabilidad del mismo. Se realizaron mediciones de la presión arterial a las 0 (predosis), 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 y 48 horas después de la administración.
- e) Se colectaron muestras de sangre a 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3.5, 5, 7, 10, 18, 30, 42 horas y el total de orina en los intervalos de tiempo -1-0, 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-6, 6-8, 8-12, 12-24, 24-36 y 36-48 horas.
- f) Se dejó un periodo de 10 días de "lavado" entre una administración y otra, con la finalidad de asegurar la completa eliminación de la primera dosis del fármaco.
- g) Las muestras sanguíneas se depositaron en tubos heparinizados con identificación de voluntario, hora de toma de muestra, fecha y una clave que al final del análisis se decodificó para conocer el tratamiento y tiempo correspondiente. Se separó el plasma por centrifugación de cada muestra, el cual se colocó en dos criotubos (aproximadamente 2 mL) y se almacenaron a -40°C hasta el momento de su análisis.
- h) De cada muestra de orina se tomaron alícuotas, se colocaron en dos criotubos con identificación de voluntario, hora de toma de muestra, fecha y una clave que al final del análisis se decodificó para conocer el tratamiento y el intervalo de tiempo correspondiente, y se almacenaron a -40°C hasta el momento de su análisis.

4.4.4. Análisis de las muestras

Un día antes de realizar el análisis de las muestras, se transportaron a un congelador con una temperatura de -12°C y posteriormente se dejaron descongelar en la mesa de trabajo, hasta alcanzar la temperatura ambiente para proceder a su análisis. Las muestras fueron cuantificadas utilizando los métodos descritos en la sección 4.3.

El análisis de las muestras se llevó a cabo de acuerdo a planes de trabajo previamente revisados y aprobados. Los planes de trabajo establecieron que en un día se deberían analizar las muestras de dos sujetos.

Una vez analizadas las muestras se determinaron los siguientes parámetros:

Datos urinarios	Datos plasmáticos
<ul style="list-style-type: none"> • Cantidad excretada en cada intervalo de muestreo • Cantidad excretada acumulada en cada intervalo de muestreo • Porcentaje recuperado • Velocidad de excreción en cada intervalo de muestreo • Máxima velocidad de excreción • Tiempo para alcanzar la máxima velocidad de excreción • Cantidad excretada acumulada total • Constante de eliminación • Tiempo de vida media de eliminación 	<ul style="list-style-type: none"> • Área bajo la curva de concentración plasmática - tiempo, hasta el último tiempo de muestreo • Área bajo la curva de concentración plasmática - tiempo, hasta infinito • Concentración máxima • Tiempo para alcanzar la concentración máxima • Constante de eliminación • Tiempo de vida media • Tiempo medio de residencia • Depuración (Cl/F)

4.4.5. Análisis estadístico de los datos

Se aplicó un análisis de estadística descriptiva en escala aritmética y logarítmica. Se aplicó un análisis de varianza al logaritmo de las concentraciones plasmáticas a cada intervalo de muestreo, área bajo la curva de concentración plasmática, concentración plasmática máxima, cantidad excretada acumulada y velocidad de excreción.

El modelo que se utilizó fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + Se_i + Su_{(i)j} + P_k + T_l + \varepsilon$$

en donde,

- Y_{ijkl} es el parámetro examinado,
- μ es el promedio del parámetro farmacocinético,
- Se_i es la i-ésima secuencia de administración del producto,
- $Su_{(i)j}$ es el j-ésimo sujeto asociado a la i-ésima secuencia,
- P_k es el k-ésimo período de administración,
- T_l es el l-ésimo producto (innovador o prueba)
- ε es el error experimental.

Los parámetros farmacocinéticos de los datos urinarios y plasmáticos fueron calculados con BIOPAK V2.0 y el análisis de la estadística bioequivalente se ejecutó con SAS V6.12

5. RESULTADOS

5.1. Control de calidad de los productos

En la Tabla 5 se presentan los resultados de las pruebas de control de calidad aplicadas al producto de prueba (A) y al producto innovador (B).

Tabla 5. Resultados de las pruebas de control de calidad.

Producto	Prueba	Límite	Dictamen
Prueba (A)	Uniformidad de contenido	85-115% ($CV \leq 6\%$)	Cumple
	Valoración	90-110%	100.6%, Cumple
	Prueba de disolución	No menos del 60% en 60 minutos	97.33%, Cumple
Innovador (B)	Uniformidad de contenido	85-115%	Cumple
	Valoración	90-110%	98.80%, Cumple
	Prueba de disolución	No menos del 60% en 60 minutos	98.63%, Cumple

5.2. Perfil de disolución

En la Tabla 6 y la Figura 5 se presentan los resultados de los perfiles de disolución.

Figura 5. Perfiles de disolución de Hidroclorotiazida
Promedio \pm error estándar del porcentaje disuelto vs tiempo

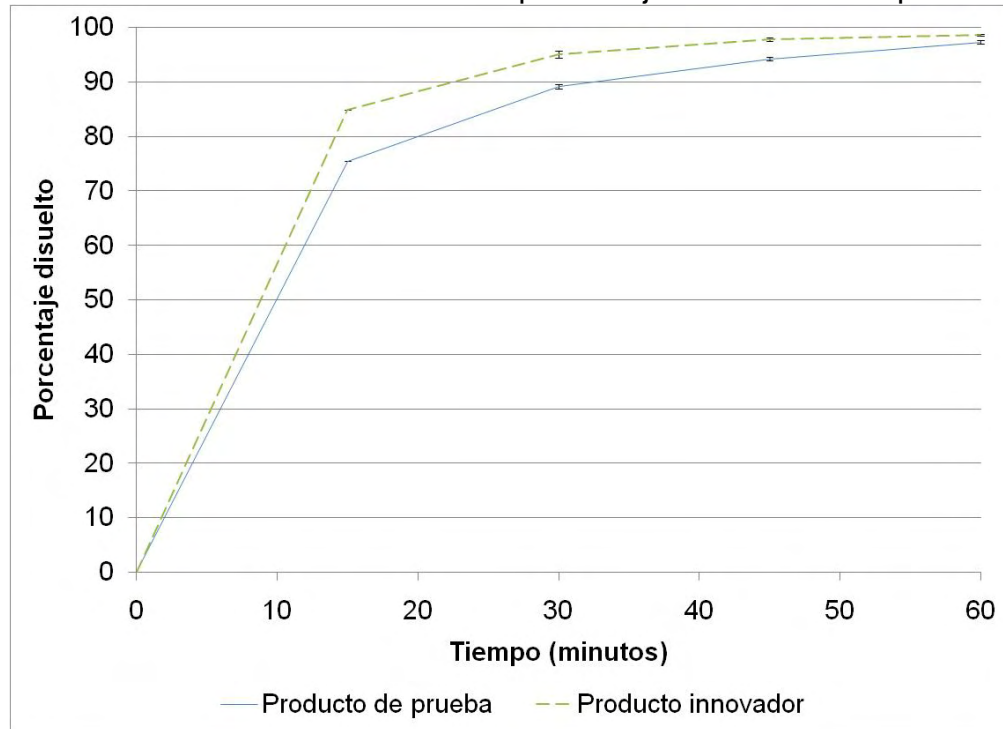


Tabla 6. Resultados del porcentaje disuelto en cada tiempo de muestreo por producto

Unidad de Prueba	Producto de prueba Tiempo (minutos)					Producto innovador Tiempo (minutos)				
	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
1	0.00	74.78	89.06	95.05	98.10	0.00	83.45	95.49	97.89	99.29
2	0.00	78.58	92.43	96.38	98.82	0.00	86.83	95.28	97.70	98.13
3	0.00	75.56	89.12	94.04	96.97	0.00	82.79	93.72	96.83	98.09
4	0.00	75.83	89.61	94.73	97.21	0.00	80.00	92.17	97.52	99.06
5	0.00	75.08	89.45	95.00	96.80	0.00	86.22	95.44	97.90	100.08
6	0.00	75.76	89.28	93.48	97.10	0.00	84.25	95.50	97.60	98.57
7	0.00	72.98	87.02	93.30	96.63	0.00	86.20	95.60	99.85	98.44
8	0.00	74.33	89.08	94.53	96.61	0.00	83.77	96.40	98.35	99.33
9	0.00	75.24	88.03	93.50	96.08	0.00	86.63	95.01	97.92	97.92
10	0.00	75.30	89.35	94.23	96.39	0.00	86.17	94.54	97.36	98.06
11	0.00	77.63	89.73	93.88	97.34	0.00	85.84	95.63	97.89	98.31
12	0.00	74.56	87.88	93.31	99.96	0.00	85.80	96.01	97.70	98.26
Promedio	0.00	75.47	89.17	94.29	<u>97.33</u>	0.00	84.83	95.07	97.88	<u>98.63</u>
Máximo	0.00	78.58	92.43	96.38	99.96	0.00	86.83	96.40	99.85	100.08
Mínimo	0.00	72.98	87.02	93.30	96.08	0.00	80.00	92.17	96.83	97.92
Error estándar	0.00	0.42	0.38	0.26	0.32	0.00	0.59	0.33	0.21	0.19
CV(%)	-	1.94	1.47	0.97	1.14	-	2.40	1.20	0.74	0.67

5.3. Estudio de bioequivalencia.

5.3.1. Resultados de la validación de los métodos bioanalíticos

En la Tabla 7, se muestran los resultados de la validación de los métodos para cuantificar la Hidroclorotiazida tanto en orina como en plasma. Y en las Figuras 6 y 7, se presentan muestras de los cromatogramas generados durante la cuantificación de hidroclorotiazida en orina y sangre, respectivamente.

Tabla 7. Resultados de la validación de los métodos analíticos para cuantificar Hidroclorotiazida.

Parámetro	Cuantificación en plasma	Cuantificación en orina
Función respuesta	$r^2 > 0.99$ CV(%): 0.2329% a 0.6891%	$r^2 > 0.99$ CV(%): 0.1548% a 0.9694%
Intervalo de trabajo	10 – 600 ng/mL	1 – 100 µg/mL
Precisión intradía (CV%)	De $\pm 1.71\%$ a $\pm 13.2\%*$	De $\pm 0.74\%$ a $\pm 6.44\%*$
Precisión interdía (CV%)	De $\pm 1.23\%$ a $\pm 11.02\%*$	De $\pm 1.53\%$ a $7.14\%*$
Exactitud (porcentaje de desviación absoluta)	0.96% - 14.8%	4.95% - 14.85%
Límite de detección	6 ng/mL	0.25 µg/mL
Límite de cuantificación	10 ng/mL	1 µg/mL
Selectividad	A 313 nm: 4-amino-6-cloro-1,3-benceno disulfonamida; cafeína; 6 lotes de plasma	A 272 nm: 4-amino-6-cloro-1,3-benceno disulfonamida; cloruro de benzalconio
Recobro absoluto	De 71.85% a 78.60%.	De 86.40% a 96.50%
Estabilidad de la muestra procesada	Hasta 72 h	Hasta 48 h
Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación / descongelación	3 ciclos (-40°C – T.A.)	3 ciclos (-40°C – T.A.)
Estabilidad a largo plazo (-40°C \pm 5°C)	182 días	178 días

*Determinado en la mínima cuantificable

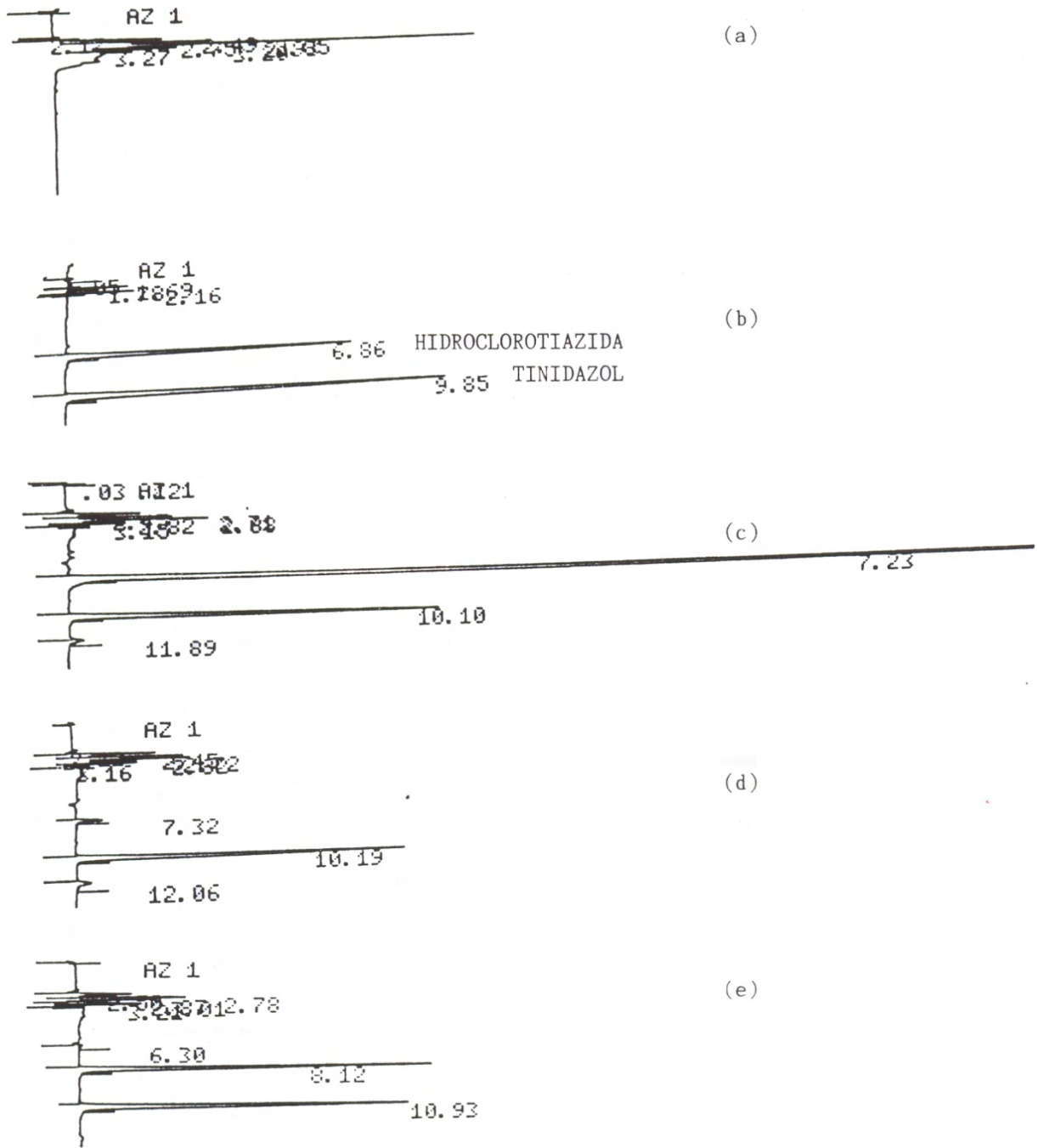


Figura 6. Cromatogramas de la cuantificación de hidroclorotiazida en orina: (a) Blanco, (b) Referencia, (c) Mínima cuantificable, (d) Máxima cuantificable, (e) Muestra.

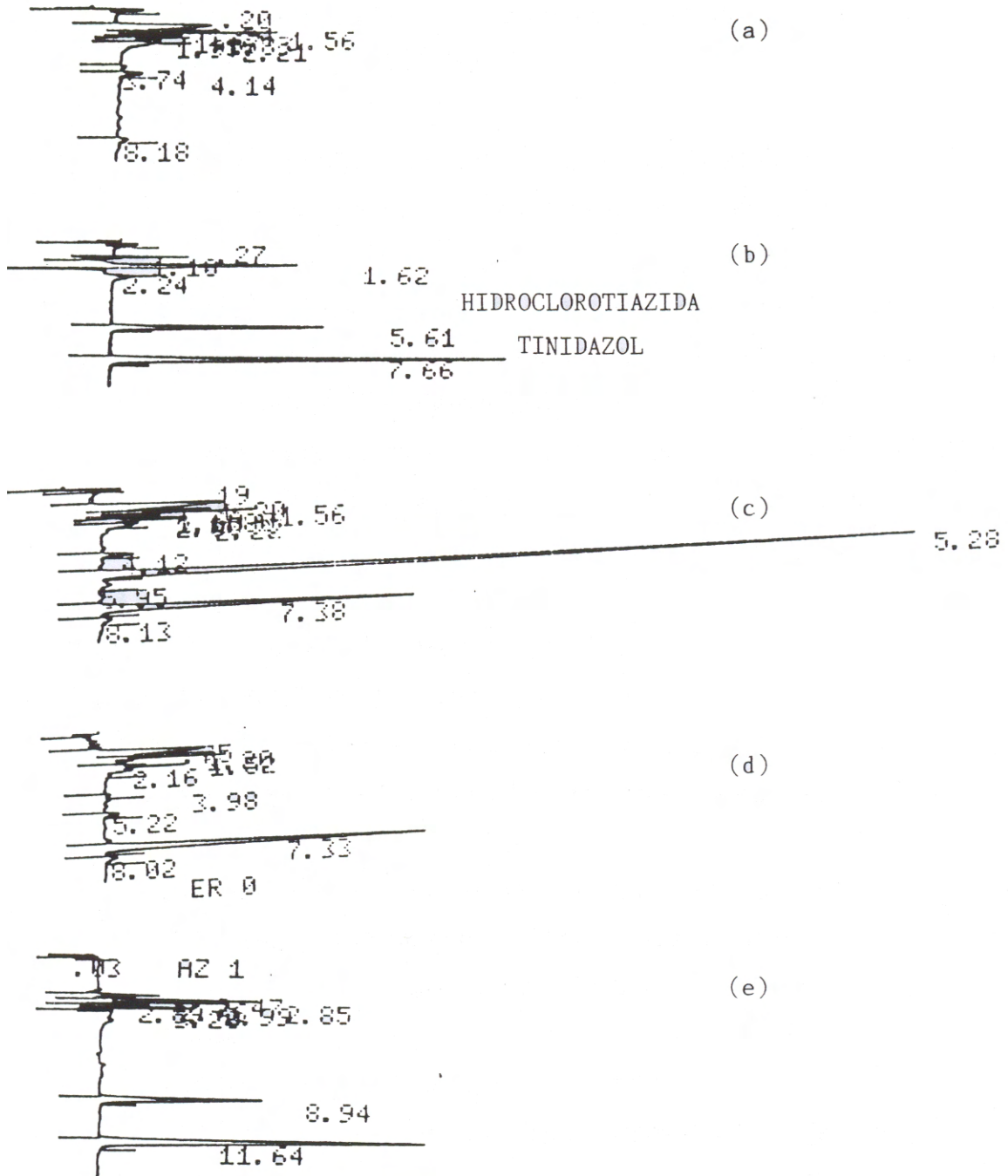


Figura 7. Cromatogramas de la cuantificación de hidroclorotiazida en plasma: (a) Blanco, (b) Referencia, (c) Mínima cuantificable, (d) Máxima cuantificable, (e) Muestra.

5.3.2. Datos urinarios

En las Tablas 8 y 9 así como en las Figuras 8 y 9, se presentan los resultados obtenidos al analizar las muestras de orina.

Tabla 8. Cantidad acumulada excretada de hidroclorotiazida en orina.

Intervalo de muestreo (h)	Cantidad excretada acumulada (μg)		Logaritmo natural de la cantidad excretada acumulada (μg)	
	Producto de prueba (A)	Producto innovador (B)	Producto de prueba (A)	Producto innovador (B)
	Media aritmética \pm desviación estándar (Mínimo – Máximo) Coeficiente de variación	Media aritmética \pm desviación estándar (Mínimo – Máximo) Coeficiente de variación	Media aritmética \pm desviación estándar (Mínimo – Máximo) Coeficiente de variación Media geométrica	Media aritmética \pm desviación estándar (Mínimo – Máximo) Coeficiente de variación Media geométrica
-1 a 0	0 \pm 0 (0 – 0) -	0 \pm 0 (0 – 0) -	- - -	- - -
0 a 1	423.97 \pm 540.70 (0 – 1790.71) 127.53	407.92 \pm 526.27 (0 – 1669.57) 129.01	307.07 \pm 4.06 - 1.32 -	480.99 \pm 2.77 - 0.58 -
1 a 2	3903.95 \pm 2811.04 (821.24 – 11030.67) 72.01	3836.78 \pm 2433.14 (626.93 – 9457.56) 63.42	3035.53 \pm 2.10 - 0.07 3035.53	3098.54 \pm 2.03 - 0.07 3098.54
2 a 3	8723.07 \pm 4262.55 (2512.02 – 17327.02) 48.87	9117.16 \pm 3238.37 (3783.86 – 16089.92) 35.52	7681.58 \pm 1.71 - 0.02 7681.06	8539.82 \pm 1.46 - 0.02 8539.82
3 a 4	12999.06 \pm 4231.76 (6344.80 – 20334.46) 32.55	13164 \pm 4289.11 (5112.44 – 20267.54) 32.58	12296.06 \pm 1.42 - 0.01 12296.06	12427.02 \pm 1.43 - 0.01 12427.02
4 a 6	17113.97 \pm 4563.53 (8509.92 – 25271.17) 26.67	17217.13 \pm 4552.11 (6576.41 – 24882.58) 26.44	16518.33 \pm 1.32 - 0.01 16518.33	16551.89 \pm 1.35 - 0.01 16551.89
6 a 8	20693.64 \pm 4842.86 (9252.20 – 28649.14) 23.40	19954.55 \pm 4944.48 (9373.91 – 28514.21) 24.78	20067.71 \pm 1.30 - 0.01 20067.71	19311.24 \pm 1.31 - 0.01 19311.24
8 a 12	23794.29 \pm 5233.79 (10392.05 – 32655.89) 22.00	22973.64 \pm 5414.07 (10697.81 – 32732.42) 23.57	23139.82 \pm 1.29 - 0.01 23139.82	22277.97 \pm 1.30 - 0.01 22277.97
12 a 24	27691.86 \pm 5464.79 (13669.41 – 36485.67) 19.73	26071.85 \pm 5689.74 (11997.96 – 35724.26) 21.82	27093.62 \pm 1.25 - 0.00 27093.62	25385.90 \pm 1.28 - 0.01 25385.90
24 a 36	29494.28 \pm 5547.21 (14675.11 – 38366.49) 18.81	28250.16 \pm 6047.44 (13305.18 – 38141.13) 21.41	28903.10 \pm 1.24 - 0.00 28903.10	27529.26 \pm 1.28 - 0.00 27529.26
36 a 48	30199.17 \pm 5736.60 (14675.11 – 39250.49) 19.00	28250.16 \pm 6191.89 (13705.04 – 38599.70) 21.48	29575.97 \pm 1.25 - 0.00 29575.97	28088.33 \pm 1.28 - 0.00 28088.33

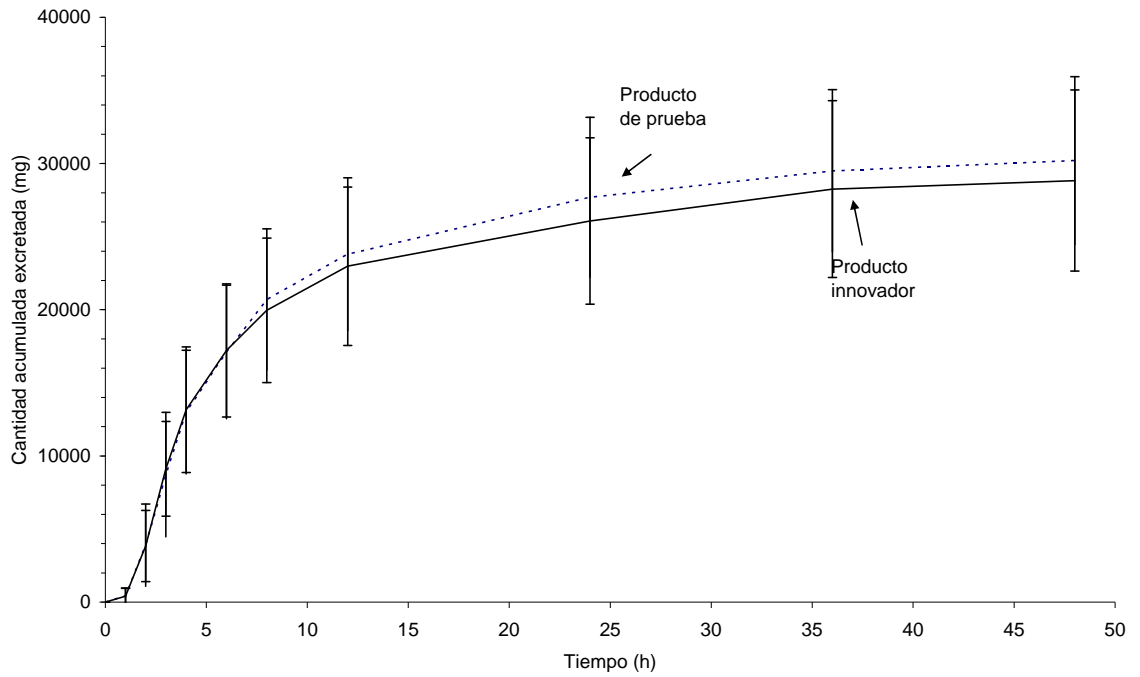


Figura 8. Cantidad acumulada excretada (promedio \pm error estándar) vs tiempo

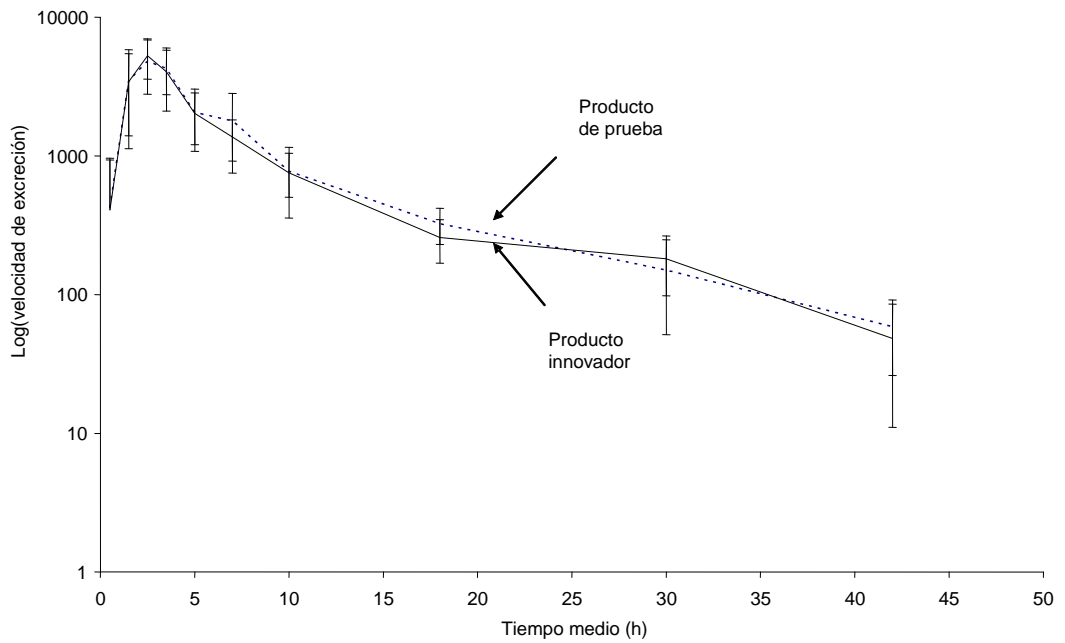


Figura 9. Logaritmo de la velocidad de excreción (promedio \pm error estándar) vs tiempo medio

Tabla 9. Valores de velocidad de excreción de Hidroclorotiazida a los diferentes tiempos de muestreo.

Intervalo de Muestreo (h)	Velocidad de excreción ($\mu\text{g/h}$)		Logaritmo natural de la velocidad de excreción ($\mu\text{g/h}$)	
	Producto de prueba (A)	Producto innovador (B)	Producto de prueba (A)	Producto innovador (B)
	Media aritmética \pm desviación estándar (Mínimo – Máximo) Coeficiente de variación	Media aritmética \pm desviación estándar (Mínimo – Máximo) Coeficiente de variación	Media aritmética \pm desviación estándar (Mínimo – Máximo) Coeficiente de variación Media geométrica	Media aritmética \pm desviación estándar (Mínimo – Máximo) Coeficiente de variación Media geométrica
-1 a 0	0 \pm 0 (0 - 0) -	0 \pm 0 (0 - 0) -	- - -	- - -
0 a 1	423.97 \pm 540.70 (0 – 1790.71) 127.53	407.92 \pm 526.27 (0 – 1669.57) 129.01	501.34 \pm 2.30 - 0.46 501.34	480.99 \pm 2.77 - 0.58 480.99
1 a 2	3479.98 \pm 2352.12 (791.42 – 9317.79) 67.59	3428.66 \pm 2030.87 (626.93 – 8796.60) 59.23	2763.01 \pm 2.05 - 0.07 2763.01	2859.61 \pm 1.91 - 0.07 2859.61
2 a 3	4819.12 \pm 2030.34 (1573.02 – 9337.88) 42.13	5280.38 \pm 1706.46 (2234.16 – 8284.08) 32.32	4372.32 \pm 1.60 - 0.04 4372.32	4997.24 \pm 1.42 - 0.03 4997.24
3 a 4	4275.99 \pm 1505.78 (1615.68 – 6975.90) 35.21	4047.04 \pm 1944.43 (1310.85 – 9099.35) 48.05	4013.68 \pm 1.45 - 0.04 4013.68	3633.70 \pm 1.62 - 0.04 3633.70
4 a 6	2057.46 \pm 977.57 (959.41 – 4862.70) 47.51	2026.47 \pm 819.55 (722.65 – 4026.10) 40.44	1874.46 \pm 1.54 - 0.08 1874.46	1865.86 \pm 1.54 - 0.08 1865.86
6 a 8	1789.83 \pm 1037.18 (371.14 – 3919.51) 57.95	1368.71 \pm 451.21 (595.36 – 2426.52) 32.97	1510.49 \pm 1.85 - 0.12 1510.49	1300.30 \pm 1.39 - 0.11 1300.30
8 a 12	775.16 \pm 271.40 (284.96 – 1259.43) 35.01	754.77 \pm 397.60 (187.12 – 2009.50) 52.68	725.22 \pm 1.48 - 0.20 725.22	663.39 \pm 1.70 - 0.26 663.39
12 a 24	324.80 \pm 94.30 (172.96 – 507.83) 29.03	258.18 \pm 89.52 (108.35 – 476.40) 34.67	311.72 \pm 1.34 - 0.43 311.72	243.39 \pm 1.43 - 0.59 243.39
24 a 36	150.20 \pm 98.73 (0-412.67) 65.73	181.53 \pm 83.27 (0 – 295.28) 45.87	166.83 \pm 1.49 - 0.89 166.83	187.01 \pm 1.43 - 0.77 187.01
36 a 48	58.74 \pm 32.60 (0 – 96.38) 55.49	48.32 \pm 37.28 (0 – 114.15) 77.14	73.20 \pm 1.19 - 1.62 73.20	64.43 \pm 1.42 - 2.21 64.43

En las Tablas 10, 11 y 12 se presentan los resultados obtenidos por sujeto y producto de los parámetros: cantidad excretada acumulada total (μg), porcentaje recuperado, máxima velocidad de excreción (mg/h), tiempo (h) para alcanzar la velocidad máxima, constante de velocidad de eliminación ($1/\text{h}$) y tiempo de vida media de eliminación (h).

Tabla 10. Cantidad excretada acumulada total (μg) y el porcentaje recuperado por sujeto y producto.

Sujeto	Secuencia	Producto de prueba		Producto innovador	
		Cantidad excretada acumulada (μg)	Porcentaje excretado	Cantidad excretada acumulada (μg)	Porcentaje excretado
1	1	39250.49	78.50	37335.27	74.67
2	2	32006.56	64.01	32989.82	65.98
3	2	35525.50	71.05	36994.66	73.99
4	1	21540.11	43.08	19110.23	38.22
5	2	30960.73	61.92	29401.24	58.80
6	1	26177.83	52.36	27049.98	54.10
7	1	20777.33	41.55	27360.04	54.72
8	2	31985.03	63.97	32075.55	64.15
9	1	35524.68	71.05	35811.11	71.62
10	2	33623.77	67.25	29442.53	58.89
11	1	26259.72	52.52	30699.27	61.40
12	1	34004.22	68.01	20464.29	40.93
13	2	30936.32	61.87	30088.59	60.18
14	2	33373.76	66.75	32431.25	64.86
15	2	36086.92	72.17	33641.56	67.28
16	1	37088.80	74.18	38599.70	77.20
17	2	32279.25	64.56	25499.85	51.00
18	2	27644.50	55.29	24345.40	48.69
19	1	31985.45	63.97	30512.93	61.03
20	1	24974.38	49.95	19576.05	39.15
21	2	14675.11	29.35	13705.04	27.41
22	1	26584.82	53.17	25746.99	51.49
23	2	31381.47	62.76	29198.32	58.40
24	1	30133.37	60.27	29841.77	59.68
Promedio		30199.17	60.40	28830.06	57.66
Desviación estándar		5736.60	11.47	6191.89	12.38
Mínimo		14675.11	29.35	13705.04	27.41
Máximo		39250.49	78.50	38599.70	77.20
Coefficiente de variación		19.00	19.00	21.48	21.48

Tabla 11. Velocidad máxima de excreción ($\mu\text{g/h}$) y tiempo (h) para alcanzar la velocidad máxima por sujeto y producto

Sujeto	Secuencia	Producto de prueba		Producto innovador	
		Velocidad máxima ($\mu\text{g/h}$)	Tiempo para alcanzar la velocidad máxima (h)	Velocidad máxima ($\mu\text{g/h}$)	Tiempo para alcanzar la velocidad máxima (h)
1	1	6818.17	2.5	9099.35	3.5
2	2	6974.90	3.5	8148.66	2.5
3	2	9317.79	1.5	8796.60	1.5
4	1	3498.12	3.5	3306.51	3.5
5	2	5711.40	3.5	5636.15	2.5
6	1	4398.96	3.5	6554.45	3.5
7	1	5377.32	1.5	7332.78	2.5
8	2	4161.98	5.0	3529.83	5.0
9	1	8543.04	1.5	7481.28	1.5
10	2	6335.51	1.5	5499.20	2.5
11	1	4531.73	1.5	6408.00	2.5
12	1	5645.64	1.5	3546.76	2.5
13	2	4242.86	3.5	4935.05	2.5
14	2	5410.76	3.5	4392.90	2.5
15	2	6563.28	3.5	6781.07	2.5
16	1	9337.88	2.5	8461.20	3.5
17	2	5653.02	2.5	4143.21	2.5
18	2	5045.04	2.5	4067.24	2.5
19	1	6182.39	2.5	5816.46	2.5
20	1	6229.25	2.5	4422.00	1.5
21	2	2457.95	3.5	2234.16	2.5
22	1	5841.59	2.5	6078.15	3.5
23	2	8405.76	2.5	6655.60	2.5
24	1	4390.75	2.5	8284.08	2.5
Promedio		5878.13	2.69	5900.45	2.69
Desviación estándar		1754.06	0.92	1932.95	0.76
Mínimo		2457.95	1.50	2234.16	1.50
Máximo		9337.88	5.00	9099.35	5.00
Coefficiente de variación		29.84	34.18	32.76	28.41

Tabla 12. Constante de velocidad de eliminación (1/h) y tiempo de vida media de eliminación (h).

Sujeto	Secuencia	Producto de prueba		Producto innovador	
		Constante de velocidad de eliminación (1/h)	Tiempo de vida media de eliminación (h)	Constante de velocidad de eliminación (1/h)	Tiempo de vida media de eliminación (h)
1	1	0.11	6.42	0.14	4.93
2	2	0.11	6.21	0.10	7.09
3	2	0.11	6.52	0.10	7.23
4	1	0.12	5.61	0.18	3.81
5	2	0.10	7.20	0.08	8.43
6	1	0.08	8.39	0.10	6.94
7	1	0.10	7.27	0.09	7.56
8	2	0.10	6.61	0.11	6.58
9	1	0.10	6.77	0.10	7.11
10	2	0.10	6.86	0.09	7.31
11	1	0.09	7.59	0.09	7.55
12	1	0.09	7.46	0.09	7.85
13	2	0.10	7.19	0.09	7.63
14	2	0.10	6.87	0.11	6.48
15	2	0.11	6.47	0.09	7.57
16	1	0.10	6.80	0.11	6.04
17	2	0.10	6.79	0.14	4.80
18	2	0.09	7.50	0.10	6.68
19	1	0.13	5.54	0.10	6.96
20	1	0.11	6.33	0.09	7.68
21	2	0.11	6.18	0.10	7.25
22	1	0.12	5.72	0.12	5.79
23	2	0.14	5.00	0.12	5.77
24	1	0.09	7.40	0.11	6.42
Promedio		0.10	6.70	0.11	6.73
Desviación estándar		0.01	0.76	0.02	1.09
Mínimo		0.08	5.00	0.08	3.81
Máximo		0.14	8.39	0.18	8.43
Coefficiente de variación		12.91	11.42	20.55	16.14

5.3.3. Datos plasmáticos

Los valores promedio de la concentración plasmática (ng/mL), a los diferentes tiempos de muestreo muestran en la Tabla 13 y en la Figura 10.

Tabla 13. Concentración plasmática (ng/mL) de hidroclorotiazida en cada tiempo de muestreo.

Tiempo (h)	Producto de prueba (A)	Producto Innovador (B)
	Media aritmética \pm desviación estándar (Mínimo – Máximo) Coeficiente de variación	Media aritmética \pm desviación estándar (Mínimo – Máximo) Coeficiente de variación
0	0 \pm 0 (0 - 0) -	0 \pm 0 (0 - 0) -
0.5	35.08 \pm 47.86 (0 - 173.07) 136.44	35.23 \pm 36.90 (0 - 118.25) 104.74
1.0	155.59 \pm 122.64 (23.18 - 432.75) 78.83	127.35 \pm 103.06 (11.01 - 351.77) 80.93
1.5	227.12 \pm 121.61 (43.18 - 436.58) 53.54	215.347 \pm 93.34 (96.73 - 427.46) 43.34
2.0	265.87 \pm 102.31 (83.98 - 460.31) 38.48	257.59 \pm 106.86 (93.61 - 457.00) 41.48
2.5	282.21 \pm 92.84 (105.45 - 554.75) 32.90	269.94 \pm 93.27 (15.36 - 435.30) 34.55
3.5	245.95 \pm 56.10 (376.43 - 153.83) 22.81	237.02 \pm 65.47 (385.47 - 85.40) 27.62
5.0	157.97 \pm 40.95 (233.08 - 95.74) 25.92	146.32 \pm 39.56 (223.75 - 57.73) 27.04
7.0	100.93 \pm 27.47 (158.70 - 60.34) 27.22	89.84 \pm 24.43 (126.85 - 35.04) 27.19
10.0	59.44 \pm 15.67 (35.31 - 96.19) 26.37	53.85 \pm 12.15 (24.21 - 75.93) 22.56
18.0	28.76 \pm 7.55 (52.36 - 17.69) 26.25	27.08 \pm 6.96 (40.61 - 12.75) 25.71
30.0	11.16 \pm 6.03 (26.20 - 0) 54.02	10.26 \pm 4.94 (16.52 - 0) 48.16
42.0	0.53 \pm 2.59 (12.67 - 0) 489.90	0 \pm 0 (0 - 0) -

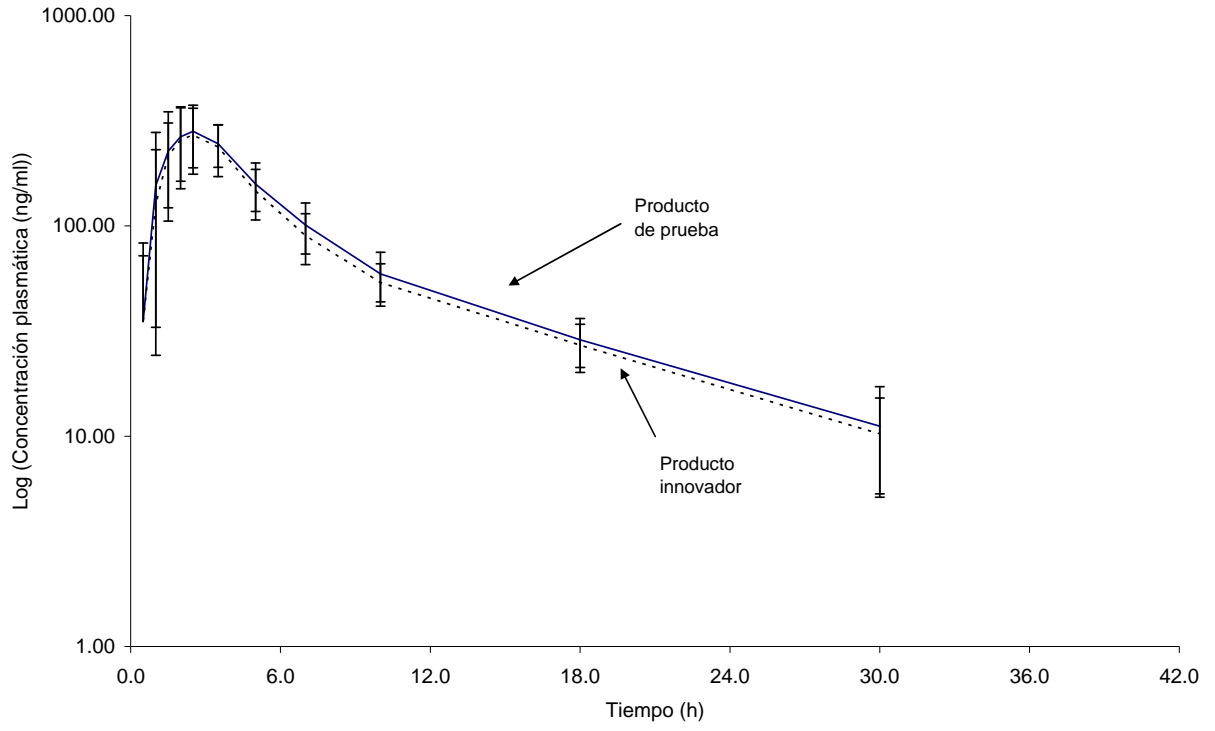


Figura 10. Logaritmo de la concentración plasmática (promedio \pm error estándar) vs tiempo

En la Tabla 14 se presentan los valores promedio de los parámetros farmacocinéticos obtenidos de los 24 sujetos del estudio, y en la Tabla 15, los valores de las áreas bajo la curva de concentración plasmática y concentración plasmática máxima en función logarítmica.

Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos de Hidroclorotiazida obtenidos con muestras plasmáticas.

Parámetro Farmacocinético	Producto de prueba (A)	Producto innovador (B)
	Media aritmética \pm desviación estándar (Mínimo – Máximo) Coeficiente de variación	Media aritmética \pm desviación estándar (Mínimo – Máximo) Coeficiente de variación
AUC ₀₋₃₀ (ng/mL.h)	2139.47 \pm 516.20 (1465.82 - 3721.58) 24.13	1986.11 \pm 471.93 (872.37 - 2744.46) 23.76
AUC _{0-inf} (ng/mL.h)	2239.32 \pm 524.56 (1510.94 - 3918.10) 23.42	2074.54 \pm 466.56 (954.96 - 2811.53) 22.49
C _{max} (ng/mL)	315.52 \pm 91.35 (191.92 - 554.75) 28.95	302.16 \pm 90.20 (167.88 - 457.01) 29.85
T _{max} (h)	2.52 \pm 0.89 (1.0 - 5.0) 35.32	2.33 \pm 0.78 (1.0 - 3.5) 30.72
Ke (1/h)	0.08 \pm 0.01 (0.05 - 0.10) 12.85	0.08 \pm 0.01 (0.06 - 0.11) 11.97
t _{1/2} (h)	8.90 \pm 1.31 (7.25 - 13.02) 14.73	8.86 \pm 1.02 (6.31 - 11.32) 11.52
MRT (h)	10.30 \pm 1.53 (7.77 - 14.22) 14.86	10.20 \pm 1.43 (7.29 - 13.25) 13.99

Tabla 15. Parámetros farmacocinéticos en función logarítmica obtenidos con muestras plasmáticas.

Parámetro Farmacocinético	Producto de prueba (A)	Producto innovador (B)
	Media aritmética \pm desviación estándar Coeficiente de variación Media geométrica	Media aritmética \pm desviación estándar Coeficiente de variación Media geométrica
Logaritmo natural de AUC ₀₋₃₀	7.64 \pm 0.22 2.93 2086.41	7.5626 \pm 0.27 3.54 1924.90
Logaritmo natural de AUC _{0-inf}	7.69 \pm 0.22 2.80 2187.68	7.6097 \pm 0.25 3.31 2017.59
Logaritmo natural de C _{max}	5.72 \pm 0.28 4.83 303.89	5.6682 \pm 0.30 5.28 289.50

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1. Estudios *in-vitro* de los productos

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se encontró que ambos productos cumplen con las especificaciones de uniformidad de contenido ya que se encuentran en los límites 85% a 115%. Así mismo, los resultados de la valoración del producto de prueba: 100.6% y del producto innovador: 98.80%, se encuentran dentro del intervalo 90% – 110%. La diferencia entre ambos resultados (1.8%) no rebasa el 5%, por lo que los productos cumplen con los criterios para llevar a cabo el estudio de bioequivalencia.

En la Tabla 6, se puede observar que el valor promedio del porcentaje disuelto a los 60 minutos fue $97.33\% \pm 0.32\%$ y $98.63\% \pm 0.19\%$ para el producto de prueba y el innovador, respectivamente.

Para determinar la semejanza de los perfiles de disolución de los productos examinados se utilizó la prueba del Factor de Similitud “**f2**” (*Federal Register 60(230) 61638-61643 (1995)*). El valor obtenido de 63.67, cumple con el criterio de aceptación: $50 < f2 < 100$; lo que indica que los perfiles de disolución de ambos productos son similares.

6.2. Validación de los métodos analíticos

6.2.1. Resultados de la validación del método para cuantificar hidroclorotiazida en orina

6.2.1.1. Función respuesta. La relación entre la concentración y la respuesta para las curvas patrón de Hidroclorotiazida en orina fue lineal en el intervalo de 1.000 a 100.0 µg/mL. El coeficiente de determinación (r^2) de las curvas fue mayor a 0.99 y el coeficiente de variación de las pendientes osciló entre 0.1548% y 0.9694% en los cuatro días en los que se llevó a cabo el análisis.

Al evaluar la calidad del ajuste comparando las concentraciones calculadas en la recta ajustada con la concentración adicionada, se encontró que la desviación promedio más alta fue de 9.04%, la cual corresponde a la concentración más baja del intervalo de trabajo.

Con base en estos resultados, se concluye que el método es lineal en el rango estudiado.

6.2.1.2. Exactitud. El porcentaje de desviación absoluta promedio para las muestras interpoladas y la concentración adicionada en el rango 1 – 80 µg/mL varió entre 4.95% y 14.85%.

6.2.1.3. Precisión. La precisión intradía osciló de $\pm 0.79\%$ a $\pm 6.44\%$. Mientras que el intervalo obtenido para la reproducibilidad del método (variación interdía) fue de $\pm 1.53\%$ a $\pm 7.14\%$.

6.2.1.4. Límite de detección. El límite de detección fue 0.2500 µg/mL.

6.2.1.5. Límite de cuantificación. El límite de cuantificación del método fue de 1.000 µg/mL, siendo esta la concentración que cumple con los criterios de exactitud y precisión requeridos.

6.2.1.6. Selectividad. La combinación de una técnica de extracción selectiva y detección ultravioleta a 272 nm, dieron como resultado determinaciones libres de interferencias de materiales endógenos en las áreas cromatográficas de Hidroclorotiazida y Tinidazol. Además no se observaron interferencias del metabolito reportado (4-amino-6-cloro-1,3-benceno disulfonamida), del ácido salicílico y del conservador adicionado a la orina, cloruro de benzalconio. La cafeína presenta un tiempo de retención muy semejante al del estándar interno.

6.2.1.7. Recobro absoluto. El porcentaje de recobro de Hidroclorotiazida en orina varió de 86.40% a 96.50% (promedio = 90.30%) y el recobro absoluto del estándar interno (Tinidazol), fue del 83.56%.

6.2.1.8. Estabilidad de la muestra durante la inyección. Los valores mostraron que en el intervalo de 48 horas, la relación de áreas presentó una variación máxima de 4.34% lo cual indica que la hidroclorotiazida es estable en solución durante 48 horas.

6.2.1.9. Estabilidad de la muestra sobre la mesa de trabajo. Los resultados mostraron que en un lapso de 6 horas, el promedio de las concentraciones cuantificadas no presentó un porcentaje de desviación absoluta mayor al 15% con respecto a la concentración adicionada.

6.2.1.10. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación – descongelación. Las muestras de Hidroclorotiazida en orina sometidas a tres ciclos de congelación - descongelación (-40°C - temperatura ambiente), al ser analizadas no presentaron diferencias mayores al $\pm 15\%$ respecto a su concentración adicionada. Los datos mostraron que en tres ciclos de congelación - descongelación, la concentración cuantificada presentó un porcentaje de desviación absoluta que varió entre 5.64 y 14.94% con respecto a la concentración adicionada.

6.2.1.11. Estabilidad de la muestra en refrigeración. Los datos mostraron que en las muestras almacenadas durante 18 horas en refrigeración, el promedio de la concentración cuantificada no se desvió más del $\pm 15\%$ respecto a la concentración adicionada.

6.2.1.12. Estabilidad de la muestra a largo plazo almacenada a -40°C. Al evaluar la estabilidad de las muestras de Hidroclorotiazida en orina, sometidas a condiciones de almacenamiento de $-40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, se encontró que las muestras fueron estables cuando menos durante 178 días.

6.2.2. Resultados de la validación del método para cuantificar hidroclorotiazida en plasma.

6.2.2.1. Función respuesta. La relación entre la concentración y la respuesta para las curvas patrón de Hidroclorotiazida en plasma fue lineal en el intervalo de 10.00 a 600.0 ng/mL. El coeficiente de determinación (r^2) de las curvas fue mayor a 0.99 y el coeficiente de variación de las pendientes varió de 0.2329% a 0.6891% durante los cuatro días evaluados.

La calidad del ajuste se evaluó comparando las concentraciones calculadas en la recta ajustada con la concentración adicionada, encontrándose que la desviación promedio más alta fue de 10.20%, la cual corresponde al nivel de concentración más bajo del intervalo de trabajo.

Con base en estos resultados, se concluye que el modelo lineal propuesto es adecuado para ser usado en la determinación de Hidroclorotiazida en plasma.

6.2.2.2. Exactitud. El porcentaje de desviación absoluta promedio para las muestras interpoladas y la concentración verdadera varió de 0.96 a 10.45% en el rango de 10-500 ng/mL.

Se calcularon los límites de confianza al 95% para cada concentración evaluada, utilizando la desviación absoluta de cada concentración determinada y su valor verdadero y el valor "t" de Student unilateral. Estos cálculos indicaron que la cuantificación de Hidroclorotiazida en plasma podría variar de 1.39% a 14.80% con respecto a su concentración adicionada en el rango de concentraciones estudiado.

6.2.2.3. Precisión. La precisión intradía osciló entre 1.71% a 13.12%. Mientras que la reproducibilidad del método (variación interdía) osciló en el intervalo de 1.23% a 11.02%.

6.2.2.4. Límite de detección. El límite de detección fue 6.0 ng/mL.

6.2.2.5. Límite de cuantificación. El límite de cuantificación del método fue de 10.00 ng/mL, siendo esta la concentración que cumple con los criterios de exactitud y precisión requeridos.

6.2.2.6. Selectividad. La combinación de una técnica de extracción selectiva y detección ultravioleta a 313 nm, dieron como resultado determinaciones libres de interferencias de materiales endógenos en las áreas cromatográficas de Hidroclorotiazida y Tinidazol. Además no se observaron interferencias del metabolito reportado 4-amino-6-cloro-1,3-benceno disulfonamida, ácido salicílico, naproxén, cafeína y del anticoagulante heparina.

6.2.2.7. Recobro absoluto. El porcentaje de recobro de Hidroclorotiazida en plasma varió entre 71.85% a 78.60% (promedio = 75.77 %), y el recobro absoluto del estándar interno Tinidazol, fue del 78.91%.

6.2.2.8. Estabilidad de la muestra durante la inyección. Los resultados mostraron que en el intervalo de 72 horas, la relación de alturas presenta una variación máxima de 4.70%. Las cartas de control de los datos de las alturas relativas contra el tiempo mostraron que las réplicas no varían más del $\pm 15\%$ de la respuesta original. No reportadas en este trabajo.

6.2.2.9. Estabilidad de la muestra sobre la mesa de trabajo. Los resultados mostraron que en un lapso de 4 horas la concentración cuantificada, en promedio no se desvió más del $\pm 15\%$ respecto a la concentración adicionada.

6.2.2.10. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación – descongelación. Las muestras de Hidroclorotiazida en plasma sometidas a tres ciclos de congelación - descongelación (-40°C -temperatura ambiente), no presentaron diferencias mayores del $\pm 15\%$ respecto a su concentración adicionada.

6.2.2.11. Estabilidad de la muestra a largo plazo almacenada a -40°C. Al evaluar la estabilidad de las muestras de Hidroclorotiazida en plasma sometidas a condiciones de almacenamiento de $-40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, se encontró que en las muestras son estables cuando menos durante 182 días.

6.2.2.12. Efecto del anticoagulante en la cuantificación de hidroclorotiazida en plasma. Las muestras de Hidroclorotiazida en plasma heparinizado presentaron en el peor de los casos un porcentaje de desviación absoluta 6.76% al ser interpoladas en una curva patrón en plasma con CPD (solución de citratos, fosfatos y dextrosa). En el caso de la concentración de las muestras en plasma heparinizado respecto a la concentración correspondiente en las muestras en plasma con CPD, en el peor de los casos la cuantificación presentó un error de -6.32%.

6.3. Estudio de bioequivalencia.

6.3.1. Análisis de los datos urinarios

En la Tabla 8 se puede observar que después de la administración de ambos productos, los valores promedio de la cantidad excretada acumulada en cada intervalo de tiempo, son semejantes.

Se encontró que la dispersión de los datos a los intervalos de muestreo de 0h a 1h y de 1h a 2h es alta. Los coeficientes de variación van desde 72.01% a 127.53% para el producto de prueba y para el producto innovador desde 63.42% a 129.01%, lo cual puede deberse a las diferencias interindividuales en la fase de absorción. Mientras que en los intervalos 8-12, 12-24, 24-36 y 36-48 horas, se presentan las diferencias más pequeñas con coeficientes de variación de 19.00% a 22.00% y 21.48% a 23.57%, para el producto de prueba e innovador, respectivamente.

En el anexo 2 se presentan las cantidades acumuladas excretadas a los intervalos muestreo, en donde se puede apreciar una tendencia homogénea en los valores, excepto en los sujetos 4, 7, 12, 20 y 21, en los que los valores de cantidad

excretada acumulada son bajos. En la Figura 11, se presentan los datos del voluntario 21.

Otro sujeto con variación importante fue el número 12, en la Figura 12 se presenta el perfil de la cantidad acumulada excretada a los diferentes tiempos de muestreo.

Figura 11. Cantidad acumulada excretada del sujeto 21 en cada tiempo de muestreo.

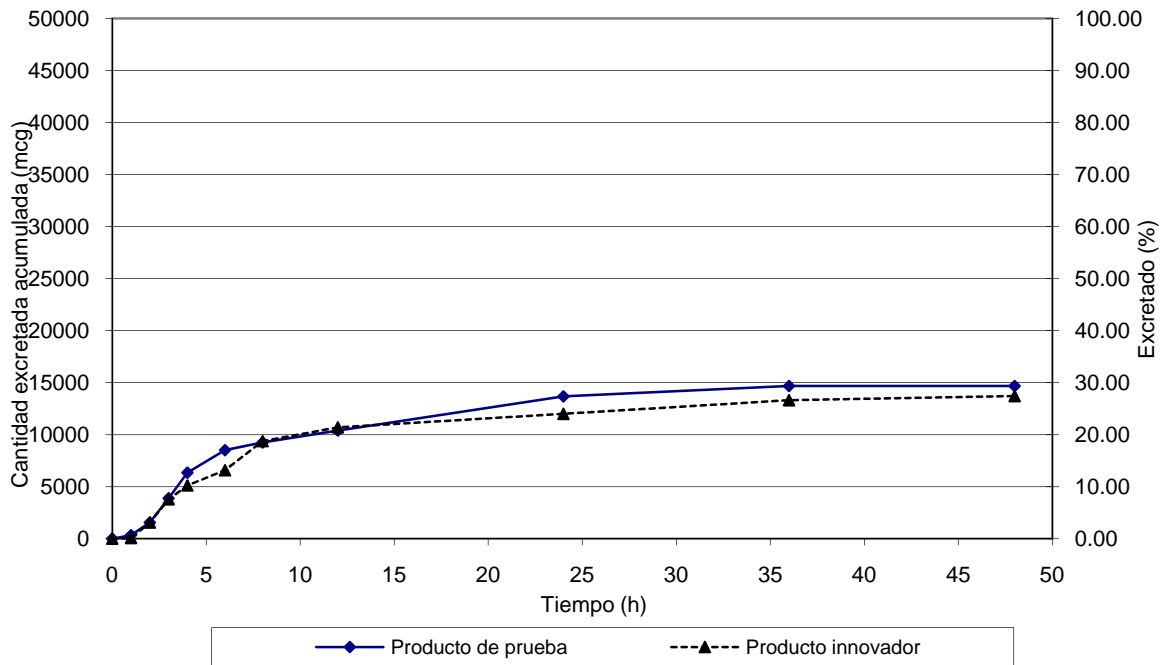
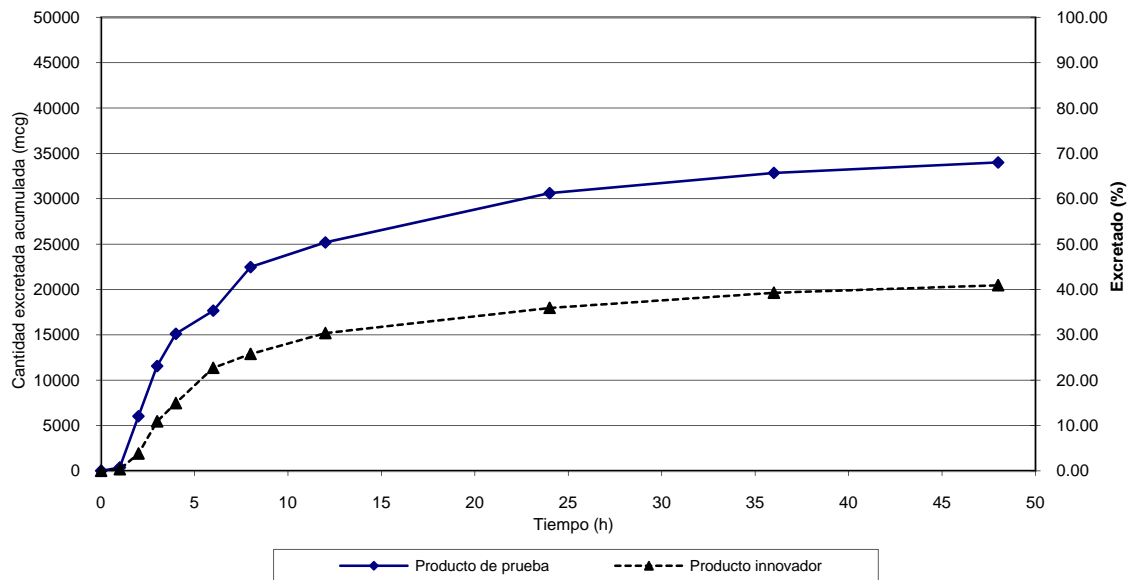


Figura 12. Cantidad acumulada excretada del sujeto 12 en cada tiempo de muestreo.



Al analizar los resultados de velocidad de excreción (Tabla 9) se encontró que los coeficientes de variación se incrementan en los últimos intervalos de muestreo, lo cual puede deberse a que en los dos últimos intervalos de muestreo, la velocidad de excreción es prácticamente nula en algunos sujetos y por eso se incrementa el valor del coeficiente de variación.

El análisis de varianza aplicado a los datos de la cantidad acumulada excretada conforme a la guía publicada por la *Food and Drug Administration* para hidroclorotiazida (Tabla 16), mostró que no existen efectos significativos por parte del Período, el Producto o la Secuencia, con excepción de un ligero efecto del Producto (Valor $p < 0.05$), en el intervalo de muestreo de 12 a 24 horas, por lo que no se dispone de suficiente evidencia para determinar si los productos son bioequivalentes, ya que se realizó una comparación puntual.

Tabla 16. Análisis de varianza de la cantidad excretada acumulada de hidroclorotiazida en orina por intervalo de muestreo usando sumatoria tipo III.

Intervalo de muestreo (h)	Período (Valor P)	Producto (Valor P)	Secuencia (Valor P)
-1 a 0	-	-	-
0 a 1	0.3917	0.7960	0.6641
1 a 2	0.1199	0.8965	0.6006
2 a 3	0.0857	0.2275	0.5332
3 a 4	0.7747	0.8571	0.6063
4 a 6	0.8885	0.9636	0.9952
6 a 8	0.5365	0.3059	0.7907
8 a 12	0.3108	0.2748	0.8155
12 a 24	0.6843	0.0454*	0.7435
24 a 36	0.6073	0.1294	0.7707
36 a 48	0.7414	0.1026	0.7245

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.1$)

Tabla 17. Análisis de varianza de la velocidad de excreción de hidroclorotiazida en orina por intervalo de muestreo usando sumatoria tipo III.

Intervalo de muestreo (h)	Período (Valor P)	Producto (Valor P)	Secuencia (Valor P)
-1 a 0	-	-	-
0 a 1	0.3917	0.7960	0.6641
1 a 2	0.0678	0.8201	0.6601
2 a 3	0.1383	0.1739	0.1474
3 a 4	0.0187*	0.2769	0.8961
4 a 6	0.7049	0.9575	0.2230
6 a 8	0.3639	0.2775	0.6950
8 a 12	0.1289	0.4647	0.8584
12 a 24	0.1071	0.0068**	0.3558
24 a 36	0.6463	0.5944	0.3781
36 a 48	0.6898	0.5078	0.4000

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.1$)

** Diferencia estadísticamente muy significativa ($p < 0.01$)

Al efectuar el análisis de varianza a los valores de velocidad de excreción (Tabla 17), se encontró que no existen efectos importantes de Período, Producto o Secuencia, sólo se detectó un ligero efecto del Período (Valor $p < 0.05$), en el intervalo de muestreo 3-4 horas, y un efecto del Producto (Valor $p < 0.01$) en el intervalo de 12-24 horas, lo cual nuevamente no nos da suficiente evidencia para determinar que los productos sean bioinequivalentes.

Los valores promedio registrados del porcentaje total excretado en orina (Tabla 10), para el producto de prueba: 60.40% y para el producto innovador: 57.66%; son similares a aquellos reportados en la literatura,^{20,25,27,33} de hecho son ligeramente mayores a los valores de 54.76% y 55.3% reportados en México en el estudio de M. Morales³³ con muestras de orina.

Al evaluar estadísticamente los resultados (Tabla 19), no se encontraron efectos de Período, Producto o Secuencia. Las diferencias detectadas de las medias de cada producto calculadas por mínimos cuadrados, 0.0516 ± 0.0297 y 0.0100 ± 0.0535 , son despreciables. Los intervalos de confianza calculados al 90% para ambos parámetros se encuentran dentro de los límites 80 – 125. Los resultados de la prueba de Schürman, 0.0001 y 0.0020 indican que la probabilidad de que se detecten valores menores al 80% o mayores al 125%, es despreciable porque el valor de probabilidad es menor a 0.05.

Los valores de probabilidad calculados para el poder del análisis de varianza, 1.000 y 0.9768, son mayores a 0.8, lo cual sustenta los resultados encontrados durante el análisis de varianza.

Tabla 18. Estadística de biodisponibilidad de la cantidad acumulada excretada total y máxima velocidad de excreción de hidroclorotiazida en la orina

Prueba	Cantidad excretada acumulada total	Máxima velocidad de excreción
Valor de probabilidad del efecto del Período (Sumatoria III)	1.0000	1.0000
Valor de probabilidad del efecto del Producto (Sumatoria III)	0.0958	0.8539
Valor de probabilidad del efecto de la Secuencia (Sumatoria III)	1.0000	1.0000
Diferencia de las medias por mínimos cuadrados \pm error estándar	0.0516 \pm 0.0297	0.0100 \pm 0.0535
Intervalo clásico (90%)	100.0674, 110.7983	92.1568, 110.6930
Valor de probabilidad de la Prueba de Schuirmann	0.0001	0.0020
Valor de probabilidad del poder del análisis de varianza	1.0000	0.9768

6.3.2. Análisis de los datos plasmáticos

Al analizar los resultados reportados en la Tabla 13 y en la Figura 10, se encontró que los perfiles son semejantes. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzaron en promedio a las 2.5 horas.

En el anexo 3 se presentan las concentraciones de hidroclorotiazida en plasma, en el que se puede observar que en todos los sujetos, la hidroclorotiazida pudo ser cuantificada hasta las 18 horas; sin embargo, a las 30 horas las concentraciones de hidroclorotiazida en los sujetos 5, 7, 21 y 23 fueron menores a 10ng/ml el producto de prueba, y en los sujetos 19, 20, 21 y 23 con el producto innovador. El sujeto 12, fue el único en el que pudo detectarse una concentración mayor al límite de cuantificación (12.668 ng/ml) a las 42 horas.

En la Tabla 19 se presentan los resultados del análisis de varianza de la concentración plasmática a cada tiempo. En ningún caso se registró efecto significativo de Período, Producto o Secuencia, con excepción de un ligero efecto de Producto a las 7.0 y 10 horas.

Tabla 19. Análisis de varianza de la concentración de hidroclorotiazida en plasma por intervalo de muestreo usando sumatoria tipo III.

Intervalo de muestreo (h)	Período (Valor P)	Producto (Valor P)	Secuencia (Valor P)
0.5	0.7648	0.9872	0.7258
1.0	0.5401	0.2091	0.7783
1.5	0.7566	0.6101	0.6919
2.0	0.1659	0.4829	0.9892
2.5	0.3748	0.5113	0.9480
3.5	0.5408	0.5620	0.5813
5.0	0.4310	0.0988	0.4764
7.0	0.0971	0.0110*	0.5059
10.0	0.7514	0.0184*	0.7957
18.0	0.6837	0.2160	0.9640
30.0	0.2602	0.4406	0.3418
42.0	0.3282	0.3282	0.3282

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.1$)

El promedio del área bajo la curva de concentración plasmática desde el tiempo 0 a 30 horas para el producto de prueba fue 2139.47 ng/ml.h \pm 516.2029 ng/ml.h y el del innovador 1986.11 ng/ml.h \pm 471.9302 ng/ml.h (ver Tabla 14); estos valores son semejantes a los que reporta Patel²⁰ (1968 ng/ml.h \pm 390 ng/ml.h).

Los resultados promedio del área bajo la curva de concentración plasmática desde el tiempo 0 a infinito fueron: 2239.32 ng/ml.h \pm 524.5593 ng/ml.h para el producto de prueba y para el producto innovador 2074.54 ng/ml.h \pm 466.5615 ng/ml.h (Tabla 14).

Las concentraciones máximas 315.52 ng/ml \pm 91.3518 ng/ml y 302.16 ng/ml \pm 90.1987 ng/ml, para el producto de prueba y el producto innovador, respectivamente, son similares a los reportados en la literatura (280 ng/ml \pm 108 ng/ml Patel²⁰, 310 ng/ml \pm 130 ng/ml Barbahaiya²³, 297.83 ng/ml \pm 25.58 ng/ml Sabanthan²⁴); así mismo son

congruentes con lo reportado por los mismos autores en relación al tiempo para alcanzar la concentración máxima (1 a 5 h). (ver Tabla 14)

La constante de velocidad de eliminación para el producto de prueba fue $0.0793 \text{ h}^{-1} \pm 0.0102 \text{ h}^{-1}$ y para el producto innovador se estimó en $0.0792 \text{ h}^{-1} \pm 0.0095 \text{ h}^{-1}$. Los tiempos de vida media $8.8965 \text{ h} \pm 1.3105 \text{ h}$ (producto de prueba) y $8.8616 \text{ h} \pm 1.0212 \text{ h}$ (producto innovador).

El tiempo medio de residencia que se estimó para el producto de prueba fue $10.2994 \text{ h} \pm 1.5305 \text{ h}$ y para el producto innovador $10.2003 \text{ h} \pm 1.4268 \text{ h}$.

Al calcular la depuración a partir de los datos de la cantidad acumulada excretada y el área bajo la curva de concentración plasmática, los valores promedio encontrados de la depuración total para el producto de prueba fue 240.63 ml/minuto y para el producto innovador fue 244.96 ml/minuto , estos valores son similares a los reportados por Patel²⁰.

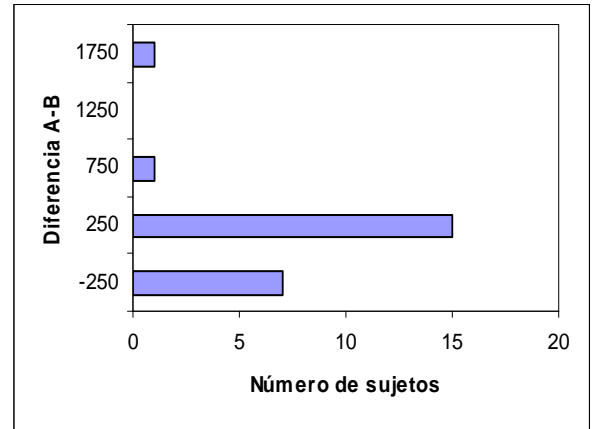
En la Tabla 20, se presentan los resultados del análisis estadístico. No se detectó ningún efecto significativo de Periodo, Producto o Secuencia, los valores de probabilidad fueron mayores a 0.05. Los intervalos de confianza calculados se encontraron dentro de los límites de 80% a 125%. Los resultados de la prueba de Schürman (0.0127, 0.0094 y 0.0144) fueron menores al valor de probabilidad 0.05, y los valores de probabilidad del poder del análisis de varianza fueron mayores a 0.8.

Tabla 20. Estadística de biodisponibilidad de las áreas bajo la curva concentración plasmática - tiempo y de la concentración plasmática máxima.

Prueba	Area bajo la curva de concentración desde 0 a 30h	Area bajo la curva de concentración desde 0 a infinito	Máxima concentración plasmática
Valor de probabilidad del efecto del Período (Sumatoria III)	0.0708	0.0551	0.4053
Valor de probabilidad del efecto del Producto (Sumatoria III)	0.8076	0.7841	0.4615
Valor de probabilidad del efecto de la Secuencia (Sumatoria III)	0.7121	0.7812	0.9988
Diferencia de las medias por mínimos cuadrados \pm error estándar	0.0806 \pm 0.0424	0.0809 \pm 0.0400	0.0485 \pm 0.571
Intervalo clásico (90%)	100.7713 – 116.5886	101.2392 – 116.1321	95.1557- 115.7922
Valor de probabilidad de la Prueba de Schürmann	0.0127	0.0094	0.0144
Valor de probabilidad del poder del análisis de varianza	0.9978	0.9990	0.9596

En las Figuras 13, 14 y 15, se presentan los histogramas de la diferencia (A-B) y el cociente ($\log(A/B)$) de las áreas bajo la curva de concentración plasmática y concentración plasmática máxima, en la cual se observa que en todos los casos los datos presentan una distribución normal con un ligero sesgo hacia valores mayores a la media.

AUC 0-30 A-B	Frecuencia	Frecuencia acumulada	Porcentaje	Porcentaje acumulado
-250	7	7	29.17%	29.17%
250	15	22	62.50%	91.67%
750	1	23	4.17%	95.83%
1250	0	23	0.00%	95.83%
1750	1	24	4.17%	100.00%



AUC 0-30 Log(A/B)	Frecuencia	Frecuencia acumulada	Porcentaje	Porcentaje acumulado
-0.2	2	2	8.33%	8.33%
0.0	16	18	66.67%	75.00%
0.2	3	21	12.50%	87.50%
0.4	1	22	4.17%	91.67%
0.6	1	23	4.17%	95.83%
0.8	1	24	4.17%	100.00%

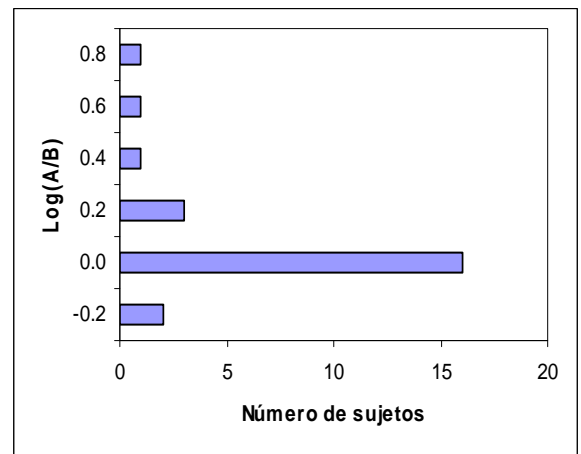
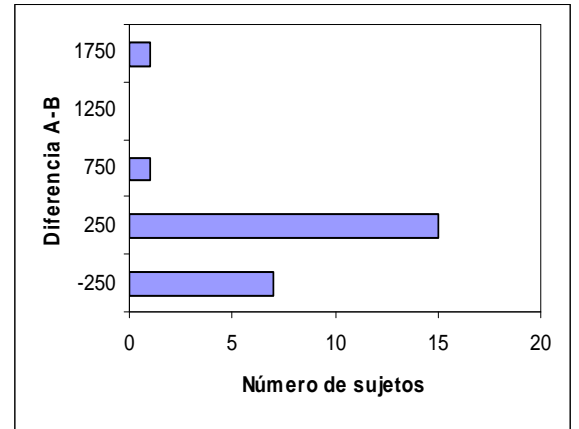


Figura 13. Histogramas de A-B y Log(A/B) para $AUC_{(0-30)}$

AUC 0-inf A-B	Frecuencia	Frecuencia acumulada	Porcentaje	Porcentaje acumulado
-250	7	7	29.17%	29.17%
250	15	22	62.50%	91.67%
750	1	23	4.17%	95.83%
1250	0	23	0.00%	95.83%
1750	1	24	4.17%	100.00%



AUC 0-inf Log(A/B)	Frecuencia	Frecuencia acumulada	Porcentaje	Porcentaje acumulado
-250	7	7	29.17%	29.17%
250	15	22	62.50%	91.67%
750	1	23	4.17%	95.83%
1250	0	23	0.00%	95.83%
1750	1	24	4.17%	100.00%

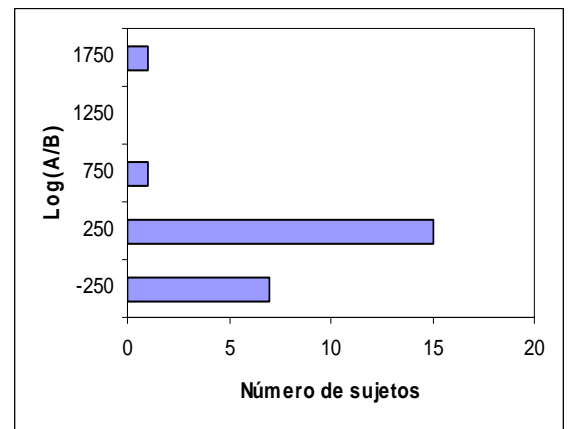
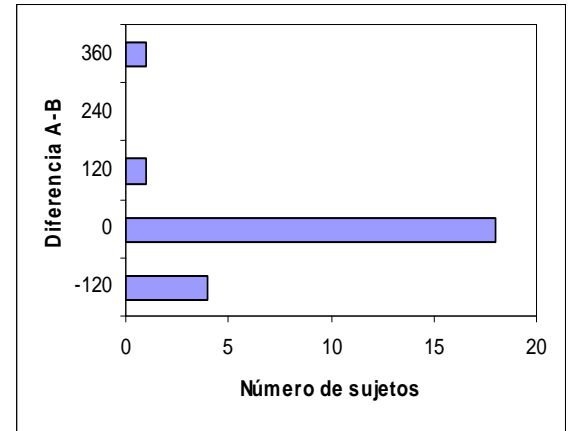


Figura 14. Histogramas de A-B y Log(A/B) para $AUC_{(0-\infty)}$

Cmax A-B	Frecuencia	Frecuencia acumulada	Porcentaje	Porcentaje acumulado
-120	4	4	16.67%	16.67%
0	18	22	75.00%	91.67%
120	1	23	4.17%	95.83%
240	0	23	0.00%	95.83%
360	1	24	4.17%	100.00%



Cmax Log(A/B)	Frecuencia	Frecuencia acumulada	Porcentaje	Porcentaje acumulado
-0.45	1	1	4.17%	4.17%
-0.15	8	9	33.33%	37.50%
0.15	13	22	54.17%	91.67%
0.45	1	23	4.17%	95.83%
0.75	0	23	0.00%	95.83%
1.05	1	24	4.17%	100.00%

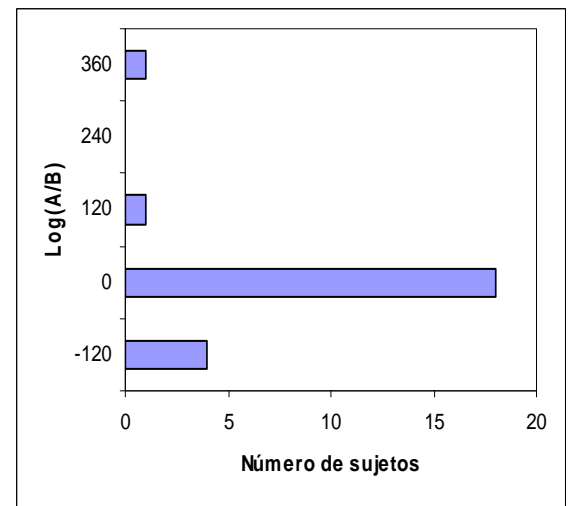


Figura 15. Histogramas de A-B y Log(A/B) para C_{max}

7. COMPARACIÓN DE RESULTADOS URINARIOS vs PLASMÁTICOS

En las Figuras 16 y 17 se presentan las gráficas de la concentración de hidroclorotiazida en plasma con respecto a la velocidad de excreción en la que se observa semejanza en los perfiles en ambos fluidos

Con respecto a las áreas bajo la curva de concentración plasmática y las cantidades acumuladas excretadas, en las Figuras 18 y 19 se presentan las curvas generadas al relacionar estos parámetros. A partir de los datos de estos gráficos se estimó la depuración renal de los productos; para el producto de prueba fue de 226mL/min y para el producto innovador fue de 229 mL/min. El coeficiente de correlación calculado para el producto de prueba fue 0.9924 y para el producto innovador fue de 0.9892.

Se puede considerar que las cinéticas que se presentan en la orina son un reflejo del proceso que se da en el plasma y de manera similar en el plasma se puede distinguir de manera aproximada el proceso urinario.

En la Figura 20 se presentan los valores promedio de la depuración de los productos en función del tiempo. Aun cuando se registró una ligera variabilidad en los resultados, el comportamiento de ambos productos fue semejante. De manera análoga, se compararon los valores promedio del cambio de pH con respecto al tiempo (ver Figura 21); se observa que ambos productos siguen un patrón equiparable.

Al comparar los valores de la depuración total y el pH urinario con respecto al tiempo (Figura 22 y 23) se encontró un ligero aumento en el pH durante las primeras cuatro horas de la administración de los productos, ello confirma el efecto antiácido de la Hidroclorotiazida.

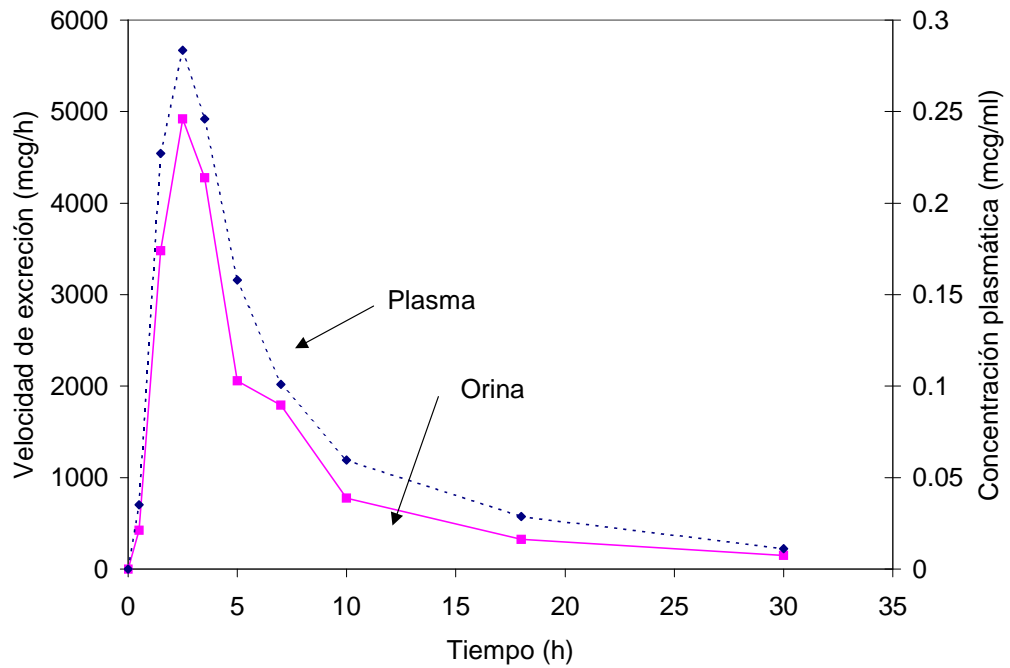


Figura 16. Valores promedio de la concentración plasmática y velocidad de excreción con respecto al tiempo del producto de prueba.

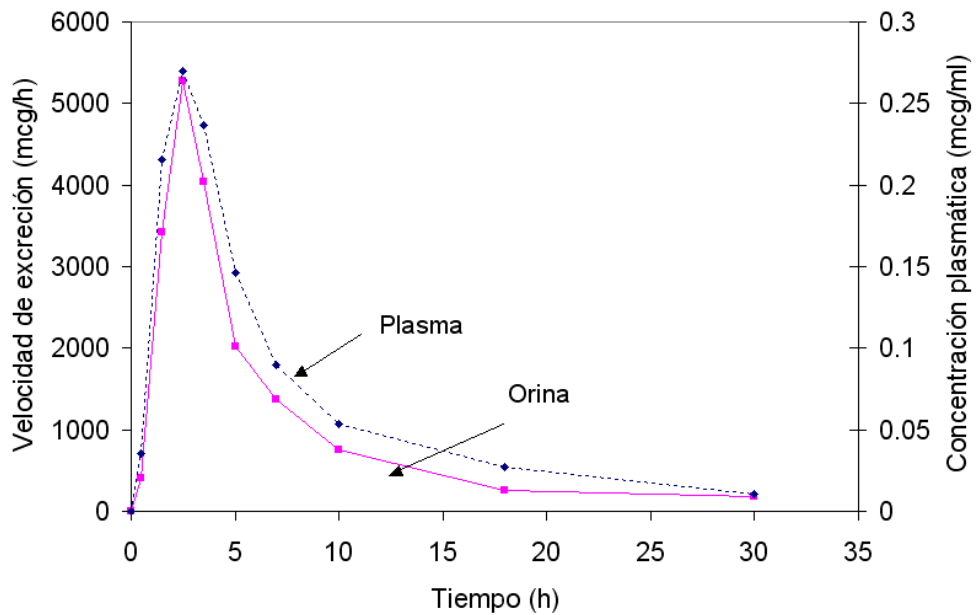


Figura 17. Valores promedio de la concentración plasmática y la velocidad de excreción con respecto al tiempo del producto innovador.

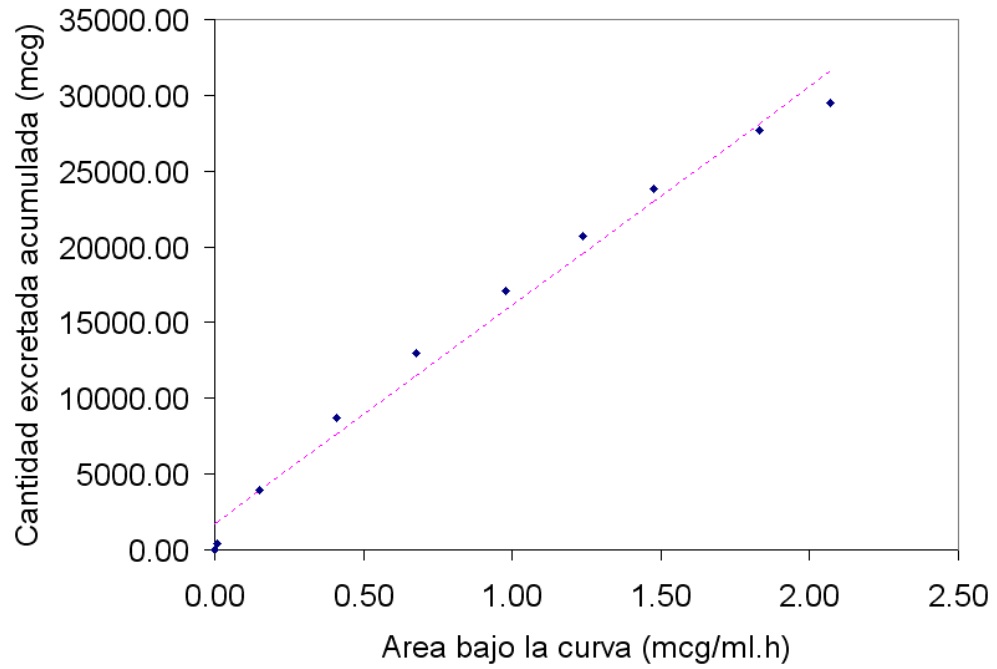


Figura 18. Relación lineal entre el área bajo la curva de concentración plasmática y la cantidad excretada acumulada del producto de prueba.

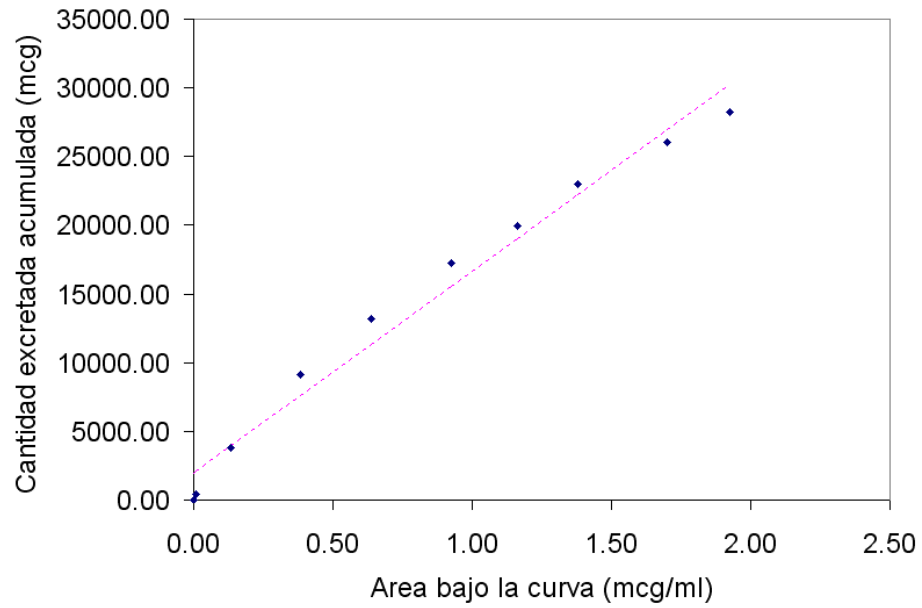


Figura 19. Relación lineal entre el área bajo la curva de concentración plasmática y la cantidad excretada acumulada del producto innovador.

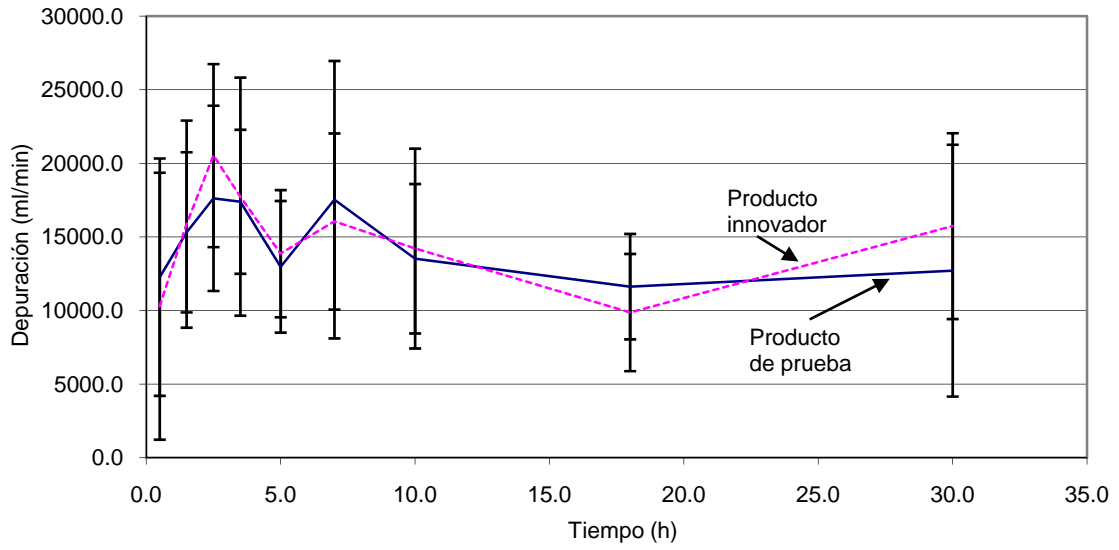


Figura 20. Valores promedio de la depuración \pm desviación estándar con respecto al tiempo.

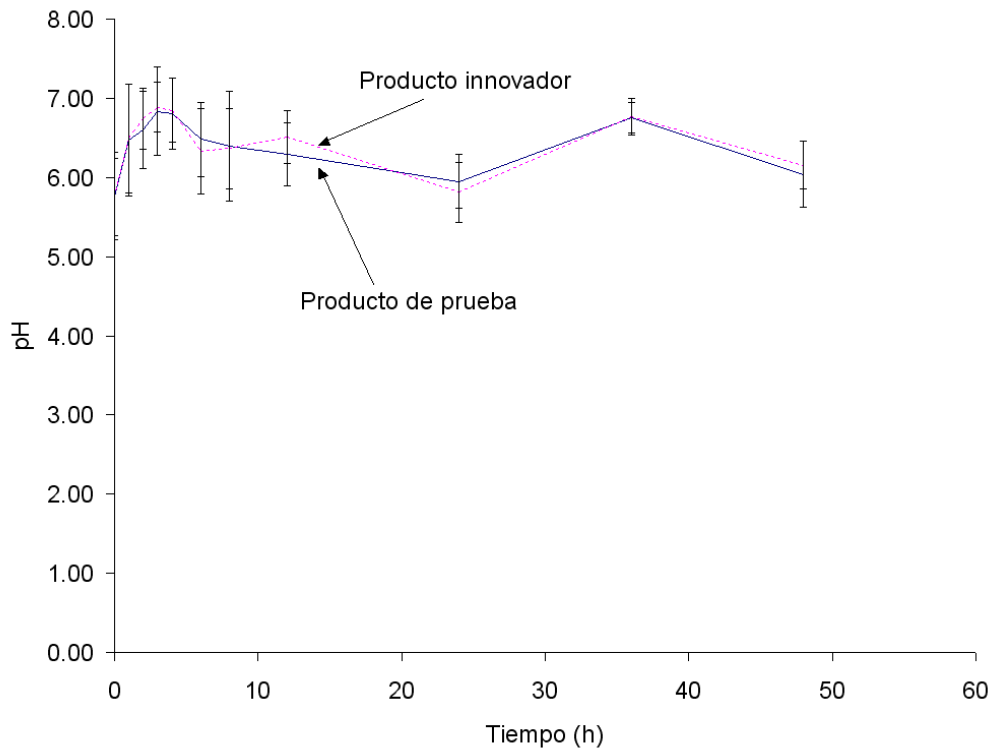


Figura 21. Valores de pH urinario a los diferentes tiempos de muestreo.

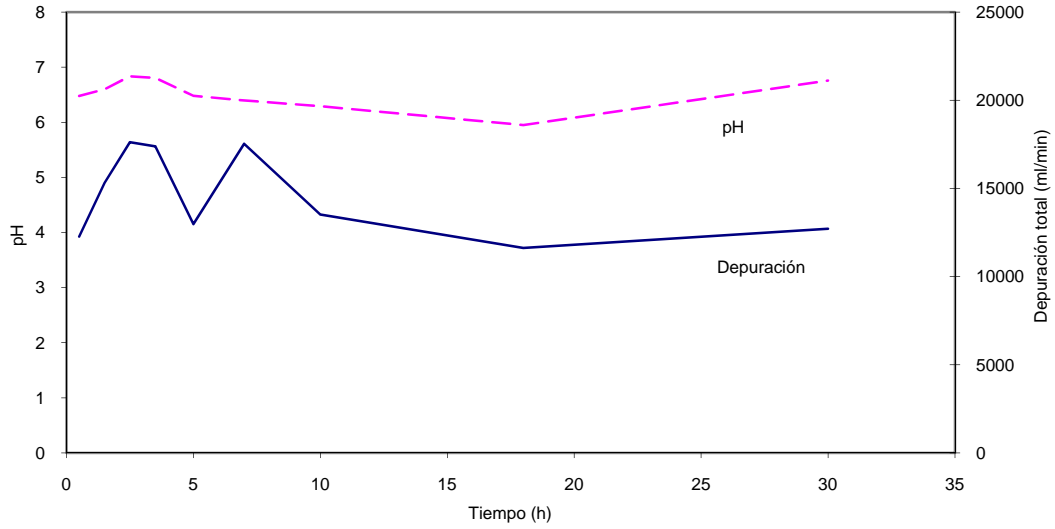


Figura 22. Relación entre la depuración y el pH en función del tiempo.
Producto de prueba.

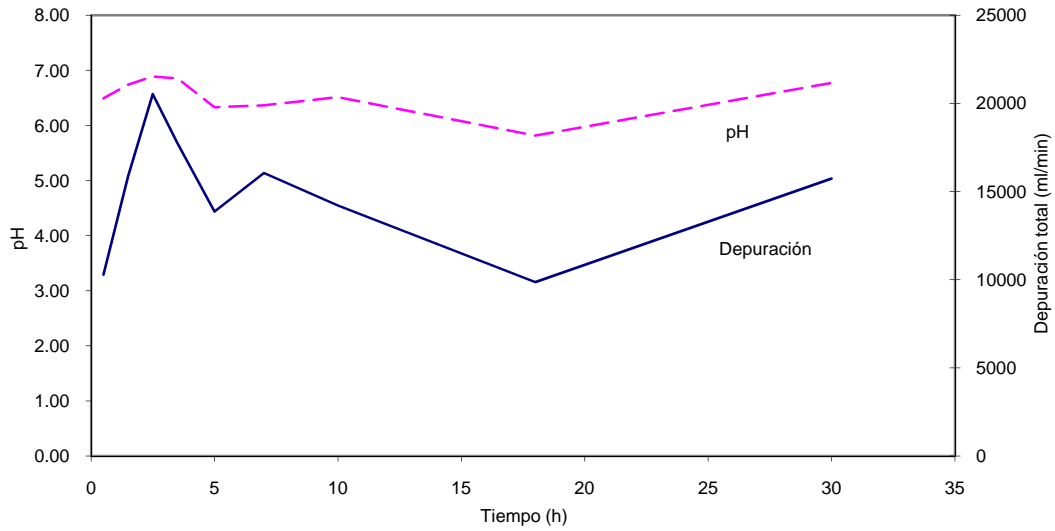


Figura 23. Relación entre la depuración y el pH en función del tiempo.
Producto innovador.

En la Figura 24 se puede apreciar el efecto de la hidroclorotiazida en la presión arterial. Se observa que el Cmax del perfil plasmático obtenido a las 2.5 h después de la administración correlaciona con el efecto farmacológico sobre la presión arterial

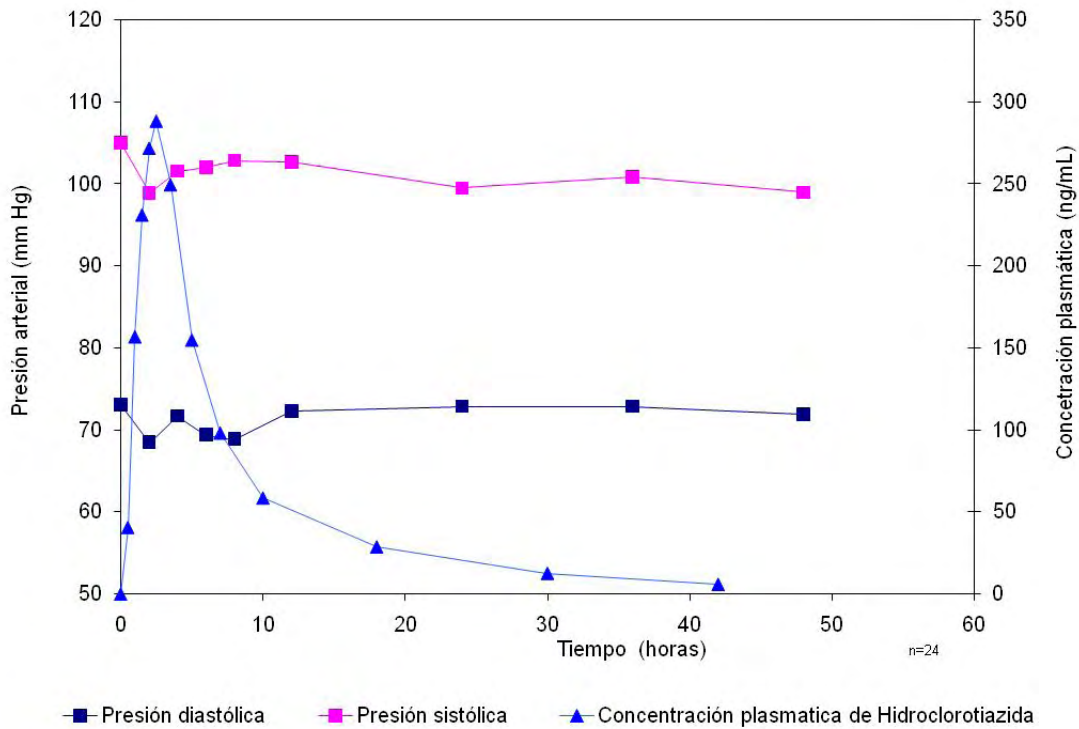


Figura 24. Efecto del cambio de concentración de la Hidroclorotiazida en la presión arterial promedio. Producto de prueba.

8. CONCLUSIONES

- a. Los productos estudiados cumplieron con las especificaciones de control de calidad que marca la USP 23.
- b. El método analítico utilizado para la cuantificación de Hidroclorotiazida en plasma y orina fue lineal, sensible y exacto en el intervalo de trabajo definidos; de 10 a 600 ng/ml en plasma y 1 a 100 μ g/ml en orina. Así mismo, no se detectaron interferencias de compuestos endógenos o de su principal metabolito
- c. Al hacer el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas en los parámetros:
 - Áreas bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo,
 - Concentración plasmática máxima
 - Cantidad acumulada excretada en orina
 - Velocidad de excreción
- d. Entre el producto de referencia y de prueba no se encontraron diferencias significativas en la velocidad de absorción y la cantidad absorbida por lo tanto los productos son bioequivalentes.
- e. El estudio de bioequivalencia puede llevarse a cabo en sangre o en orina.

9. ANEXOS

ANEXO 1

FORMULAS UTILIZADAS PARA CALCULAR LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS

Parámetro	Fórmula
Area bajo la curva de concentración plasmática - tiempo desde 0 hasta el último tiempo de muestreo ($AUC_{(0-t)}$)	Suma $[(t_i - t_{i-1})(C_i + C_{i-1})]/2$
Area bajo la curva de concentración plasmática - tiempo desde 0 hasta infinito ($AUC_{(0-inf)}$) * I_z = Constante de la velocidad de eliminación (K_e)	Suma $[(t_i - t_{i-1})(C_i + C_{i-1})]/2 + C_z/I_z$
Momento del área bajo la curva de concentración plasmática - tiempo desde 0 hasta infinito ($MAUC_{(0-inf)}$)	Suma $[t_i (C_i + C_{i-1})]/2 + t_z C_z/I_z + C_z/I_{z2}$
Tiempo medio de residencia (MRT)	$MAUC_{(0-inf)} / AUC_{(0-inf)}$
Concentración plasmática máxima (C_{max})	Concentración mayor obtenida de los datos plasmáticos de cada sujeto del estudio
Tiempo para alcanzar la concentración máxima (T_{max})	Tiempo en el que se presenta la concentración plasmática máxima
Tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$)	$\ln(2)/(-I_z)$
Cantidad excretada acumulada en cada intervalo de muestreo (A_e)	Cantidad * Volumen de orina excretado
Cantidad excretada acumulada total (A_{e_i})	Suma (Cantidad * Volumen de orina excretado) _i
Velocidad de excreción en cada intervalo de muestreo	$(\text{Cantidad excretada}) / (T_{final} - T_{inicial})$
Máxima velocidad de excreción	Velocidad de excreción mayor obtenida de los datos urinarios de cada sujeto del estudio
Tiempo para alcanzar la máxima velocidad de excreción	Tiempo en el que se presenta la velocidad de excreción máxima
Depuración renal	$(\text{Cantidad excretada acumulada}) / (\text{Area bajo la curva de concentración plasmática})$
Depuración total	$(\text{Velocidad de excreción}) / (\text{Concentración plasmática})$

ANEXO 2.

CANTIDAD EXCRETADA ACUMULADA (mcg) DE HIDROCLOROTIAZIDA EN ORINA POR SUJETO E INTERVALO DE MUESTREO DEL PRODUCTO DE PRUEBA (A).

Sujeto	Secuencia	Período	-1 - 0	0 - 1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 6	6 - 8	8 - 12	12 - 24	24 - 36	36 - 48
1	1	1	0.00	0.00	1835.27	8653.45	15078.25	24803.65	28649.14	32655.89	36485.67	38366.49	39250.49
2	2	1	0.00	0.00	2245.32	6199.14	13174.04	17198.62	23249.50	27989.50	31005.94	31005.94	32006.56
3	2	1	0.00	1712.88	11030.67	17084.78	20334.46	24476.26	25948.67	29114.68	32713.92	34934.60	35525.50
4	1	1	0.00	0.00	821.24	3411.65	6909.77	11859.41	14095.66	15446.15	21540.11	21540.11	21540.11
5	2	1	0.00	257.68	2592.18	8029.23	13740.63	17339.00	20832.04	24387.38	28526.58	29867.81	30960.73
6	1	1	0.00	0.00	1107.40	4366.98	8765.94	11007.63	13242.91	18070.33	20145.89	25097.87	26177.83
7	1	1	0.00	0.00	5377.32	10367.80	11983.48	13902.30	15727.56	17795.76	19917.15	19917.15	20777.33
8	2	1	0.00	0.00	1414.70	3678.17	6621.82	14945.78	20747.16	24521.26	29179.94	31151.69	31985.03
9	1	1	0.00	1790.71	10333.75	17327.02	20326.62	25271.17	28246.45	30669.95	33658.65	34638.92	35524.68
10	2	1	0.00	896.38	7231.89	11167.57	16723.86	19784.08	22704.28	27742.01	30935.69	32760.52	33623.77
11	1	1	0.00	558.67	5090.40	8946.49	12424.69	14347.73	15641.17	19575.62	23289.07	25375.87	26259.72
12	1	1	0.00	373.52	6019.16	11551.34	15108.06	17661.34	22465.02	25177.46	30614.24	32847.68	34004.22
13	2	1	0.00	263.52	1526.60	4566.35	8809.20	11935.62	18926.37	23372.73	26675.33	30013.10	30936.32
14	2	1	0.00	147.58	939.00	2512.02	7922.78	14849.32	22067.16	25102.50	30182.18	32368.28	33373.76
15	2	1	0.00	479.89	3213.08	5161.16	11724.43	16263.89	24102.91	26985.31	32900.96	35293.66	36086.92
16	1	1	0.00	1404.52	6482.94	15820.81	18457.20	22230.14	25867.94	28567.48	34344.24	36191.66	37088.80
17	2	1	0.00	710.41	5515.21	11168.23	15431.52	21221.85	23334.61	25827.43	29372.17	31561.17	32279.25
18	2	1	0.00	107.54	2619.37	7664.41	11267.95	15576.60	18076.43	21176.88	24321.54	26722.18	27644.50
19	1	1	0.00	0.00	3242.16	9424.55	15468.78	19188.57	22892.16	26982.63	31363.29	31363.29	31985.45
20	1	1	0.00	0.00	3690.18	9919.43	12570.75	15713.19	17165.51	19267.14	23113.36	24974.38	24974.38
21	2	1	0.00	339.80	1558.85	3886.85	6344.80	8509.92	9252.20	10392.05	13669.41	14675.11	14675.11
22	1	1	0.00	497.64	3977.67	9819.26	13936.94	16270.49	18683.75	21093.71	25073.99	26584.82	26584.82
23	2	1	0.00	634.50	4407.27	12813.03	19166.91	22808.16	24958.89	27662.89	30067.19	31381.47	31381.47
24	1	1	0.00	0.00	1423.20	5813.95	9684.52	13570.68	19769.84	21486.28	25508.20	29228.87	30133.37

ANEXO 3.

CANTIDAD EXCRETADA ACUMULADA (mcg) DE HIDROCLOROTIAZIDA EN ORINA POR SUJETO E INTERVALO DE MUESTREO DEL PRODUCTO INNOVADOR (B)

Sujeto	Secuencia	Período	-1 - 0	0 - 1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 6	6 - 8	8 - 12	12 - 24	24 - 36	36 - 48
1	1	2	0.00	85.35	3269.06	10432.27	19531.62	23499.67	28292.92	32732.42	35724.26	37335.27	37335.27
2	2	2	0.00	0.00	3808.35	11957.01	16501.52	20828.51	23425.89	25175.40	28972.40	32221.34	32989.82
3	2	2	0.00	660.96	9457.56	16089.92	20160.65	23647.61	26324.90	28250.34	33967.14	35948.92	36994.66
4	1	2	0.00	0.00	955.83	4151.31	7457.82	11080.35	13435.73	16704.68	19110.23	19110.23	19110.23
5	2	2	0.00	0.00	2921.62	8557.77	13391.90	15894.40	19283.63	21419.21	25061.71	28031.41	29401.24
6	1	2	0.00	295.98	3750.41	7496.25	14050.70	16272.84	19791.34	22399.66	24086.83	27049.98	27049.98
7	1	2	0.00	0.00	1401.60	8734.38	12435.11	16860.41	19237.69	21202.39	23422.30	26537.92	27360.04
8	2	2	0.00	0.00	1886.32	4691.71	7565.46	14625.11	18399.27	26437.26	28432.62	31349.94	32075.55
9	1	2	0.00	1207.99	8689.28	15244.20	18616.95	24882.58	27493.58	29410.40	32217.95	34966.55	35811.11
10	2	2	0.00	1669.57	6662.21	12161.41	16049.14	20069.59	21972.19	23269.77	25257.31	28800.61	29442.53
11	1	2	0.00	0.00	626.93	7034.93	9904.76	14900.82	18116.12	23451.23	26208.47	29650.95	30699.27
12	1	2	0.00	172.72	1908.22	5454.98	7460.23	11353.13	12885.58	15184.36	17963.11	19632.81	20464.29
13	2	2	0.00	437.88	4886.87	9821.92	13626.49	16825.71	19170.29	22886.49	27108.61	28951.80	30088.59
14	2	2	0.00	324.77	3465.77	7858.67	10268.61	18320.81	20312.03	24789.47	29153.13	31798.91	32431.25
15	2	2	0.00	0.00	3651.94	10433.01	15338.82	20804.07	23459.30	26491.70	30629.58	32338.72	33641.56
16	1	2	0.00	1400.83	7359.82	11806.34	20267.54	23661.18	28514.21	32125.83	34744.66	38141.13	38599.70
17	2	2	0.00	0.00	2529.25	6672.46	9174.06	15402.15	18356.30	21285.37	24554.87	25499.85	25499.85
18	2	2	0.00	481.52	3772.89	7840.13	10701.53	14338.23	16378.49	17126.97	22106.14	23834.68	24345.40
19	1	2	0.00	1022.70	4366.74	10183.20	14516.48	18300.80	21008.05	25037.65	27745.81	29713.22	30512.93
20	1	2	0.00	770.88	5192.88	8790.42	10101.27	11546.56	12737.28	14128.88	17486.33	19576.05	19576.05
21	2	2	0.00	67.70	1549.70	3783.86	5112.44	6576.41	9373.91	10697.81	11997.96	13305.18	13705.04
22	1	2	0.00	0.00	2095.51	6802.03	12880.18	15345.58	17513.33	20530.05	24113.85	25746.99	25746.99
23	2	2	0.00	1191.28	6583.97	13239.57	16824.47	20594.39	22436.75	25479.30	28619.63	28619.63	29198.32
24	1	2	0.00	0.00	1290.00	9574.08	14002.96	17580.28	20990.51	25150.78	27039.53	29841.77	29841.77

ANEXO 4.
CONCENTRACION PLASMA TICA (ng/ml) DE HIDROCLOROTIAZIDA POR SUJETO Y TIEMPO DE MUESTREO DEL PRODUCTO DE PRUEBA (A)

Sujeto	Secuencia	Periodo	Producto	0.0 h	0.5 h	1.0 h	1.5 h	2.0 h	2.5 h	3.5 h	5.0 h	7.0 h	10.0 h	18.0 h	30.0 h	42.0 h
1	1	1	A	0.000	0.000	48.771	123.831	286.115	335.921	293.836	213.729	127.217	66.688	32.663	12.346	0.000
2	2	2	A	0.000	0.000	136.871	260.023	271.413	325.068	317.799	216.281	158.704	93.425	37.835	15.277	0.000
3	2	2	A	0.000	173.069	432.748	400.530	460.306	377.048	285.665	151.213	117.234	67.156	30.284	14.064	0.000
4	1	1	A	0.000	0.000	36.628	88.842	125.600	169.908	236.448	210.199	115.951	72.998	34.169	16.354	0.000
5	2	2	A	0.000	24.400	96.247	175.055	229.594	255.048	246.661	129.905	83.271	41.196	21.200	0.000	0.000
6	1	1	A	0.000	0.000	23.179	43.177	199.555	257.185	234.841	149.035	90.508	55.490	27.359	11.419	0.000
7	1	1	A	0.000	0.000	166.813	365.623	294.836	235.729	153.832	101.432	67.449	44.970	24.297	0.000	0.000
8	2	2	A	0.000	0.000	70.380	84.966	83.982	105.449	166.445	209.171	151.398	57.372	21.534	10.184	0.000
9	1	1	A	0.000	123.630	319.542	303.880	313.185	276.040	220.231	121.953	82.192	48.059	24.582	10.303	0.000
10	2	2	A	0.000	38.842	355.898	410.288	327.038	343.591	284.835	177.196	104.958	61.156	34.294	12.442	0.000
11	1	1	A	0.000	69.908	179.251	226.463	239.450	242.975	200.363	121.128	86.872	50.312	27.588	13.893	0.000
12	1	1	A	0.000	62.357	332.670	402.217	444.189	554.749	376.431	233.078	145.361	96.192	52.357	26.195	12.668
13	2	2	A	0.000	0.000	44.232	96.149	109.375	138.480	191.924	159.281	84.417	50.187	21.552	12.385	0.000
14	2	2	A	0.000	0.000	38.561	87.379	116.408	202.955	232.916	201.952	125.965	74.451	34.789	12.833	0.000
15	2	2	A	0.000	37.480	102.616	209.582	281.822	308.206	373.134	206.724	124.429	76.997	35.328	13.472	0.000
16	1	1	A	0.000	123.776	370.272	436.580	399.595	357.740	244.875	139.049	91.421	65.164	27.104	12.877	0.000
17	2	2	A	0.000	54.642	139.358	286.099	271.705	268.064	251.916	164.985	110.165	59.809	31.020	10.008	0.000
18	2	2	A	0.000	0.000	74.524	172.345	234.771	269.676	248.151	149.406	97.019	64.745	33.399	14.043	0.000
19	1	1	A	0.000	11.498	63.249	161.390	197.290	221.704	246.107	133.727	93.610	46.668	23.854	10.532	0.000
20	1	1	A	0.000	0.000	86.055	166.094	186.772	222.110	166.247	95.741	60.339	42.563	19.810	10.115	0.000
21	2	2	A	0.000	65.330	205.747	247.812	264.901	293.409	241.162	107.960	64.915	35.313	17.694	0.000	0.000
22	1	1	A	0.000	15.010	215.677	274.187	397.293	354.976	243.087	142.399	90.646	58.004	30.132	14.170	0.000
23	2	2	A	0.000	41.877	159.789	346.187	372.805	388.248	235.099	119.970	70.350	47.463	22.217	0.000	0.000
24	1	1	A	0.000	0.000	35.027	82.283	262.653	258.064	210.755	135.659	77.999	44.089	25.286	14.954	0.000

ANEXO 5.
CONCENTRACION PLASMATICA (ng/ml) DE HIDROCLOROTIAZIDA POR SUJETO Y TIEMPO DE MUESTREO DEL PRODUCTO INNOVADOR(B)

Sujeto	Secuencia	Periodo	Producto	0.0h	0.5h	1.0h	1.5h	2.0h	2.5h	3.5h	5.0h	7.0h	10.0h	18.0h	30.0h	42.0h
1	1	2	B	0.000	11.411	128.382	332.095	424.890	412.022	280.976	179.490	113.394	60.050	26.125	10.025	0.000
2	2	1	B	0.000	63.127	150.897	249.978	401.008	396.123	276.236	188.690	113.876	75.927	36.640	14.970	0.000
3	2	1	B	0.000	106.700	351.770	359.720	457.014	435.321	277.805	166.975	104.761	63.530	38.832	11.m	0.000
4	1	2	B	0.000	16.741	70.855	126.753	153.892	246.948	364.929	223.749	126.845	75.893	40.607	16.520	0.000
5	2	1	B	0.000	0.000	61.912	179.955	238.148	240.479	214.999	127.269	68.406	43.058	23.650	11.973	0.000
6	1	2	B	0.000	19.907	193.996	219.020	251.046	204.876	190.126	110.060	72.427	41.964	22.047	10.767	0.000
7	1	2	B	0.000	0.000	64010	190.610	311.375	308.280	242.378	132.987	84.620	51.373	27.672	13.462	0.000
8	2	1	B	0.000	11.809	24.019	96.733	93.612	142.668	276.878	213.574	124.199	58.975	24.959	11.651	0.000
9	1	2	B	0.000	61.940	278.843	233.797	224.938	273.559	251.589	137.716	87.774	54.721	23.336	11.174	0.000
10	2	1	B	0.000	93.801	345.566	367.298	393.915	337.411	262.572	161.730	95.352	57.898	30.470	11.750	0.000
11	1	2	B	0.000	0.000	11.008	110.079	176.984	254.249	251.777	168.961	112.809	59.712	36.235	15.280	0.000
12	1	2	B	0.000	118.245	23.259	160.887	161.491	169.656	192.223	134.936	88.204	58.258	30.448	13.111	0.000
13	2	1	B	0.000	0.000	65174	144.934	209.819	214.471	167.995	705.729	62.921	47.008	21.431	13.318	0.000
14	2	1	B	0.000	63.159	131.060	184.388	164.519	177.834	228.800	173.768	109.072	57.833	32.489	11.023	0.000
15	2	1	B	0.000	17.541	47.769	327.631	390.850	386.725	316.402	178.774	113.310	65.269	30.621	12.371	0.000
16	1	2	B	0.000	54.783	279.960	427.457	306.076	304.925	235.970	140.940	94.147	59.294	28.515	11.192	0.000
17	2	1	B	0.000	0.000	44.550	114.972	141.149	207.800	241.710	147.248	84.633	47.575	28.321	10.492	0.000
18	2	1	B	0.000	54.459	139.641	217.426	216.425	253.756	194.123	111.293	76.604	49.441	23.220	10.486	0.000
19	1	2	B	0.000	40.838	166.519	222.668	174.241	178.065	157.047	130.601	69.438	44.642	22.587	0.000	0.000
20	1	2	B	0.000	49.564	100.416	167.880	141.823	115.359	85.402	57.733	35.041	24.205	12.749	0.000	0.000
21	2	1	B	0.000	0.000	97.805	164.095	204.178	198.359	181.349	90.597	47.917	30.104	14.973	0.000	0.000
22	1	2	B	0.000	0.000	36.408	130.936	350.635	427.272	385.465	190.192	120.894	64.089	30.776	12.642	0.000
23	2	1	B	0.000	61.508	220.910	313.698	388.555	344.755	216.738	124.172	75.543	52.602	21.848	0.000	0.000
24	1	2	B	0.000	0.000	21.593	125.313	195.973	237.480	195.069	115.065	73.948	46.646	21.283	12.270	0.000

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 34th edition, Edited by Sean C Sweetman. London The Pharmaceutical Press (2004), p 933.
2. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3rd edition, Managing Editor Laurent Y Galichet. London Pharmaceutical Press (2004), pp 1109-1110.
3. The Merck Index, Tenth edition, Editor Martha Windholz, Merck & Co., Inc. Rahway, N.J., U.S.A. (1983). pp 4678-4689.
4. USP Dictionary of USAN and International Drug Names 1996. United States Pharmacopoeial Convention, Inc. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852 . p 346.
5. Analytical Profiles of Drug Substances, Edited by Klaus Florey, Academic Press (1981), vol. 10 p 405-441.
6. Goodman A., Goodman L., Gilman A.; Las bases farmacológicas de la terapéutica, 6a. ed, Editorial Médica Panamericana (1982), pp 794, 800.
7. Drug Information for the Health Care Professional USP DI 2004, United States Pharmacopoeial Convention Inc. pp 1150-1156
8. Bowman, W.C; Farmacología, Bases bioquímicas y patológicas, 2a ed., Nueva Editorial Interamericana, México (1984), pp 21.46, 23.31, 23.33, 40.5 y 40.9.
9. Carsolio, R.; Guía Profesional de los Medicamentos, Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México (1984), pp 499-500.
10. Peter G. Welling; Pharmacokinetics of the thiazide diuretics, Biopharmceutics & Drug Disposition **7**, 501-535 (1986).
11. Barbhaiya, H. R, T. A. Phillips and P.G. Welling, High-pressure liquid chromatographic determination of chlorothiazide and hydrochlorothiazide in plasma and urine: preliminary results of clinical studies. J. Pharm. Sci., 1981, **70**(3), 291-295
12. Beermann B, Groschinsky-Grind M, Rosen A. Absorption, metabolism, and excretion of hydrochlorothiazide. Clin Pharmacol Ther. 1976 May;**19**(5 Pt 1):531-537.
13. Shah VP, Lee JJ, Prasad VK, Hunt JP, Cabana BE. Thiazides III. Evidence of dose proportionality of hydrochlorothiazide 25, 50 and 100 mg tablets. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1983, Jan;**39**(1):39-48.
14. Lindström B., Molander, M., Groschinsky M.; Gas chromatographic determination of hydrochlorothiazide in plasma, blood corpuscles and urine using an extractive alkylation technique. J. Chromatogr. 1979, **168**; 107-116.
15. Beerman B., Groschinsky-Grind M.; Bioavailability of two hydrochlorothiazide preparations. Europ. J. Clin. Pharmacol. 1977, **12**, 297-303
16. Beerman B., Groschinsky-Grind M.; Enhancement of the gastrointestinal absorption of hydrochlorothiazide by propantheline. Europ. J. Clin. Pharmacol. 1977, **11**, 203-205.
17. Patel R B, Patel U R, Rogge M C, Shah V P, Prasad V K, Selen A and Welling P G. Bioavailability of hydrochlorothiazide from tablets and suspensions. J. Pharm. Sci., 1984, **73**, 359-361.

18. Redalieu E, Chan KK, Tipnis V, Zak SB, Gilleran TG, Wagner WE Jr, LeSher AR. Kinetics of hydrochlorothiazide absorption in humans. *J Pharm Sci.* 1985 Jul;**74**(7):765-7.
19. Kraml M, Dubuc J, Dvornik D, Patterson-Kreuscher S, Perdue H, Lee TY, Mullane J. Biopharmaceutical characteristics of a new propranolol/hydrochlorothiazide tablet combination. *Biopharm Drug Dispos.* 1982 Jan-Mar;**3**(1):55-65
20. Barbhaiya RH, Patel RB, Corrick-West HP, Joslin RS, Welling PG. Comparative bioavailability and pharmacokinetics of hydrochlorothiazide from oral tablet dosage forms, determined by plasma level and urinary excretion methods. *Biopharm Drug Dispos.* 1982 Oct-Dec;**3**(4):329-36.
21. Sabanathan K, Castleden CM, Adam HK, Ryan J, Fitzsimons TJ. A comparative study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of atenolol, hydrochlorothiazide and amiloride in normal young and elderly subjects and elderly hypertensive patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 1987; **32**(1):53-60.
22. Williams RL, Davies RO, Berman RS, Holmes GI, Huber P, Gee WL, Lin ET, Benet LZ. Hydrochlorothiazide pharmacokinetics and pharmacologic effect: the influence of indomethacin. *J Clin Pharmacol.* 1982 Jan;**22**(1):32-41
23. Blume CD; Williams RL; Upton RA; Lin ET; Benet LZ. Bioequivalence study of a new tablet formulation of triamterene and hydrochlorothiazide. *Am J Med,* 1984 Nov 5, **77**:5A, 59-61.
24. Blume CD; Williams RL. A new antihypertensive agent: Maxzide (75 mg triamterene/50 mg hydrochlorothiazide). *Am J Med,* 1984 Nov 5, **77**:5A, 52-8
25. Sharoky M; Perkal M; Tabatznik B; Cane RC Jr; Costello K; Goodwin P. Comparative efficacy and bioequivalence of a brand-name and a generic triamterene-hydrochlorothiazide combination product. *Clin Pharm,* 1989 Jul, **8**:7, 496-500.
26. Williams RL; Lin ET; Liang-Gee W; Blume CD; Benet LZ. Absorption and disposition of a new low-dose combination formulation of hydrochlorothiazide and triamterene. *Biopharm Drug Dispos,* 1990 Apr, **11**:3, 233-43
27. Knauf H; Möhrke W; Mutschler E; Völger KD. On the bioavailability of hydrochlorothiazide and triamterene from commercial drugs (author's transl). *Arzneimittelforschung,* 1980, **30**:6, 1001-4
28. Upton RA; Williams RL; Lin ET; Gee WL; Blume CD; Benet LZ. Absence of a significant pharmacokinetic interaction between hydrochlorothiazide and triamterene when coadministered. *J Pharmacokinet Biopharm,* 1984 Dec, **12**:6, 575-86.
29. Krause W; Lennert C. Pharmacokinetics of mepindolol administered alone and in combination with hydrochlorothiazide--a bioequivalence study. *Biopharm Drug Dispos,* 1983 Oct-Dec, **4**:4, 339-45
30. Howes LG; Conway EL; Phillips PA; Broadbear J; Drummer OH; Louis WJ. Pharmacokinetic comparison of a combination tablet of enalapril and hydrochlorothiazide with enalapril and hydrochlorothiazide tablets administered together and separately. *Biopharm Drug Dispos,* 1991 Aug-Sep, **12**:6, 447-55
31. Gomez HJ; Cirillo VJ; Irvin JD. Enalapril: a review of human pharmacology. *Drugs,* 1985, **30** Suppl 1:, 13-24

32. Chiang ST; White GR; Spangler T; Davis M; Pascucci VL; Walker BR . Effects of guanabenz on gastrointestinal absorption of hydrochlorothiazide. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1984, **6** Suppl 5:, S771-5
33. Morales Hernández José Manuel. Estudio de Bioequivalencia de productos comerciales conteniendo Hidroclorotiazida y Amilorida como principios activos (tesis).
34. Corrigan OI; Timoney RF; Whelan MJ. The influence of polyvinylpyrrolidone on the solution and bioavailability of hydrochlorothiazide. *J Pharm Pharmacol*, 1976 Sep, **28**:9, 703-6
35. Hunninghake DB; Hibbard DM. Influence of time intervals for cholestyramine dosing on the absorption of hydrochlorothiazide. *Clin Pharmacol Ther*, 1986 Mar, **39**:3, 329-34
36. Hunninghake DB; King S; LaCroix K. The effect of cholestyramine and colestipol on the absorption of hydrochlorothiazide. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1982 Apr, **20**:4, 151-154.
37. Melander A Influence of food on the bioavailability of drugs. *Clin Pharmacokinet*, 1978 Sep-Oct, **3**:5, 337-51
38. Beermann B; Groschinsky-Grind M. Gastrointestinal absorption of hydrochlorothiazide enhanced by concomitant intake of food. *Eur J Clin Pharmacol*, 1978 May **17**, 13:2, 125-8.
39. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), “A Brief History of the Center for Drug Evaluation and Research”, Food and Drug Administration. USA, 2006, (Internet) Marzo 4, 2006. <http://www.fda.gov/cder/about/history/Histext.htm>
40. Guidance for Industry. Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER). March 2003 BP Revision 1
41. Guidance for Industry. Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER) January 2001 BP
42. Guidance for Industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER) August 2000 BP
43. Guidance for Industry. Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Scale-Up and Post-approval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) November 1995
44. Bioavailability and bioequivalence requirements. Code of Federal Regulations Chapter 21, Part 320. Food and Drug Administration, USA. HHS (4–1–05 Edition).
45. The United States Pharmacopeia USP 29 – NF 24. <1090> In vivo Bioequivalence Guidances. The United States Pharmacopeial Convention, 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, USA 2006. pp 2929-2934.

46. GUIDANCE FOR INDUSTRY. Conduct and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies - Part A: Oral Dosage Formulations Used for Systemic Effects. Minister of Public Works and Government Services Canada 1992.
47. Guideline for Bioequivalence Studies of Generic Products. The National Institute of Health Sciences (NIHS), Japan December 22, 1997.
48. Marketing Authorization Of Pharmaceutical Products With Special Reference To Multisource (Generic) Products: A Manual For Drug Regulatory Authorities. WHO/DMP/RGS/98.5
49. Draft additional guidance for organizations performing in vivo bioequivalence studies. Working document QAS/05.120/Rev.1 RESTRICTED. World Health Organization, Switzerland, 30 November 2005.
50. Proposed criteria for bioequivalence testing (in vitro and in vivo) and for waivers of in vivo testing of generic drug products. EDITED VERSION # 4. PAN AMERICAN NETWORK ON DRUG REGULATORY HARMONIZATION Bioavailability and Bioequivalence Working Group - Consultation of Experts on Bioequivalence of Pharmaceutical Products. Caracas, Venezuela. January 13-15, 1997. Program on Essential Drugs and Technology (HSE). Division of Health Systems and Services Development (HSP). June 1999.
51. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Evaluation of Medicines for Human Use. CPMP/EWP/QWP/1401/98. London, 26 July 2001.
52. Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-003-SSA1-1998, Medicamentos genéricos intercambiables (DOF 25 de marzo de 1998).
53. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas (DOF 7 de mayo de 1999)
54. Guidelines for Bioavailability and Dissolution Studies for Hydrochlorothiazide Oral Tabletas. Food and Drug Administration, Sep 28, 1987.
55. Shah, V P, Comparison of plasma and urine analyses for thiazides in bioavailability/bioequivalence study. J. Pharm. Sci. 70 (7) 833-835 (1981)
56. Maren, T. H., Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. Physiol. Rev., 47, 595 (1967)
57. P. P. Koopmans, Y. Tan, C. A. M. Van Ginneken, F. W. J. Gribnau, High-performance liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide in plasma and urine. J. Chromatogr. Biomed. Appl. 307 (1984) 445-450
58. Van der Meer, M J. Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatographic. J. Chromatogr. Biomed. Appl. 423 (1987) 351-357
59. Park, Song-Ja. Systematic Analysis of diuretic doping agents by HPLC screening and GC/MS confirmation. J. Analytical Toxicology 14: 84 (1990)
60. Azumaya, C T. Sensitive liquid chromatographic method for the determination of hydrochlorothiazide in human plasma. J. Chromatogr. Biomed. Appl., 532 (1990) 168-174.

61. Campis-Falco, P. Improved detection limits for screening of diuretics by coupled liquid chromatography and ultraviolet-visible spectrophotometry. *J. Chromatogr. Biomed. Appl*, 612 (1993) 245-251
62. Cortés, M. Desarrollo y validación de un método analítico para cuantificar hidroclorotiazida en plasma. Tesis. Universidad La Salle. México D.F., 1995.
63. Botello, M. Obtención de un método confiable para cuantificar hidroclorotiazida en orina para un estudio de bioequivalencia. Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México D.F., 1996